



La rotenona como modelo de estrés oxidativo y el papel neuroprotector de la curcumina, el tramiprosato y el azul de metileno en neuronas colinérgicas: estrategia multi-target en la enfermedad de Alzheimer.

Carolina Vélez Quintero
Microbióloga y Bioanalista

Trabajo de investigación presentado para optar al título de Magíster en Ciencias
Básicas Biomédicas- Énfasis en Neurociencias

Tutor
Carlos Alberto Vélez Pardo, Doctor (PhD) M.Sc. Dsc.

Comité tutorial
Marlene Jiménez del Río, M.Sc. Dsc.
Dora María Benjumea Gutiérrez, Dsc.
Miguel Angel Mendivil Pérez, M.Sc. Dsc.

Universidad de Antioquia
Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Medellín, Antioquia, Colombia

2023

Cita	Vélez Quintero y Vélez Pardo (1)
Referencia	(1) Vélez Quintero C, Vélez Pardo CA. La rotenona como modelo de estrés oxidativo y el papel neuroprotector de la curcumina, el tramiprosato y el azul de metileno en neuronas colinérgicas: estrategia multi-target en la enfermedad de Alzheimer. [Tesis de maestría]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2023.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo de Neurociencias de Antioquia.

Sede de Investigación Universitaria (SIU).



Biblioteca Médica

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Agradecimientos

Existen tantos átomos en una sola molécula de ADN como existen estrellas en una galaxia promedio. Somos, cada uno de nosotros, un pequeño universo.

Neil de Grasse Tyson.

En este viaje que emprendí hace algún tiempo a través de diversos caminos de la ciencia, jamás imaginé encontrar personas de la calidad, conocimiento y experiencia de los Doctores Carlos Vélez y Marlene Jiménez en esta parte del camino, a quienes debo una profunda gratitud por brindarme la oportunidad de ingresar a una carrera investigativa y por hacerme sentir orgullosa de haber elegido este camino. Como mentores no podía pedir más, agradezco su confianza, orientación, paciencia y cuidado.

También agradezco sinceramente a Miguel, Viviana y Diana por compartir sus conocimientos y orientarme en el proceso de ejecución de mi proyecto. Me enseñaron más que solo la ejecución técnica de un procedimiento, me enseñaron que era ser un científico, gracias por su paciencia y apoyo, han sido unos excelentes mentores.

Gracias a Juan Pablo, Jenny, Tania, Anlly, Nicolas, Daniela, Natalia, Lina, Daniel, Pablo, Santiago, Isaura, Luis, Claudia y Gloria por todas las experiencias compartidas, los almuerzos juntos y los conocimientos adquiridos a través de ustedes en el grupo de investigación. Hicieron que mi paso por el GNA fuera una experiencia maravillosa de la que aprendí mucho más de lo que la academia puede enseñar. No pude haber elegido mejores personas con las cuales compartir el proceso del desarrollo de este posgrado. Muchas gracias por su cariño y apoyo. Me han cambiado como persona para mejor y los tendré siempre en mi corazón.

Agradezco al fondo de becas de maestría de la UdeA por facilitarme parte de mi proceso académico. Este tipo de ayudas fueron fundamentales para continuar con mi formación investigativa.

También agradezco a la Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas por permitir el desarrollo de esta maestría. al proyecto de Investigación "Diseño de una terapia combinada para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer familiar con

mutación en la presenilina 1” de Minciencias y al proyecto “The complex interaction between alzheimer drivers and aging” por otorgar la financiación necesaria para la realización de este proyecto.

Dedico este logro a mi familia, especialmente a mi madre Marisol, mi hermano Cristian, y mi tía Rosita. Gracias por apoyarme en esta travesía de alcanzar mis sueños a pesar de las adversidades y por todo su amor a lo largo de mi vida. Gracias por la paciencia y por la comprensión al no poder haber compartido con ustedes tanto como quería. Hace 10 años el sueño de hacer un posgrado o siquiera de estudiar parecía imposible, pero gracias al sacrificio de todos y a la resiliencia adquirida en la dificultad logramos cambiar las condiciones adversas de la vida y sacar adelante esta meta. Por lo que les estoy eternamente agradecida.

Por último, quiero dedicar especialmente este triunfo a mi pareja, muchas gracias por acompañarme en cada uno de mis pasos, por ser la roca en la que apoyarme, por las noches de desvelos estudiando, por tu apoyo cuando parecía que las dificultades del camino eran muy grandes, por los esfuerzos conjuntos en culminar con éxito esta parte del camino, por darme el valor y la esperanza de culminar mis metas. Estuviste conmigo a través de los enrevesados caminos de la vida. Muchas gracias Yohn Esteban. Y espero que lo que ha unido la academia no lo separe la cotidianidad.

A todos mil gracias y sigan siendo estrellas para la humanidad.

Tabla de contenido

Resumen	14
Abstract	17
CAPÍTULO I: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)	20
1.1 Definición de la EA.....	20
1.2. Epidemiología	20
1.3 Clasificación y Etiología de la EA.....	23
1.4 Patología de la EA	24
1.4.1 Amiloidosis y EA	25
1.4.2 Taupatía y EA	27
1.4.3 Disfunción sináptica y EA.....	28
1.4.4 Neuroinflamación y EA.....	29
1.4.5 Desregulación de la homeostasis del calcio y EA.....	30
1.4.6 Disfunción colinérgica y EA.....	31
1.4.7 Estrés oxidativo y EA	31
1.4.8 Disfunción mitocondrial y EA	34
1.4.9 Apoptosis y EA.....	35
1.5. Factores de riesgo y ambientales en la EA.....	37
1.6. Factores genéticos.....	39
1.6.1. Genes causales de EAF. APP, PSEN1 y PSEN1	39
1.6.2. Genes de Riesgo APOE	40
1.7. Características clínicas de la EA.....	42
1.8. Diagnóstico de la EA.....	43
CAPÍTULO II: MODELOS Y NEUROTOXINAS PARA EL ESTUDIO DE LA EA.....	44
2. Modelos de estudio	44
2.1. Modelos <i>in vitro</i>	44
2.3 Modelos químicos	47

2.4. La Rotenona, neurotoxina modelo de la EA.....	48
CAPÍTULO III: CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES (CME) COMO MODELO DE LA EA	50
3.1. Definición de CME	50
3.2. Fuentes de obtención	51
3.3. Características biológicas y moleculares	51
3.4. Mecanismos de transdiferenciación de las CME en neuronas.....	53
CAPÍTULO IV: OPCIONES TERAPÉUTICAS PARA LA EA	58
4. Tratamientos para la EA.....	58
4.1. Convencionales	58
4.2. Alternativas terapéuticas de la EA	59
CAPÍTULO V: LA CURCUMINA COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA EA... 61	
5.1 Estructura química y características de la Curcumina	61
5.2. Actividades biológicas y mecanismos de acción de curcuminoides en la EA	62
5.2.1 Actividad antioxidante	62
5.2.2 Actividad antiinflamatoria	63
5.2.3. Actividad anti-amiloidogénica.....	64
5.2.4 Actividad anti-agregante de la proteína TAU	64
5.2.5 Actividad de Protección mitocondrial	64
5.2.6 Actividad Neuroprotectora Colinérgica.....	65
6.1. Estructura química y características del Tramiprosato	66
6.2. Actividades biológicas y mecanismos de acción del tramiprosato en la EA.....	67
6.2.1. Actividad anti-amiloidogénica.....	68
6.2.2. Actividad Neuroprotectora.....	68
6.2.3. Actividad GABAérgica	68
CAPÍTULO VII: EL AZUL DE METILENO COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA EA	70
7.1. Estructura química y características del Azul de metileno	70

7.2. Actividades biológicas y mecanismos de acción de Azul de metileno en la EA.....	70
7.2.1 Actividad anti-agregante de la proteína TAU	71
7.2.2 Actividad antioxidante	72
PARTE II: INVESTIGACIÓN	74
CAPITULO VIII: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	74
CAPÍTULO IX: DESARROLLO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	78
9.1. Hipótesis	78
9.2. Objetivos del proyecto	78
9.2.1 Objetivo general.....	78
9.2.2 Objetivos específicos	78
CAPÍTULO X: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	80
10. Materiales y métodos	80
10.1 Ensayo de transdiferenciación de CME-CU a Células similares a Neuronas colinérgicas (CSNC)	80
10.2 Evaluación de marcadores Colinérgicos mediante microscopía de fluorescencia .	81
10.3 Análisis de viabilidad celular por medio de espectrofotometría.....	81
10.4 Evaluación de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante microscopía de fluorescencia.....	82
10.5 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por microscopía de fluorescencia.....	82
10.6. Análisis de marcadores de EO, Taupatía, y apoptosis por microscopía de fluorescencia.....	83
10.7. Evaluación de Ca^{2+} intracelular por microscopía de fluorescencia	84
10.8. Análisis estadístico de datos.....	85
CAPÍTULO XI: RESULTADOS.....	86
11.1 Las CME-CU transdiferenciadas a CSNC expresan marcadores VAcHt y ChAT colinérgicos.....	86

11.2 Los tratamientos con curcumina y tramiprosato no afectan la viabilidad celular, mientras que la rotenona disminuye la viabilidad celular y el Azul de metileno (MB) reduce la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis a partir de 0,5 μM	87
11.3. La rotenona aumenta la producción de EROs y disminuye el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) en las CSNC.	88
11.4 Los tratamientos con curcumina 1 μM , MB 0.5 μM , curcumina 1 μM + tramiprosato 50 μM y MB 0,25 μM + tramiprosato 50 μM disminuyeron la producción de EROS, mientras que el MB 0,25 μM + tramiprosato 50 μM aumenta el $\Delta\Psi\text{m}$	89
11.5 La rotenona aumenta la oxidación de DJ1 y la fosforilación de c-Jun. mientras que disminuye la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC.....	92
11.6 Los tratamientos con curcumina, MB y tramiprosato no afectan la oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun ni la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC.....	93
11.7 La rotenona induce la fosforilación de Tau y la activación de Caspasa 3 en las CSNC.....	99
11.8 El tratamiento con tramiprosato a 50 μM disminuye la expresión del marcador proapoptótico caspasa 3, mientras que las concentraciones de 250 μM de tramiprosato y 0.25 μM de MB redujeron fosforilación de Tau.	100
11.9. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato no logró revertir la pérdida del $\Delta\Psi\text{m}$ ni el incremento de oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en CSNC expuestas a rotenona.	103
11.10 El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato disminuyó la hiperfosforilación de Tau, mejoró la respuesta funcional a acetilcolina y restableció parcialmente expresión de caspasa 3 en las CSNC expuestas a rotenona.....	106
CAPITULO XII. DISCUSIÓN	110
CAPITULO XIII. CONCLUSIONES.....	119
CAPITULO XIV. PERSPECTIVAS	121
BIBLIOGRAFIA.....	123

Lista de tablas

Tabla 1. Principales métodos de transdiferenciación a partir de CME.....	55
---	----

Lista de figuras introductorias

Figura 1. Cambio porcentual entre 2019 y 2050 del número de personas de todas las edades con demencia por país.....	22
Figura 2. Clasificación etiológica de EA.	23
Figura 3. Mecanismos neuropatológicos implicados en la EA.....	24
Figura 4. Mecanismos neuropatológicos implicados en la EA.....	25
Figura 5. Formación de placas seniles y NFT en la EA.....	27
Figura 6. Respuesta antioxidante ante el estrés oxidativo.....	33
Figura 7. Vías de señalización que desencadenan la apoptosis en la EA.....	37
Figura 8. Factores de riesgo y modificadores del desarrollo de la EA.	38
Figura 9. Genes de riesgo para el desarrollo de la EA.....	41
Figura 10. Las manifestaciones clínicas y su correlación con los estadios neuropatológicos de la EA.....	42
Figura 11. Métodos diagnósticos para la predicción, evaluación, diagnóstico y seguimiento de la EA.....	43
Figura 12. Modelos de investigación en EA.....	47
Figura 13. La rotenona como modelo de estudio de los mecanismos patológicos en la EA.....	49
Figura 14. Criterios de selección y usos en investigación de las CME.....	50
Figura 15. Fuentes de obtención y alternativas terapéuticas derivadas de las CME.....	53
Figura 16. Marcadores neuronales durante el proceso de transdiferenciación de CME a Neuronas.....	57
Figura 17. Alternativas terapéuticas aprobadas por la FDA o en ensayos clínicos para el tratamiento de la EA.....	59

Figura 18. Características estructurales de la curcumina.....	61
Figura 19. Mecanismos neuroprotectores de la curcumina en la EA.....	63
Figura 20. Estructura química y metabolismo del tramiprosato (Homotaurina).....	66
Figura 21. Mecanismos de neuroprotección del tramiprosato.....	67
Figura 22. Características químicas del Azul de Metileno (Methylene Blue (MB)).....	70
Figura 23. Mecanismos de neuroprotección del MB en la EA.....	71

Lista de figuras de resultados

Figura 1. Las CME-CU transdiferenciadas a CSNC expresan marcadores VACHT y ChAT colinérgicos.....	86
Figura 2. Los tratamientos con curcumina y tramiprosato no afectan la viabilidad celular, mientras que la rotenona disminuye la viabilidad celular y el Azul de metileno (MB) reduce la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis a partir de 0,5 μ M.....	88
Figura 3. La rotenona aumenta la producción de EROs y disminuye el $\Delta\Psi_m$, mientras que los tratamientos con curcumina 1 μ M y MB 0.5 μ M reduce la producción de EROS.....	90
Figura 4. Los tratamientos con curcumina 1 μ M + tramiprosato 50 μ M y MB 0,25 μ M + tramiprosato 50 μ M disminuyeron la producción de EROS, mientras que el MB 0,25 μ M + tramiprosato 50 μ M aumentó el $\Delta\Psi_m$	91
Figura 5. Los tratamientos individuales con curcumina, MB y tramiprosato no afectan la oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en las CSNC.....	95
Figura 6. Los tratamientos combinados con curcumina, MB y tramiprosato no afectan la oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en las CSNC.....	96
Figura 7. Los tratamientos individuales de curcumina, MB y tramiprosato no afectan la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC.....	97
Figura 8. Los tratamientos combinados de curcumina, MB y tramiprosato no afectan la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC.....	98

Figura 9. El tratamiento con tramiprosato a 50 μM disminuye la expresión del marcador proapoptótico caspasa 3, mientras que las concentraciones de 250 μM de tramiprosato y 0.25 μM de MB redujeron fosforilación de Tau.....101

Figura 10. La rotenona induce la fosforilación de Tau y la activación de Caspasa 3.....102

Figura 11. Figura 11.El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato no logró revertir la pérdida del $\Delta\Psi\text{m}$ en CSNC expuestas a rotenona.....104

Figura 12. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato no logró revertir el incremento de oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en CSNC expuestas a rotenona.....105

Figura 13. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato disminuyó la hiperfosforilación de Tau y restableció parcialmente expresión de caspasa 3 en las CSNC expuestas a rotenona.....107

Figura 14. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato mejoró significativamente la respuesta funcional a acetilcolina en las CSNC expuestas a rotenona..... 108

Figura 15. Resumen grafico de los resultados del trabajo de investigacion.....118

Siglas, acrónimos y abreviaturas

EA	Enfermedad de Alzheimer
EAF	Enfermedad de Alzheimer Familiar
EAE	Enfermedad de Alzheimer Esporádica
MB	Azul de metileno
Rot	Rotenona
ACh	Acetilcolina
EO	Estrés Oxidativo
EROs	Especies reactivas de Oxígeno
ERNs	Especies reactivas de Nitrógeno
ChLN y CSNC	Células similares a neuronas colinérgicas
Aβ	β amiloide
PS	Placas seniles
NFT	Ovillos neurofibrilares
CME	Células mesenquimales estromales
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
μM	Micro molar
BHE	Barrera hematoencefalica

Resumen

La EA es un trastorno neurodegenerativo, que causa un deterioro cognitivo progresivo e irreversible, y se caracteriza clínicamente por pérdida de la memoria y función ejecutiva, llevando a la demencia en estadios avanzados. Neuropatológicamente, se caracteriza por el depósito intra y extracelular del péptido β -amiloide ($A\beta$), la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares de Tau (NFT), además de disforia y pérdida neuronal, principalmente de las neuronas colinérgicas en el hipocampo. Actualmente es la enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia a nivel mundial, representando entre el 60% y el 80% de los casos de demencia. El número de afectados oscila entre 50.4 y 65.1 millones, estimándose que la cifra se triplique para el 2050. Su etiología es multifactorial y están implicados simultáneamente varios procesos patológicos como amiloidosis, taupatía, estrés oxidativo (EO), disfunción mitocondrial y neuroinflamación, conduciendo finalmente a la muerte neuronal.

A pesar de los avances en el entendimiento de la etiología de la enfermedad y de los múltiples ensayos clínicos que buscan desarrollar terapias para la EA, hasta ahora no se ha podido determinar con exactitud las causas que conducen a la muerte neuronal, y actualmente no existe un tratamiento que haya logrado revertir o detener la neurodegeneración en estos pacientes. En este sentido es necesaria la búsqueda e investigación de nuevos modelos de estudio de EA y de nuevos posibles compuestos farmacéuticos.

Recientemente se ha reportado la capacidad de la rotenona de inducir vías patológicas observadas en la EA como la hiperfosforilación de Tau, apoptosis, disfunción colinérgica y mitocondrial en modelos murinos. También se ha hallado que productos naturales, entre ellos la curcumina, el tramiprosato y el azul de metileno (MB), intervienen simultáneamente en múltiples vías asociadas con la EA por sus capacidades anti-amiloidogénicas, antiagregantes de Tau, antioxidantes, antiinflamatorias, y quelantes. En estudios in vitro la curcumina y el tramiprosato disminuyen la formación de placas seniles por su interacción con el $A\beta$, además de tener efectos antioxidantes y antiinflamatorios, mientras que el MB reduce la auto agregación de Tau, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo.

Dentro de este contexto, el presente proyecto busca evaluar el efecto de la rotenona en la generación de los mecanismos patológicos presentes en la EA como la formación del H_2O_2 , el mantenimiento del $\Delta\Psi_m$, la expresión de marcadores de estrés oxidativo, apoptóticos y de agregación proteica, así como la respuesta funcional a la acetilcolina. Adicionalmente se analizó el efecto de terapias individuales o combinadas de curcumina, tramiprosato y MB en estos mecanismos neuropatológicos, en un modelo neuronal colinérgico con y sin el citotóxico rotenona.

Para determinar estos resultados, se realizaron ensayos de viabilidad MTT y ensayos de inmunofluorescencia (IF) con las sondas Mitotracker, DCF-DA y Fluo 3-AM, para la medición del $\Delta\Psi_m$, formación de H_2O_2 y entrada intracelular de Ca^{2+} respectivamente. Así mismo se realizaron IF con anticuerpos para Caspasa 3, p-Tau, DJ1-Ox y P-c-Jun para el análisis de la expresión de marcadores de EO, NFT y apoptosis.

Los resultados obtenidos han mostrado que las CSNC expresan marcadores de linaje colinérgico (VACHT y ChAT) en mayor medida que las CME, evidenciando un proceso de transdiferenciación exitoso. Adicionalmente el cultivo con rotenona indujo el desarrollo de todas las vías patológicas evaluadas, desencadenando un aumento de la formación del H_2O_2 , la oxidación de DJ1, la expresión de caspasa 3 y la fosforilación de Tau y c-Jun, este citotóxico también redujo el $\Delta\Psi_m$, por lo que es un modelo químico adecuado para la inducción de los mecanismos patológicos presentes en la EAE en las CSNC.

Los tratamientos individuales y combinados de curcumina, tramiprosato y MB no afectaron la viabilidad celular a excepción de concentraciones mayores a $1\mu M$ de MB que disminuyen la viabilidad de forma dosis dependiente. Las concentraciones de curcumina $1\mu M$, MB $0.5\mu M$ y tramiprosato $50\mu M$ + MB $0.25\mu M$ disminuyeron la formación de H_2O_2 , este último tratamiento también aumentó el $\Delta\Psi_m$.

También Se observó que el tratamiento con tramiprosato a $50\mu M$ disminuyó la expresión del marcador proapoptótico caspasa 3, mientras que las concentraciones de tramiprosato $250\mu M$ y el MB $0.25\mu M$ redujeron la expresión del marcador de agregación proteica p-Tau Ser202/Thr205. Por otro lado, la oxidación de DJ1-Ox-Cys106, la fosforilación de c-Jun y la respuesta a acetilcolina no se modificaron con los tratamientos individuales o combinados.

En las CSNC incubadas simultaneamente con Rotenona 50 μ M.y el tratamiento combinado curcumina.1 μ M + tramiprosato 50 μ M + MB 0.25 μ M se halló que el tratamiento disminuye la fosforilación de Tau, la expresión de caspasas y la disfunción colinérgica. Por lo que se puede concluir que la rotenona es un buen modelo químico para la simulación de la EAE en modelos neuronales colinérgicos in vitro, y que las moléculas curcumina, tramiprosato y MB en terapias individuales o combinadas, presentan resultados promisorios para el tratamiento de pacientes con esta patología.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, Estrés Oxidativo, Agregación proteica, Apoptosis, rotenona, curcumina, tramiprosato, azul de metileno.

Abstract

AD is a neurodegenerative disorder, which causes progressive and irreversible cognitive impairment, and is clinically characterized by loss of memory and executive function, leading to dementia in advanced stages. Neuropathologically, it is characterized by intra- and extracellular deposition of β -amyloid ($A\beta$) peptide, formation of intracellular neurofibrillary tangles of Tau (NFT), in addition to dysphoria and neuronal loss, mainly of cholinergic neurons in the hippocampus. It is currently the most prevalent neurodegenerative disease worldwide, accounting for 60% to 80% of dementia cases. The number of people affected ranges between 50.4 and 65.1 million, and it is estimated that this figure will triple by 2050. Its etiology is multifactorial and several pathological processes are involved simultaneously (amyloidosis, tauopathy, oxidative stress (OS), mitochondrial dysfunction and neuroinflammation, ultimately leading to neuronal death.

Despite advances in the understanding of the etiology of the disease and the multiple clinical trials that seek to develop therapies for AD, so far it has not been possible to determine the exact causes that lead to neuronal death, and there is currently no treatment that has managed to reverse or stop neurodegeneration in these patients. In this sense, it is necessary to search for and investigate new models for the study of AD and new possible pharmaceutical compounds.

Recently, the ability of rotenone to induce pathological pathways observed in AD such as Tau hyperphosphorylation, apoptosis, cholinergic and mitochondrial dysfunction in murine models has been reported. Natural products, including curcumin, tramiprosate and methylene blue (MB), have also been found to be simultaneously involved in multiple pathways associated with AD through their anti-amyloidogenic, Tau antiaggregating, antioxidant, anti-inflammatory, and chelating abilities. In in vitro studies curcumin and tramiprosate decrease senile plaque formation by their interaction with $A\beta$, in addition to having antioxidant and anti-inflammatory effects, while MB reduces Tau self-aggregation, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress.

Within this context, the present project seeks to evaluate the effect of rotenone on the generation of pathological mechanisms present in AD such as H_2O_2 formation, maintenance of $\Delta\Psi_m$, expression of oxidative stress, apoptotic and protein aggregation markers, as well as functional response to acetylcholine. Additionally, the effect of single or combined

therapies of curcumin, tramiprosate and MB on these neuropathological mechanisms was analyzed in a cholinergic neuronal model with and without the cytotoxic drug rotenone.

To determine these results, MTT viability assays and immunofluorescence (IF) assays were performed with Mitotracker, DCF-DA and Fluo 3-AM probes, for the measurement of $\Delta\Psi_m$, H_2O_2 formation and intracellular Ca^{2+} entry, respectively. Likewise, IF with antibodies for Caspase 3, p-Tau, DJ1-Ox and P-c-Jun were performed for the analysis of the expression of EO, NFT and apoptosis markers.

The results obtained have shown that CSNCs express cholinergic lineage markers (VACHT and ChAT) to a greater extent than ESCs, evidencing a successful transdifferentiation process. Additionally, culture with rotenone induced the development of all pathological pathways evaluated, triggering an increase in H_2O_2 formation, DJ1 oxidation, caspase 3 expression and Tau and c-Jun phosphorylation, this cytotoxicity also reduced $\Delta\Psi_m$, making it a suitable chemical model for the induction of pathological mechanisms present in EAE in CSNCs.

Individual and combined treatments of curcumin, tramiprosate and MB did not affect cell viability with the exception of concentrations greater than $1\mu M$ of MB which decrease viability in a dose-dependent manner. Concentrations of curcumin $1\mu M$, MB $0.5\mu M$ and tramiprosate $50\mu M$ +MB. $0.25\mu M$ decreased H_2O_2 formation, the latter treatment also increased the $\Delta\Psi_m$.

It was also observed that treatment with tramiprosate at $50\mu M$ decreased the expression of the proapoptotic marker caspase 3, whereas concentrations of tramiprosate $250\mu M$ and MB $0.25\mu M$ reduced the expression of the protein aggregation marker p-Tau.Ser202/Thr205. On the other hand, DJ1-Ox-Cys106 oxidation, c-Jun phosphorylation and response to acetylcholine were not modified by single or combined treatments.

In CSNCs incubated simultaneously with Rotenone $50\mu M$.and the combined treatment curcumin $1\mu M$ + tramiprosate. $50\mu M$ + MB $0.25\mu M$ treatment was found to decrease Tau phosphorylation, caspase expression and cholinergic dysfunction. Thus, it can be concluded that rotenone is a good chemical model for the simulation of EAE in cholinergic neuronal models in vitro, and that the molecules curcumin, tramiprosate and MB in individual or

combined therapies, present promising results for the treatment of patients with this pathology.

Keywords: Alzheimer's disease, oxidative stress, protein aggregation, apoptosis, rotenone, curcumin, tramiprosate, methylene blue.

CAPÍTULO I: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

1.1 Definición de la EA

La EA es un trastorno neurodegenerativo, caracterizado clínicamente como un trastorno neurocognitivo mayor que causa un deterioro cognitivo progresivo e irreversible. Su síntoma más representativo es la pérdida de la memoria, pudiendo cursar con la pérdida de otras funciones cognitivas como la atención compleja, la función ejecutiva, el aprendizaje, el lenguaje, la regulación emocional, o las habilidades perceptivas, motoras o de cognición social, llevando a la demencia en estadios avanzados (1,2).

Existen descripciones compatibles con este trastorno desde el 1500 A.C. en el papiro de Ebers y finalmente fue clasificado durante el siglo XIX como una alteración neurodegenerativa, siendo su patología descrita por Alois Alzheimer en 1906 (3). La EA es considerada una proteinopatía, y neuro patológicamente se observan 2 signos clásicos que permiten el diagnóstico: las placas seniles compactas, formadas por la aglomeración extracelular del péptido Beta-amiloide ($A\beta$, de amyloid- β), y los ovillos neurofibrilares intracelulares, compuestos por agregados de la proteína Tau hiperfosforilada (4). En tejido encefálico se observa atrofia y pérdida de volumen, principalmente en el lóbulo temporal (5, 6). El desarrollo de EA se puede dividir en 3 fases clínicas: la presintomática, el deterioro cognitivo leve y la demencia, relacionadas con el grado de daño neuronal. Adicionalmente, dependiendo de la edad de inicio de aparición de los síntomas, es posible dividir el trastorno en: presenil (menores de 65 años) y senil (7,8).

1.2. Epidemiología

En los últimos años la prevalencia de las demencias ha ido en aumento, pasando de 24.4 millones de personas afectadas en 2004 (9) a 46.8 millones en 2015 (10,11,15). Actualmente la prevalencia oscila entre 50.4 y 65.1 millones de personas afectadas (12,13), y se estima que esta cifra puede incrementarse hasta los 131.5 millones en 2050 (4,5,28), siendo la EA y otras demencias la séptima causa de muerte en 2019 (14,16), con 1.5 millones de fallecimientos (12).

De los tipos de demencia, la EA es el subtipo más común, representando entre el 60% y el 80% de los casos a nivel mundial (7,10-12,16), la prevalencia varía según la región (13, 14) (fig 1), siendo la tasa de prevalencia en mayores de 60 años más alta en norteamérica

(6.4%) y Europa occidental (5.4%)(15), mientras que África, India y el sudeste asiático presentan las tasas más bajas (1,6% y 1,9% respectivamente) (13,17). Se estima que 6,2 millones de estadounidenses de 65 años padecían demencia tipo alzheimer en 2021, de los cuales el 72% tenían 75 años o más (28,29).

La incidencia de la EA se incrementa con la edad, pasando del 0,5% en población de 60 a 69 años, a entre 6% y 8% en mayores de 85 años (24), dándose en el 95 % de los casos en personas mayores de 65 años. Actualmente el 58% de los pacientes con demencia residen en países catalogados como de bajos o medianos ingresos (4,5, 13). Latinoamérica está clasificada en esta categoría y durante el año 2016 se calculó la existencia de 3'440.613 personas afectadas en esta zona (30), teniendo la prevalencia regional más alta a nivel mundial (17), oscilando el porcentaje en mayores de 64 años entre el 7,1% y el 11,5% (18).

Colombia es uno de los países con mayores problemáticas relacionadas con la EA, debido a la conjunción de 3 factores, una alta prevalencia de demencias, pocos estudios epidemiológicos que permitan determinar la incidencia real en el territorio, y la presencia de mutaciones causantes de EAF (13,19). Matemáticamente se calculó que para el año 2016 hubo aproximadamente 248.583 casos de demencia con 12.384 fallecidos (15). En diversos estudios sobre la frecuencia de enfermedades neurológicas, incluyendo demencia en personas mayores de 50 años, se han encontrado prevalencias de la misma entre el 1,3% y 5,4% (20). Estudios en mayores de 65 años en la ciudad de Manizales (Caldas), reportaron una prevalencia del 6 % (21). En otras investigaciones se encontraron prevalencias ajustadas de 8.1 personas con demencia por cada 1000 personas para mayores de 50 años, y de 34.2 por cada 1000 habitantes en mayores de 75 años (22). Otras investigaciones han indicado una prevalencia general para la demencia entre 1.8% y 3.4% para grupos de pacientes cuya edad está por encima de 65 y 75 años respectivamente (22,9), estas cifras se asimilan a las encontradas durante el estudio neuroepidemiológico nacional, donde se encontró una prevalencia general para las demencias de 1,3%, subiendo esta cifra a 3,04% en mayores de 70 años, siendo las regiones de mayor prevalencia en el país, la suroccidental con 2,2%, y la oriental con 1,9%(23). Sin embargo, estas estadísticas corresponden a estudios no longitudinales, sin una subclasificación clínica, lo que impide conocer el porcentaje de personas con EA.

Entre el 1% y el 5% de los casos de AE son de origen genético (EAF). Las mutaciones genéticas más prevalentes de éste se dan en los genes para *PSEN1*, *PSEN2* y *APP* (19,24). En Colombia se han hallado múltiples mutaciones en *PSEN1*, causantes de la enfermedad en edades tempranas como la Ile143Thr (I143T,), Glu280Ala (E280A), Glu318Gly (E180G) y Pro117Ala (P117A) (25). De éstas, la mutación E280A es la causa más habitual de la EAF, tanto a nivel nacional, como a nivel mundial. Fue descubierta en 1995 en el departamento de Antioquia, siendo la mayoría de los portadores provenientes de esta región, por lo que es conocida como “mutación paisa”, y abarca actualmente 6000 personas de 25 familias de este departamento, de las que se estima que 1000 poseen la mutación (26).

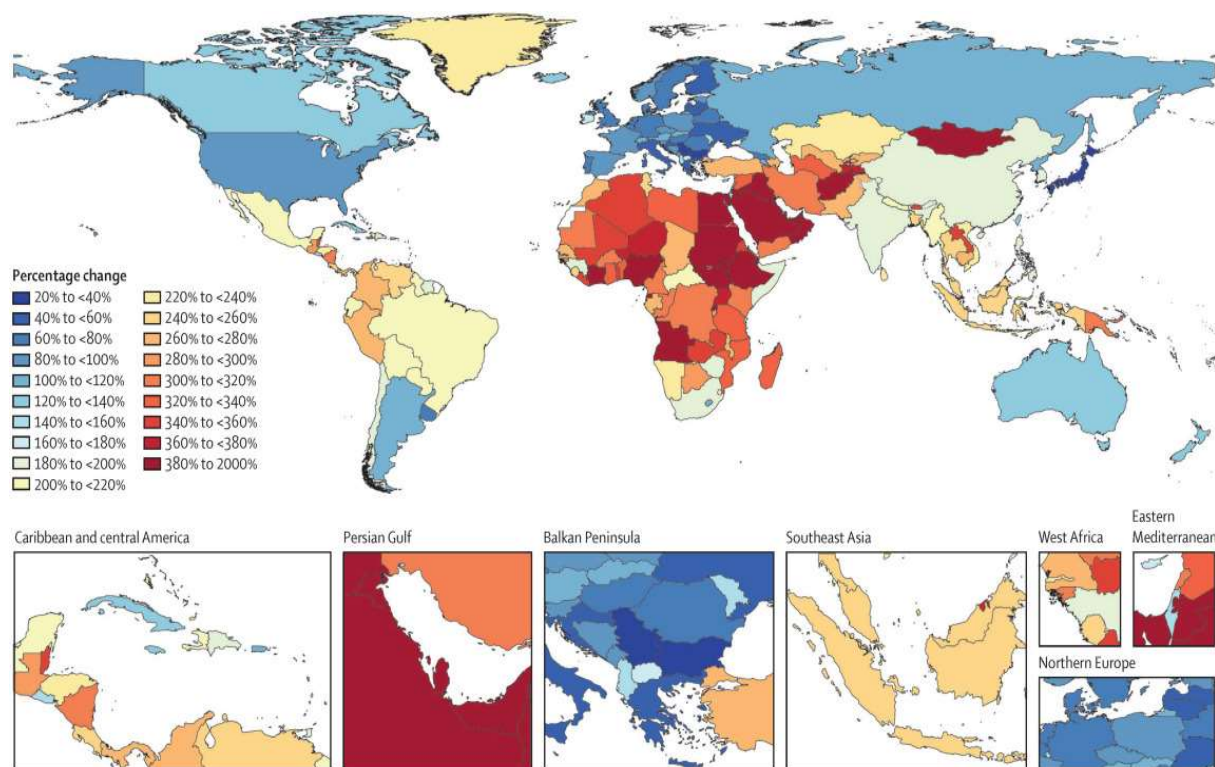


Figura 1. Cambio porcentual entre 2019 y 2050 del número de personas de todas las edades con demencia por país. Imagen tomada de ref (13)

1.3 Clasificación y Etiología de la EA

La clasificación de la EA se puede dar por edad en EA de inicio en presenil, o de inicio temprano cuyos síntomas inician entre los 30 y 65 años con una prevalencia entre el 1% y el 5% de todos los casos que se relacionan con un origen familiar, y en EA senil, o de inicio tardío que representa más del 95% de los eventos de EA (19), la cual se relaciona con una etiología esporádica. También se ha clasificado según la etiología de la enfermedad, en Enfermedad de Alzheimer familiar (EAF), que es causada por mutaciones autosómicas dominantes o duplicaciones en los genes de la proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN-1) y presenilina 2 (PSEN-2) (19), los cuales incrementan la concentración de APP o su escisión por la vía amiloidogénica, causando el incremento de la producción de péptido A β (19,27), y en Enfermedad de Alzheimer esporádica (EAE), que es de origen multifactorial, donde están relacionados factores de riesgo ambientales y genéticos como dietas altas en glucosa, exposición a altas concentraciones de material particulado (2.5) en el aire y la presencia de APOE4 (fig 2) (4, 6, 26, 27).

Existen varias teorías sobre los eventos que causan esta forma clínica, pero hasta el momento ninguno logra explicar todas las características de la enfermedad (28), por lo que la idea más aceptada es que confluyen varios factores que desencadenan la enfermedad, lo que conlleva a que en la actualidad existan múltiples hipótesis que tratan de explicar el desarrollo de este trastorno (fig 3). Algunas de las más aceptadas son: amiloidosis, taupatía, estrés oxidativo (EO), disfunción mitocondrial, disfunción colinérgica, disfunción autofágica, neuroinflamación y alteración de la homeostasis del calcio (29,30).

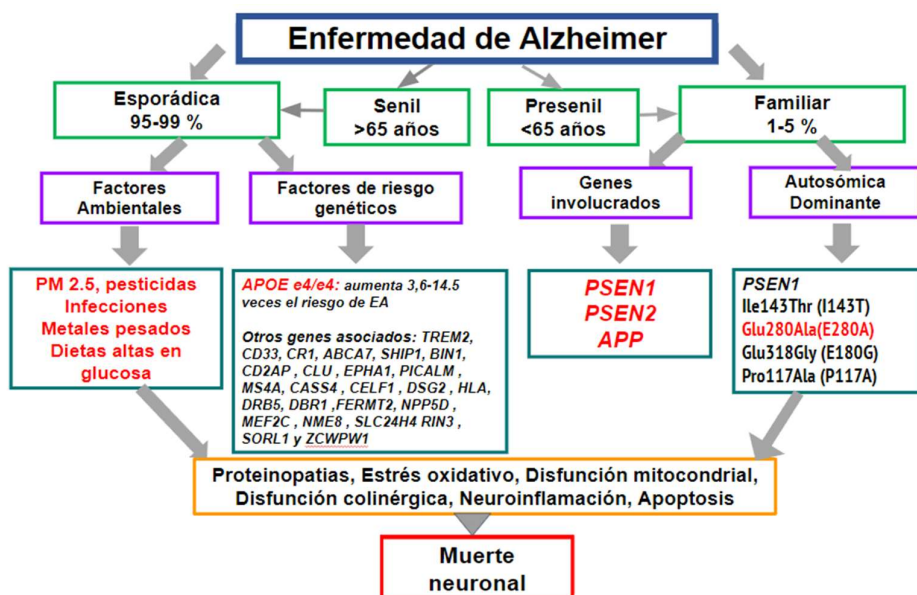


Figura 2. Clasificación etiológica de EA: Su clasificación se puede dar por edad de inicio en presenil (<65 años) y senil (>65), o según su etiología en EAE (de origen multifactorial donde están relacionados factores de riesgo ambientales y genéticos) y familiar (causada por mutaciones o duplicaciones en los genes APP, preselinina 1 y preselinina 2) Información tomada de referencia (27)

1.4 Patología de la EA

La EA es considerada una proteinopatía, en la cual proteínas o péptidos tienden a la autoagregación, y causan la formación de conglomerados insolubles difíciles de eliminar (31) (fig 1), los cuales superan a los mecanismos de degradación endógenos, por lo que los dos procesos principales en el desarrollo de la enfermedad son la amiloidosis o formación de las placas seniles extracelulares por la unión de péptidos Aβ (46) y la taupatía o el ensamblaje de NTF intracelulares en las neuronas, generados por la hiperfosforilación de Tau (28, 33).

Estos agregados causan múltiples procesos patológicos como neuroinflamación, disrupción en el transporte axonal, pérdida del citoesqueleto, incremento del calcio intracelular, aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO), disfunción mitocondrial, activación glial, alteración en la transmisión de señales mediadas por neurotransmisores y apoptosis, lo que finalmente causa muerte neuronal (34-36), la cual empieza típicamente en la zona CA1 del hipocampo y migra a las zonas aledañas por medio del transporte de agregaciones proteicas en las redes neuronales (5,17,32).

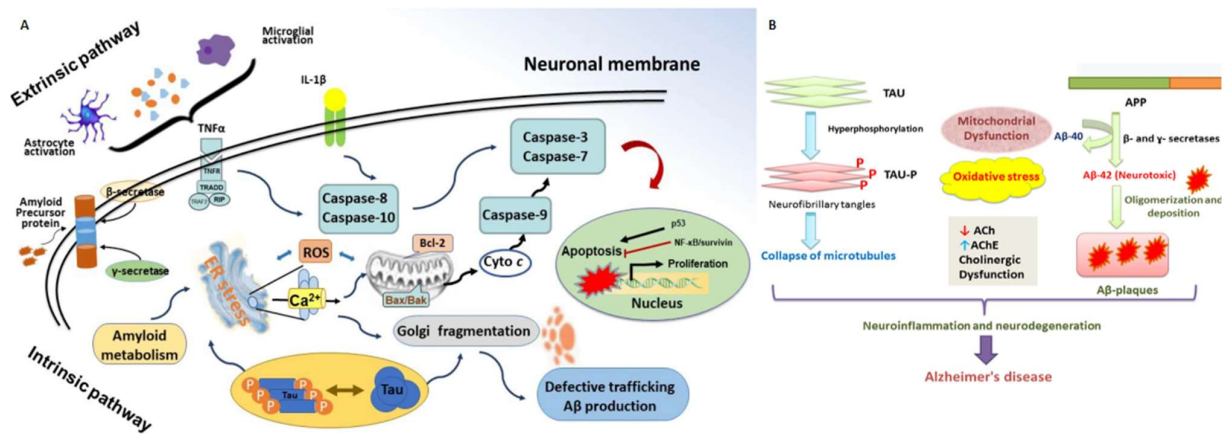


Figura 3. Mecanismos neuropatológicos implicados en la EA. (A) Mecanismos moleculares de la apoptosis en la EA. **(B)** Descripción de mecanismos neuropatológicos más importantes en la EA. Imagen tomada de referencia (34-36).

A nivel macroscópico los cerebros presentan dilatación ventricular, pérdida de volumen encefálico y atrofia marcada a nivel cortical, principalmente en hipocampo, lóbulo temporal y parietal en etapas tempranas de la enfermedad, afectando zonas subcorticales en etapas tardías (fig 4), (6,31). Fisiopatológicamente, este trastorno presenta múltiples marcadores patognomónico como s: 1) Amiloidosis, 2) Taupatía, 3) Disrupción sináptica, 4) Neuroinflamación, 5) Neurodegeneración, 6) Desregulación de la homeostasis del calcio, 7) Disfunción colinérgica, 8) Estrés oxidativo, 9) Disfunción mitocondrial y 9) Apoptosis(35,36).(fig 3) Los cuales se asocian con las alteraciones neurológicas en la EA.

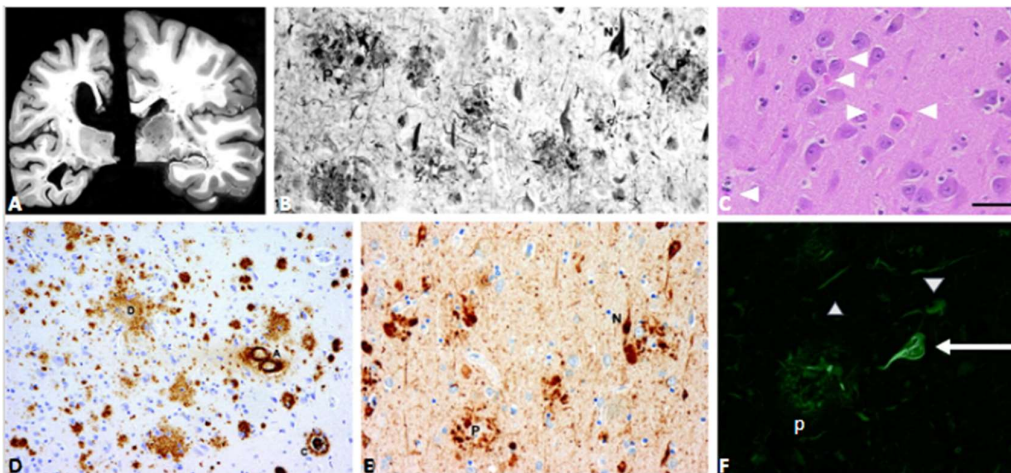


Figura 4. Hallazgos neuropatológicos en la EA: (A) Cerebro de un paciente de 70 años con EA (izquierda) vs cerebro control (derecha). El cerebro con EA muestra atrofia neuronal marcada, dilatación del ventrículo lateral y un hipocampo disminuido. (B) Tinción de Bielschowsky en el hipocampo a 40x, se observan ovillos neurofibrilares (N) y placas neuríticas (P). (C) Secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina a 40X se observa degeneración granulovacuolar o cuerpos de hirano (puntas de flecha). (D) Inmunohistoquímica de lóbulo frontal. Se evidencia la presencia de ovillos neurofibrilares (N) y placas seniles (P). (E) Inmunohistoquímica para β -amiloide en el hipocampo a 40x, se observa la formación de placas difusas (D), Compactas (C) y angiopatía amiloide cerebral (A). (F) Tinción de tioflavina S 100x con presencia de ovillos neurofibrilares maduros (flecha) y algunos NFT inmaduros (puntas de flecha) junto con placas de amiloide (p). Modificado de ref (5)

1.4.1 Amiloidosis y EA

Una de las características patológicas más relevantes en la EA es la amiloidosis, esta se produce por la acumulación intra y extracelular del péptido $A\beta$, el cual es un producto de la escisión de la APP (Amyloid Precursor Protein o APP) (31,37) cuya función está relacionada con la formación de sinapsis, plasticidad neural, exportación de hierro y neuroprotección en el envejecimiento, por lo cual se expresa en varios tipos celulares, incluyendo las neuronas. Esta es una proteína transmembrana de paso único tipo I con un gran dominio extracelular

amino terminal y una cola citoplasmática corta carboxilo terminal, que luego de modificaciones postraduccionales como la glicosilación, es empaquetada en vesículas de transporte e insertada en la membrana celular, en donde ocurre su fisión (38).

La escisión de APP se puede dar por 2 rutas que compiten antagónicamente por realizar el corte en la zona carboxilo terminal de la proteína. En la ruta no amiloidogénica que es la más prevalente, el primer corte es realizado por la proteasa α -secretasa en la zona extracelular y el segundo corte es realizado por la γ -secretasa en la cola carboxilo terminal, generando 3 péptidos: sAPP α , implicado en señalización de notch, p3 y AICD (33, 38, 44) que serán degradados en vesículas lisosomales.

Sin embargo el 10% de las veces el APP es procesada en la vía amiloidogénica, por las enzimas β -secretasa (BACE-1) que realiza un corte más cercano al extremo n-terminal y la γ -secretasa, generando como productos de escisión sAPP β , A β y AICD, (33,36,38,39,44)(fig 5), de los cuales el A β tiene tendencia a la autoagregación por el alto número de estructuras terciarias en su región c-terminal (39) y cuyo tamaño puede oscilar entre los 37 y 49 aminoácidos (31,39), siendo las isoformas de 40 y 42 aminoácidos (A β ₄₀ y A β ₄₂ respectivamente) las más asociadas con la EA. Esta última se considera la más tóxica al ser más insoluble y formar más agregados peptídicos, siendo la más prevalente en las PS (31,39). El A β presenta 3 formas de agregación: monómeros solubles, oligómeros con una alta toxicidad neuronal por formación de poros en la membrana y fibrillas amiloides, que se aglomeran extracelularmente generando las placas seniles laxas o compactas (40). Estas últimas son el marcador histológico más característico de la EA, las cuales son causadas por la asociación de fibrillas de A β con neuritas distróficas.

En la actualidad, la Hipótesis de la cascada amiloide es la teoría más estudiada. La agregación de A β ₄₀ /A β ₄₂ está relacionada con los demás mecanismos patológicos en EA (41). Su aglomeración provoca la alteración de la homeostasis de calcio por su interacción con los receptores NMDAR y AMPAR derivando en excitotoxicidad por glutamato, también se relaciona con el desacoplamiento de los microtúbulos por unión a la proteína tau o por la activación de quinasas como GSK3 β y CDK5 que causan su hiperfosforilación, alterando el tráfico vesicular hacia la zona presináptica, la expresión de neurotransmisores y canales iónicos, y el mantenimiento de las dendritas y axones, terminando en una disfunción sináptica(42,43). Los oligómeros tienden a formar uniones con los complejos I, III y IV de la mitocondria, impidiendo el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones e induciendo la disfunción mitocondrial, conllevando una disminución del metabolismo, así

mismo este péptido forma enlaces con metales pesados con electrones desacoplados como el cadmio, hierro y cobre, causando la formación de H_2O_2 y ERO y un aumento del estrés oxidativo mitocondrial (42). Los oligómeros de este péptido también forman poros citotóxicos en la membrana mitocondrial y celular, causando apoptosis y necrosis neuronal (55). Otro mecanismo de daño es la producción de factores de daño neuronal y citoquinas proinflamatorias, provocando activación glial y neuroinflamación (29,30). Este péptido también disminuye la concentración de acetilcolina por inhibición de las enzimas VACHT y ChAT y por el bloqueo del receptor nicotínico del neurotransmisor (57), así mismo las placas seniles causan lesiones mecánicas en el SNC y en la barrera hematoencefálica (BHE) (43), lo que contribuye al deterioro de las funciones neuronales causando finalmente la muerte neuronal.

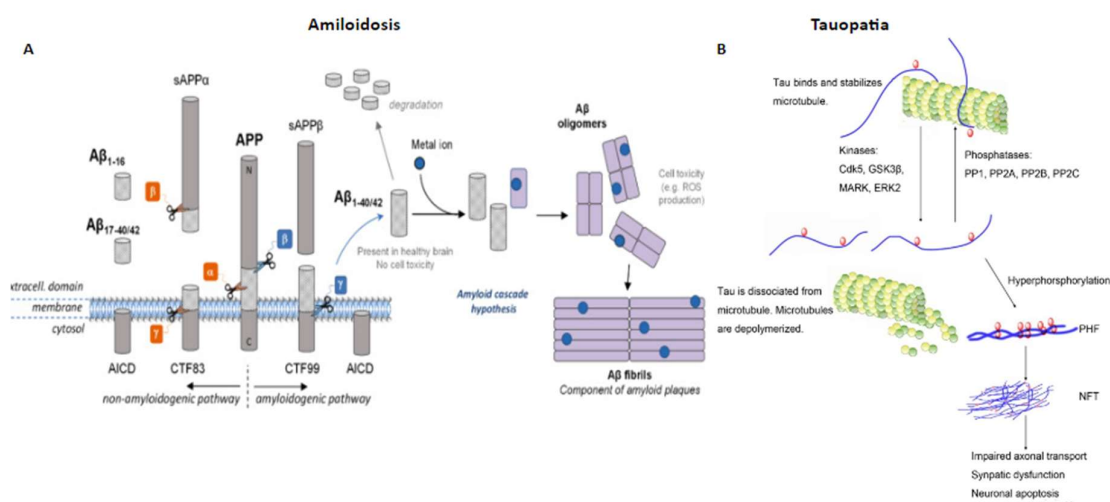


Figura 5. Formación de placas seniles y NFT en la EA. (A) Procesamiento de la APP, en la cual la escisión de la proteína por la vía amiloidogénica genera producción del péptido Aβ 40-42, el cual tiende a la autoagregación formando oligómeros y fibrillas de Aβ. (B) Formación de NFT por hiperfosforilación de Tau mediado activación de quinasas. Imagen tomada de referencia: (45,46)

1.4.2 Taupatía y EA

Otro de los marcadores neuropatológicos de la EA es la Taupatía, causada por la formación de oligómeros de Tau, debido al incremento en su fosforilación. Como tal, Tau es una proteína de asociación a microtúbulos (Microtubule-associated protein o MAP), que se expresa principalmente en neuronas y está implicada en el ensamblaje de monómeros de tubulina, permitiendo la estabilización de los microtúbulos y el transporte vesicular en las neuronas (46,47), y para su funcionamiento es necesaria su fosforilación en residuos de

serina y treonina. Sin embargo, en la EA, sufre una hiperfosforilación por la sobreactivación de quinasas como Cdk5 y GSK3b (48), cuya función está incrementada por su interacción con la β -secretasa. Adicionalmente las quinasas activadas por estrés (SAPKs) también aumentan la fosforilación de Tau en respuesta a la neuroinflamación y el estrés oxidativo (46,48), esto disminuye la afinidad de la proteína por los microtúbulos, y favorece la unión entre monómeros, formando los Filamentos Helicoidales Pareados (PHF), los cuales al unirse dan paso a los ovillos neurofibrilares (NFT) (fig 5) (49). Estos últimos son citotóxicos y desencadenan alteraciones en el transporte axonal por daño en la red de microtúbulos, degeneración retrógrada, disfunción sináptica, alteración en la expresión de neurotransmisores y pérdida neuronal (33,49). Así mismo los NFT producen citotoxicidad mecánica, aumento de ERO, alteraciones en la transmisión axonal y pérdida de espinas dendríticas por daño en el citoesqueleto. Secundariamente, en respuesta a la muerte celular y agregación de compuestos neurotóxicos se crea un ambiente inflamatorio por emisión de factores de daño neuronal que causa la activación de microglia y astrocitos, así como la liberación de moléculas pro inflamatorias como citoquinas, quimioquinas y ERO (46,47-49). Adicionalmente, la taupatía se encuentra en etapas muy tempranas de la patología y el deterioro de las funciones cognitivas en la EA se correlaciona fuertemente con la cantidad de NFT de proteína Tau hiperfosforilada (46,49).

1.4.3 Disfunción sináptica y EA

La disfunción sináptica consiste en alteraciones cuantitativas, morfológicas y funcionales en las dendritas y el axón de las neuronas, impidiendo una adecuada transmisión del impulso nervioso, lo cual es producido por alteraciones del citoesqueleto y de los sistemas de neurotransmisión (48), como consecuencia de la disrupción de los microtúbulos, lo que genera alteraciones en el transporte de vesículas presinápticas, reduciendo el envío de los neurotransmisores al botón sináptico, además de disminuir la plasticidad neuronal por pérdida de espinas dendríticas y por cambios morfológicos en las mismas, al disminuirse las espinas tipo mushroom asociadas a plasticidad y aumentarse las tipo filopodio inmaduras (50). Adicionalmente los oligómeros de A β incrementan la concentración de glutamato y disminuyen la concentración de neurotransmisores como acetilcolina y GABA (48,50,51,52), lo cual causa pérdida de grupos neuronales, causando afectación de las funciones cognitivas como la memoria y el razonamiento.

1.4.4 Neuroinflamación y EA

La Neuroinflamación describe diversos fenómenos inmunológicos que ocurren en el SNC. Estos incluyen: desde infiltración de linfocitos, migración de células inmunes al cerebro por daño de la BHE, cambios morfológicos en las células gliales como astrocitos y microglia, que constituyen un perfil proinflamatorio, hasta el aumento de producción de moléculas solubles inmunológicas inductoras de vías de señalización inflamatoria y de daño celular como las citoquinas, ERO y ERN (53,54). Este proceso puede ser desencadenado por diversos factores como hipoxia, infecciones, traumatismos, isquemia, enfermedades autoinmunes, proteinopatías, consumo de metales pesados, etc. Estos fenómenos producen un desequilibrio homeostático en el tejido cerebral y deriva en muerte neuronal (40).

En la EA, la neuroinflamación es derivada de un cambio de los astrocitos y la microglia por la presencia de agregados proteicos a un perfil proinflamatorio A1 y M1 respectivamente, en el cual estas células gliales responden al daño neuronal produciendo moléculas inductoras de inflamación como los interferones TNF- α o la citoquina IL-1 β con el fin de reparar el daño celular (40). Estas señales inflamatorias incrementan la producción de ERO, citoquinas proinflamatorias y la migración de linfocitos al cerebro. Adicionalmente al ser insuficiente la fagocitosis del A β por parte de la glía en el aclaramiento de la PS, se da una inflamación crónica de bajo grado que causa a largo plazo muerte neuronal (40,53,54), debido a que los oligómeros de A β generan cambios fenotípicos en la microglia y los astrocitos, al unirse y activar diversos receptores, como los receptores acoplados a la proteína G, CD36, FPR2, CMKLR1 y receptores tipo toll como TLR2 / TLR4, lo que activa vías de producción de citoquinas proinflamatorias (41,52). Adicionalmente, la disfunción neuronal causada por la acumulación de NFT y oligómeros intracelulares de A β , causa pérdida del $\Delta\Psi_m$, aumento de ERO, estrés oxidativo y disfunción sináptica, llevando a la producción de factores de daño neuronal como ATP, ERO y CX3CL1, lo que causa activación glial. Se ha observado que la microglia y los astrocitos fagocitan el A β extracelular en un intento de degradarlo, virando a un perfil proinflamatorio M1 y A1 respectivamente, en los astrocitos esta fagocitosis produce citoquinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α y activa la vía NF- κ B (53,55), lo que resulta en el aumento de la liberación de proteínas de la vía del complemento, que a su vez actúa sobre los receptores C3a en neuronas y microglia, provocando disfunción neuronal y activación microglial, mientras que en la microglía induce la producción de las citoquinas inflamatorias IL-1 α , TNF- α , así como

la proteína del sistema de complemento C1q y aumenta la formación de ERO , causando astrogliosis y alteraciones neuronales. Esta retroalimentación entre los 3 tipos celulares amplifica la respuesta causando una inflamación crónica de bajo grado que activa vías quinasas que hiperfosforilan a Tau y causan a largo plazo procesos de degeneración (48,50-54).

1.4.5 Desregulación de la homeostasis del calcio y EA

Como parte del proceso de transmisión de señales nerviosas por medios potenciales iónicos excitatorios e inhibitorios, las neuronas inducen fluctuaciones temporales de calcio, las cuales dependen de la entrada intracelular del ion a través de los canales ionotrópicos de Ca^{2+} y la liberación del mismo de compartimientos intracelulares. Esto produce un aumento en los niveles de calcio (52), debido que una alta concentración intracelular de calcio es excitotóxica, las células poseen mecanismos que regulan su concentración hasta su estado de reposo, como proteínas quelantes de calcio, organelos de secuestro de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y las mitocondrias, y las bombas de Ca^{2+} impulsadas por ATP y el intercambiador Na^+ / Ca^{2+} , sin embargo las proteinopatias causan un incremento crónico del calcio intracelular y un fallo de las vías de señalización mediada por el ion como las calmodulinas, sobrepasando los mecanismos de regulación celular (52,56,57), este fenómeno se conoce como desregulación de la homeostasis del calcio.

En la EA los resultados indican que el $A\beta$ puede unirse al transportador de glutamato GLT1 que controla la concentración extracelular de este neurotransmisor, bloqueando e incrementando su concentración extracelular. Este péptido también puede asociarse con los receptores NMDA activados por glutamato, que permiten la entrada de calcio, lo que incrementa la concentración del glutamato, además del calcio intracelular. El exceso de glutamato a su vez se une a los receptores NMDA, mGluR1 y mGluR5 (que inducen la salida de Ca del retículo endoplásmico al citoplasma) (51,55). Esto causa un exceso de calcio intracelular, que deriva en activación de quinasas dependientes de calcio que hiperfosforilan a Tau, así como pérdida del potencial de acción y activación de vías apoptóticas. Este fenómeno se conoce como excitotoxicidad por glutamato (51). En la EA también se ha hallado una disminución en la producción del Ácido gamma-aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio, y en la expresión de sus receptores, causando degeneración de los grupos neuronales GABAérgicos, desbalance entre la excitación/inhibición neuronal y pérdida de la potenciación a largo plazo (LTP) asociada con la memoria y las sinapsis neuronales (52).

1.4.6 Disfunción colinérgica y EA

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor clave en las funciones cognitivas humanas, implicado en la memoria y el aprendizaje. Su síntesis se produce a partir de la unión de Acetil-Coa y colina mediado por la enzima ChAT, posteriormente la enzima acetiltransferasa de colina transporta en vesículas la ACh hasta la zona presináptica para su uso como neurotransmisor, el cual activa los receptores muscarínico y nicotínico. Para evitar el síndrome colinérgico producido por un sobreestímulo de estos receptores en la zona postsináptica neuronal, existen proteínas como acetil y butirilcolinesterasa que degradan la ACh en sus componentes primarios. Sin embargo, en la EA se evidencia una reducción en la producción de acetilcolina y una pérdida de funcionalidad de las neuronas colinérgicas, lo que se conoce como disfunción colinérgica (29,44).

En estudios recientes se observó que la actividad del complejo colina acetiltransferasa (ChAT) y piruvato deshidrogenasa (PDH), enzimas clave en la síntesis de ACh, están disminuidas, mientras que la acetilcolinesterasa (AChE) encargada de la degradación de ACh está aumentada, lo que crea bajos niveles de ACh en el cerebro, afectando principalmente el hipocampo. Otro hallazgo interesante en la EA es una disminución de la transmisión colinérgica por alteraciones en el funcionamiento de los receptores muscarínicos, principalmente el subtipo M1. También se ha observado un menor número de receptores nicotínicos, por los que el A β tiene una alta afinidad, uniéndose e impidiendo la interacción con su ligando, creando una disminución funcional de estos receptores. Esto hace que las neuronas colinérgicas sean el primer grupo neuronal en sufrir degeneración, amplificando la disfunción neuronal (29, 33, 44,48).

1.4.7 Estrés oxidativo y EA

Como parte del metabolismo aerobio para la producción de ATP en las células, las mitocondrias usan oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones (CTE), debido a que el oxígeno es altamente electronegativo y necesita captar 2 electrones para completar la ley del octeto, tiende a unirse a átomos cercanos y a secuestrar electrones, lo que causa la formación de especies reactivas de oxígeno EROs. Otro elemento que comparte estas características es el nitrógeno, formando las especies reactivas del nitrógeno (ERN). Las EROs y ERNs se caracterizan por ser moléculas

electrofilicas de bajo peso molecular con una alta reactividad en las cuales hay al menos un electrón desapareado, por lo que buscan obtener un electrón de otras moléculas para alcanzar su estabilidad electrónica (58). Endógenamente las ERO se producen por procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa en la mitocondria, en la cual el 1%-2% de oxígeno usado se transforma en radicales libres y su función es la de moléculas señalizadoras de proceso de inflamación, vasodilatación y segundos mensajeros de la señalización celular (58,59). Entre las ERO producidas, los más prevalentes y tóxicos son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico ($NO\cdot$) y el peroxinitrito ($ONOO$) (60). Estos radicales libres también pueden adquirirse por fuentes exógenas en moléculas inorgánicas como metales pesados, radiación ionizante y pesticidas, los cuales ingresan al cuerpo por medio de la respiración, la ingesta o el contacto cutáneo. Estas especies reactivas captan los electrones de moléculas circundantes generando peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y del ADN, pudiendo ocasionar la muerte celular (61).

Para combatir los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ERO), nitrógeno (ERN) y de metales pesados, las células tienen un sistema de respuesta antioxidante (62) que produce moléculas antioxidantes nucleofílicas endógenas con potencial redox como el tripéptido glutatión (GSH), que neutralizan las ERO y ERN. Así mismo, el incremento de especies reactivas activa las vías ARE/NRF2 que son factores de transcripción para la expresión de enzimas que transforman las ERO en moléculas de H_2O como la Catalasa, superóxido dismutasa, Glutatión peroxidasa (GPX), Tioeredoxinas (TRX) y Peroxiredoxinas (PRDX) (63). Este sistema mantiene la homeostasis entre moléculas prooxidantes y antioxidantes dentro de la célula. Adicionalmente, el consumo de moléculas antioxidantes como flavonoides o lípidos insaturados, facilitan el mantenimiento de un ambiente antioxidante en la célula (50). El estrés oxidativo se define como la pérdida de la homeostasis entre la producción de agentes prooxidantes, principalmente EROs, la cual aumenta y la capacidad de los sistemas antioxidantes celulares de regular la concentración de EROs y ERNs, volviéndose ineficientes, lo que genera un ambiente oxidante a nivel celular que causa alteraciones en macromoléculas como lípidos, proteínas y nucleótidos (49) (fig 6).

La Hipótesis del estrés oxidativo como mecanismo patológico en la EA ha cobrado fuerza en los últimos años, pues existen múltiples pruebas que asocian el aumento del estrés

oxidativo y la neurodegeneración en EA. La neuroinflamación derivada de la proteinopatía causa activación glial, la cual produce ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN) como mecanismo de respuesta (58,64), lo que activa la vía de las JNK y las MAPK asociadas al estrés y que aumentan la fosforilación de Tau (58). Los estudios también han demostrado que el Aβ 25-35 produce por sí solo H₂O₂ y EROs (65) y además puede unirse a metales pesados formando complejos con Cu¹⁺ o Fe²⁺, provocando EO al inducir la producción de radicales libres (42) que interactúan con moléculas biológicas causando su oxidación y disfunción. En los cerebros de pacientes con EA esto aumenta la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ADN, mientras disminuye los ácidos insaturados (55,61), lo que tiene efectos citotóxicos, genotóxicos e inflamatorios al causar pérdida del potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ_m), la producción de factores de daño neuronal, la formación de mutaciones y la disfunción proteica. El incremento del EO también se relaciona con una disminución de la eficiencia en la CTE, provocando la disminución de la producción de ATP que motiva la activación de vías apoptóticas (figura 6) (67,54), lo que demuestra el papel protagónico de la hipótesis del EO en la fisiopatología de la EA (65).

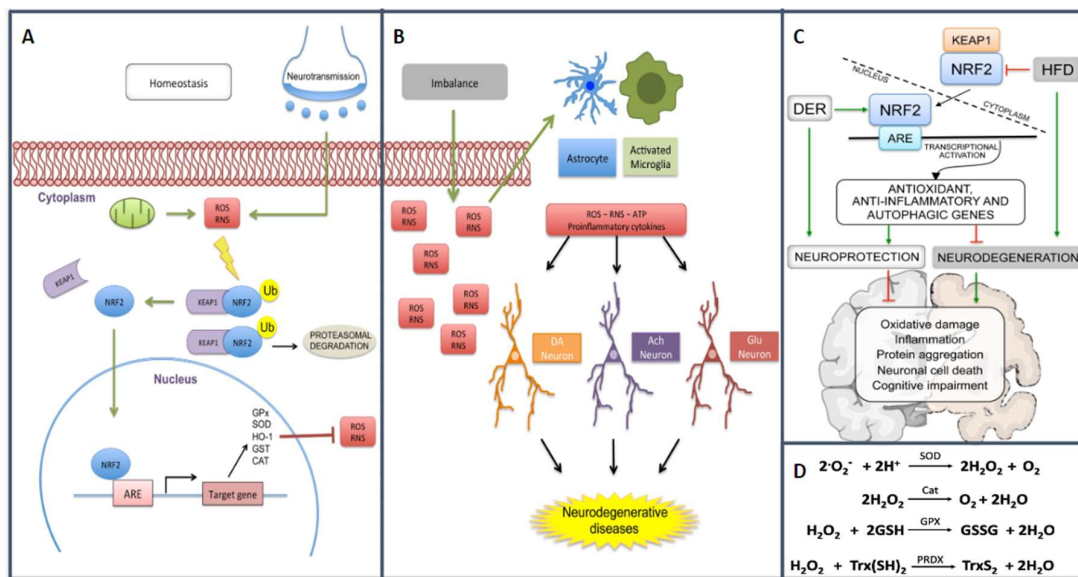


Figura 6. Estrés oxidativo en la EA. (A) Activación de la vía ARE/NRF2 por ERO y ERN que desencadena la expresión de elementos de respuesta antioxidante como GSH, SOD y Catalasa. **(B)** EO, exceso de EROs y ERNs que sobrepasan la capacidad antioxidante de la célula, lo que desencadena procesos de muerte neuronal. **(C)** Papel del factor de transcripción NRF2 en el estrés oxidativo. **(D)** Papel de las moléculas antioxidantes endógenas en la transformación de las especies reactivas de oxígeno a moléculas de agua. Imágenes tomadas de ref: (62,63)

1.4.8 Disfunción mitocondrial y EA

La mitocondria es una organela que se encarga de la generación de energía en la célula, mediante la producción de ATP a través del proceso de la respiración celular. Esto es especialmente importante en el cerebro, que por su alto metabolismo energético consume 1/5 del oxígeno y la glucosa ingerida (66). El proceso de producción de ATP en entornos aerobios no fotosintéticos implica 3 vías metabólicas: el catabolismo de macromoléculas, como la glucólisis, la β -oxidación o el ciclo del ácido cítrico, la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa (OXPHOS). La CTE está ubicada en la membrana interna mitocondrial y está conformada por cuatro complejos enzimáticos (I, II, III y IV), en los cuales los complejos I, III y IV operan como bombas de protones para los iones obtenidos del donador de electrones NADH. Mientras que el complejo II transfiere los electrones captados de FADH₂ a la ubiquinona, siendo la Ubiquinona y el citocromo C transportadores de electrones entre los complejos. Posteriormente el complejo IV aparea los 4 electrones del citocromo C con protones de hidrógeno y el aceptor de electrones oxígeno para reducir el oxígeno molecular (O₂) a agua (H₂O), evitando la formación de ERO y la presencia de electrones desapareados (67). Finalmente se da el proceso de OXPHOS mediado por la ATP sintasa que transforma el gradiente de protones en trabajo mecánico, funcionando como una turbina. La diferencia de concentración de hidrogeniones entre los compartimentos mitocondriales los obliga a pasar a través de esta enzima para llegar a la matriz mitocondrial, esto genera un movimiento rotatorio en la proteína que le permite obtener la energía necesaria para la síntesis de ATP, la moneda energética de la célula, a partir de ADP y grupos fosfato (67,68). En el proceso de la CTE un 1%-2% del oxígeno es apareado prematuramente con electrones antes de llegar al complejo IV, lo que forma radicales libres como el Anión superóxido, por lo que la producción de EROs se da de forma constitutiva en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) para la producción de ATP. Sin embargo, en caso de que haya alteraciones en las moléculas implicadas en la CTE causaría un aumento de la formación de EROs por desacoplamiento electrónico prematuro, causando una disfunción mitocondrial (68,69).

Investigaciones sobre la patogénesis de la EA encontraron que el A β y sus complejos con metales ingresan a la mitocondria por el traslocador TOM y pueden interactuar con los complejos I, III y IV y V, inhibiendo la CTE (74) y generando un aumento en la producción de EROs (70,71), lo que aumenta el EO, genera disfunción mitocondrial, disminuye el $\Delta\psi_m$

y altera la producción de ATP (65,72), estos eventos producen la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (72). Asimismo, se ha postulado que dentro de la mitocondria el A β se une a la enzima alcohol deshidrogenasa, inhibiendo la detoxificación de aldehídos y promoviendo un ambiente oxidante (73). El aumento intracelular de calcio causado por la interacción de A β con receptores ionotrópicos provoca un exceso de calcio en la matriz mitocondrial que activa la proteína ciclofilina D CypD (75), la cual crea poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) (89) que causa la salida del Citocromo C, induciendo muerte celular.

En respuesta a la disfunción mitocondrial, la célula activa la vía de respuesta proteica desplegada mitocondrial (UPR mt), mediada por los factores de transcripción ATF5, SIRT3 y DAF-16 los cuales aumentan la expresión de chaperonas y proteasas mitocondriales, así como de elementos de respuesta antioxidantes para restablecer la homeostasis mitocondrial. En EA sin embargo la vía UPR mt se activa persistentemente, lo que afecta la proteostasis de las mitocondrias, activa vías apoptóticas y afecta la viabilidad neuronal (76). También se ha hallado que la EA aumenta los procesos de fisión mitocondrial al aumentar la expresión de DRP1 y así mismo reduce la proteína de fusión MFN1, reduciendo la biogénesis mitocondrial y exacerbando la disfunción (77). Por lo que se puede concluir que la disfunción mitocondrial es uno de los principales mecanismos causales de la EA al correlacionarse con otras vías patológicas y causar en última instancia la pérdida de la supervivencia neuronal (78).

1.4.9 Apoptosis y EA

Finalmente la neurodegeneración es otro de los marcadores de este trastorno, la cual se observa como atrofia cerebral y es causada por la muerte neuronal en las zonas corticales y subcorticales, siendo la consecuencia de los demás procesos patológicos como la formación de poros en la membrana celular por oligómeros de A β , daños en el axón, neuroinflamación, oxidación de macromoléculas, alteraciones en las vías transporte neuronal, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial e incremento intracelular del calcio, lo que lleva a la activación de vías apoptóticas (28,33). La apoptosis es un tipo de muerte celular programada genéticamente que permite la destrucción controlada de células que presentan daños irreparables, evitando la activación de procesos inflamatorios.

Este tipo de muerte celular se puede dividir en 2 tipos según la clase de estímulo recibido. En la apoptosis extrínseca la activación de la vía se da por la unión de ligandos de muerte a los de receptor TNF/Fas, los cuales liberan la proteasa FADD que escinde caspasa 8 y 10, las cuales pueden escindir las caspasas ejecutoras 3 y 7 para iniciar el proceso de apoptosis. Adicionalmente casp8 puede trincar la proteína BID, tBID induce permeabilidad mitocondrial al formar poros y activar BAX y BAK, lo que indica la vía intrínseca o mitocondrial. En esta vía juegan un rol importante las proteínas de la familia BCL-2, las proteínas BCL-2 BCL-XL son antiapoptóticas y están unidas en la membrana mitocondrial externa a las proteínas proapoptóticas BAX y BAD, esta unión se mantiene mientras haya ATP, cuando hay una disfunción en la mitocondria disminuye su producción, lo que causa la separación del complejo, permitiendo a BAX y BAD formar poros mitocondriales que permiten la salida del citocromo c, el cual forma un complejo con el factor activador de proteasa (Apaf-1) llamado apoptosoma, escindiendo la procaspasa 9 a caspasa 9, la cual activa las caspasas ejecutoras 3 y 7 que son aspartil proteasas por medio de su fisión. Estas enzimas tienen función nucleasa, condensando la cromatina, fraccionando el ADN e induciendo la formación de cuerpos apoptóticos. (79,80) (fig. 7)

Estudios recientes han demostrado que el incremento del estrés oxidativo genera la oxidación de chaperonas sensoras de ERO como DJ-1 o PARK7, la disminución de la producción de ATP, y el aumento de la disfunción y fisión mitocondrial, estos procesos pueden activar vías apoptóticas como la vía intrínseca Bax/Bcl-2 con la salida del citocromo c al citoplasma o la vía extrínseca de la JNK, activando la expresión de factores de transcripción como p53 y la cascada de caspasas, finalizando en la apoptosis neuronal (fig 7) (64,41,81), esto ha permitido proponer un posible mecanismo de señalización inducido por el βA_{25-35} , el cual solo o en unión con Fe^{2+} causa disfunciones en la CTE causando un aumento en la producción de H_2O_2 (95), el cual activa vías de señalización proapoptóticas como ASK-1, JNK, c-JUN, P53 y PUMA, las cuales inducen la activación de la vía intrínseca de la apoptosis y la escisión de caspasas ejecutoras como CASP3, produciendo una muerte celular apoptótica(80,81).

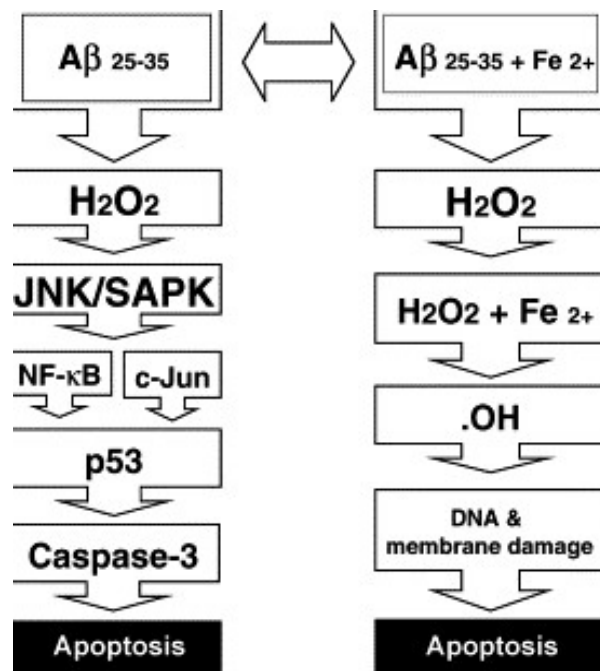


Figura 7. Vías de señalización que desencadenan la apoptosis en la EA. Se observa el papel clave del Aβ en la formación de H₂O₂, y como el estrés oxidativo activa vías apoptóticas que aumentan la expresión de factores de transcripción como c-Jun y P53 que finalmente derivan en apoptosis. Imagen tomada de ref (81).

1.5. Factores de riesgo y ambientales en la EA

Se han encontrado diferentes factores que están relacionados con el incremento de la prevalencia de la EAE de inicio tardío, cuya etiología es multifactorial (fig 8). Entre los factores de riesgo intrínsecos, el más relevante es la edad, duplicándose la prevalencia cada cinco años a partir de los 65 años (7). Otros grupos poblacionales con mayor riesgo son las mujeres (13,15), los hispanos y los afroamericanos, (83). En algunos estudios se ha descrito la influencia de condicionantes sociales como bajo nivel educativo, pocas actividades sociales y poca actividad física (84, 85, 86), con un incremento en la incidencia, lo cual está asociado a una reserva cognitiva disminuida. También se halló una relación entre el desarrollo del trastorno y la obesidad, el insomnio, la diabetes tipo 2, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, el consumo de cigarrillo (15,83,85), el daño cerebral traumático (85,86), el consumo de alcohol, de alimentos ricos en colesterol o de ácidos grasos saturados (83-87), los cuales están relacionados con neuroinflamación de bajo grado, disminución en el aclaramiento del Aβ por medio de las vías linfáticas, daños en la barrera hematoencefálica, e incremento de ERO, lo que aumenta la hiperfosforilación de Tau y la acumulación del Aβ. Otro factor asociado al aumento de la incidencia es la infección con microorganismos que infectan el SNC, como los virus de la familia Herpesviridae, o las bacterias *Chlamydia pneumoniae* y *Porphyromonas gingivalis* (88), los

cuales aumentan la permeabilidad de la BHE, la producción de ERO y Aβ en el SNC, como mecanismo de defensa a la infección, lo que incrementa la formación de PS.

También existe una relación entre la exposición a factores ambientales como metales pesados y contaminación ambiental de los gases con el desarrollo de la variante esporádica de esta enfermedad (89,90). Los metales pesados como el aluminio, arsénico, cadmio, plomo y mercurio, inducen procesos de oxidación, causan desregulación de la homeostasis del calcio, incrementan la muerte neuronal y potencian la agregación de Aβ y la fosforilación de Tau, aumentando la formación de PS y NFT (86, 89), mientras que la exposición a polución ambiental con altas concentraciones de material particulado PM 2.5 o pesticidas (90) conducen a la susceptibilidad a la EA a través de mecanismos epigenéticos, neuroinflamación y aumento del estrés oxidativo (86,32).

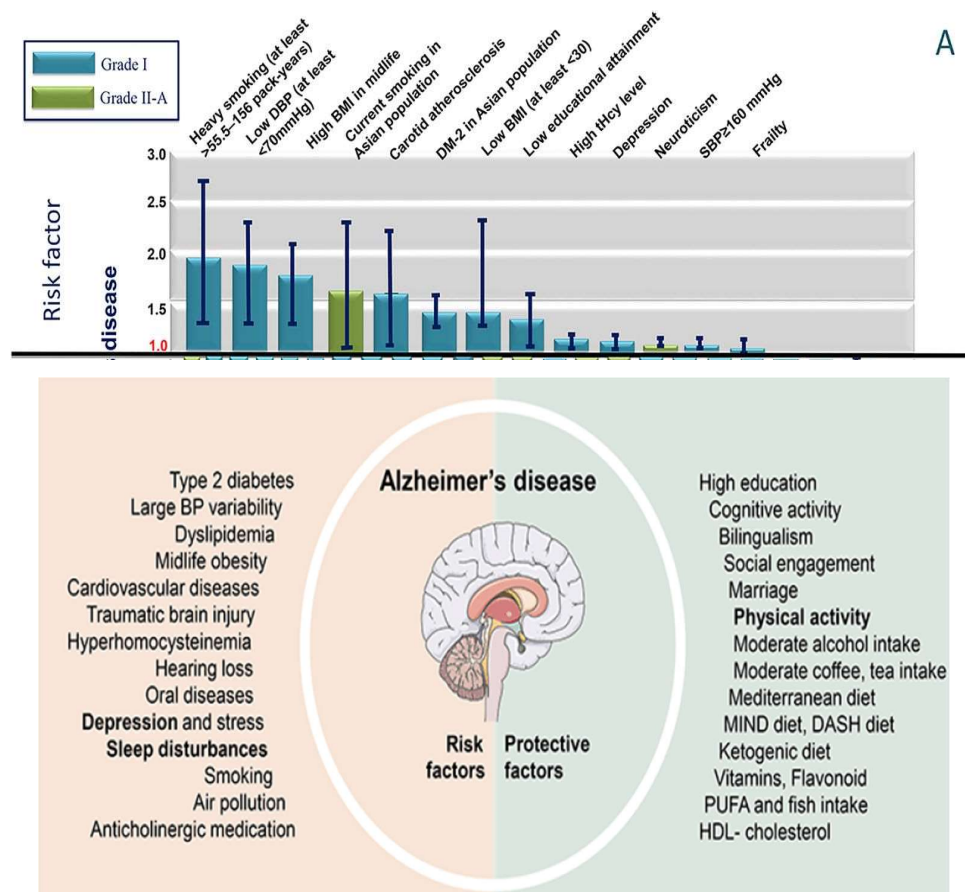


Figura 8. Factores de riesgo y modificadores del desarrollo de la EA. (A) Descripción estadística con odds ratios de la influencia del factor de riesgo en el desarrollo de EA. **(B)** Factores de riesgo epidemiológico para el desarrollo de EAE... Tomada de ref: (84,86).

1.6. Factores genéticos

1.6.1. Genes causales de EAF. *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*

Menos del 5% de los casos de EA tienen un origen genético (EAF) (24) causado por mutaciones, indels o duplicaciones en la proteína precursora amiloide (*APP* MIM #104760, cromosoma 21, 68 mutaciones), presenilina 1(36) (*PSEN1*, MIM #104311, cromosoma 14, 323 mutaciones), o en la presenilina 2 (*PSEN2*, MIM #600759, cromosoma 1, 64 mutaciones). Usualmente los síntomas clínicos se manifiestan entre la 3ra y la 6ta década de vida, (91) (fig 9) por lo que se puede clasificar como EA presenil (EOAD) y se caracteriza neuropatológicamente por el incremento en la producción de A β , al favorecerse la vía amiloidogénica que acelera la acumulación peptídica de A β 40, A β 42 y A β 43 (31,39). Esto causa la formación de oligómeros intracelulares de A β y su aglomeración en depósitos de placas seniles en todo el cerebro en edades tempranas (37,55), lo que tiene como consecuencia el incremento del estrés oxidativo, la neuroinflamación, la producción de ovillos neurofibrilares y la muerte neuronal (29).

El gen *APP* codifica la proteína precursora amiloide que es una proteína que al ser escindida por la vía amiloidogénica, produce el A β , mientras que los genes de *PSEN1* Y *PSEN2* codifican aspartil-proteasas que son el sitio catalítico del complejo proteico de las γ -secretasa (39,93), las cuales cortan la *APP* produciendo el A β (92). Más del 50% de los casos de EAF a nivel mundial se da por mutaciones en el gen de *PSEN1*, el cual está ubicado en la región 14p24.3, contiene 10 exones y codifica la proteína Presenilina 1 de 467 aminoácidos, que es el sitio activo de corte de la γ -secretasa, la cual es un complejo compuesto de 4 proteínas (nicastrina, Aph-1, PEN-2 y *PSEN1*) (92). En diversos estudios se encontró que numerosas mutaciones en *PSEN1* aumentan la proporción del ratio A β 42/A β 40, en estudios *in vitro* (98,100,101, 102) y en encéfalos post mortem (95), mientras se incrementa la presencia de oligómeros de A β en vesículas intracelulares, generando citotoxicidad.

Actualmente todas las mutaciones de EAF halladas en Colombia son autosómicas dominantes en Presenilina 1 (*PSEN1 Ile143Thr*, *PSEN1 Glu318Gly*, *PSEN1 Pro117Ala*, *PSEN1 Ile416TThr* y *PSEN1 Glu280Ala (E280A)*) (25), de éstas la E280A es la causa más frecuente y se da por una mutación de ácido glutámico a alanina en el exón 8, codón 280 del gen *PSEN1* (26). En investigaciones con pacientes E280A se ha encontrado un aumento de A β -42 en LCR y de la formación de placa senil con amiloyd PET en jóvenes portadores de la mutacion, en contraste con los no portadores. Así mismo en población

infantil con E280A, los niveles de A β 42 en plasma y los ratios A β 42 /A β 40 fueron elevados en contraste con no portadores (94,96). Un estudio en modelos neuronales colinérgicos *in vitro* mostró un aumento en la acumulación intraneuronal de fragmentos sAPP β , hiperfosforilación de tau, aumento de ERO, disfunción mitocondrial, desregulación de Calcio e incremento de la apoptosis (97,98). Estos hallazgos sugieren que las mutaciones en el gen *PSEN1* incrementan los depósitos del péptido A β , favorecen la formación de A β 42, incrementan el estrés oxidativo, causan desregulaciones metabólicas en las neuronas y muerte neuronal, siendo estos los eventos desencadenantes de la neurodegeneración en los pacientes.

1.6.2. Genes de Riesgo APOE

En el caso de la EAE también se han reportado diversos genes que son factores genéticos de riesgo para su desarrollo, el principal factor de riesgo es el alelo e4 de Apolipoproteína E (APOE), esta proteína está encargada, con otras Apolipoproteínas del transporte del colesterol y vitaminas liposolubles a través del torrente sanguíneo. A nivel cerebral APOE es secretada por astrocitos y microglia, y en las neuronas su interacción con el receptor de APOE permite la entrada y catabolismo del colesterol y ácidos poliinsaturados para el mantenimiento de las membranas neuronales y de los procesos de señalización durante las sinapsis (99), sin embargo la presencia del alelo e4 aumenta 3,6 veces la probabilidad de desarrollar el trastorno en su forma heterocigota y 14,5 veces si se presenta de manera homocigota, asociándose también a una menor edad de inicio del DCL, mientras que el alelo e2 es neuroprotector (100).

A pesar de la fuerte asociación estadística y biológica entre APOE4 y el desarrollo de EA, el mecanismo por el cual ocurre esto aún no ha sido completamente establecido. En las investigaciones realizadas sobre el papel de e4 y la patogénesis en EA, se descubrió que este alelo incrementa la agregación de A β , la formación de placas seniles compactas y la reactividad de la glía, mientras reduce la degradación del A β , el mantenimiento de las sinapsis, el transporte de lípidos, el metabolismo de la glucosa, la función mitocondrial y la integridad vascular (86,102).

Además de este gen, la mejora reciente en la tecnología de secuenciación de ADN ha permitido hallar otros genes relacionados con el desarrollo de EAE en grandes grupos poblacionales. Estos genes candidatos asociados a la EA por GWAS (61), suelen estar implicados en el metabolismo del colesterol, respuesta inmune y la endocitosis (61, 92, 101)

de los genes de riesgo asociados a vías inmunológicas está El receptor desencadenante expresado en células mieloides 2 (TREM2), el cual está presente en células inmunes como la microglia, macrófagos y los astrocitos (104) y el cual está implicado en poseer actividad antiinflamatoria. Mutaciones en este gen se han asociado con mayor riesgo de EA (105), mientras que niveles altos de esta proteína se asocian a neuroprotección (104,105).

Otro gen relacionado con el sistema inmune que aumenta la probabilidad de EA es el gen de la lectina 3 similar a la inmunoglobulina que se une al ácido siálico (CD33). Este produce una proteína de células inmunes relacionada con inmunomodulación, y en estudios previos se ha reportado que mutaciones o deleciones de este gen incrementa la microgliosis y el riesgo de EA (106). Entre los genes relacionados con la endocitosis el más relevante es el gen de la fosfolipasa D3 (PLD3), una proteína relacionada con la regulación en el sistema lisosomal, que en caso de mutaciones deriva en una falla de la degradación del A β (92,101-103) (fig 9).

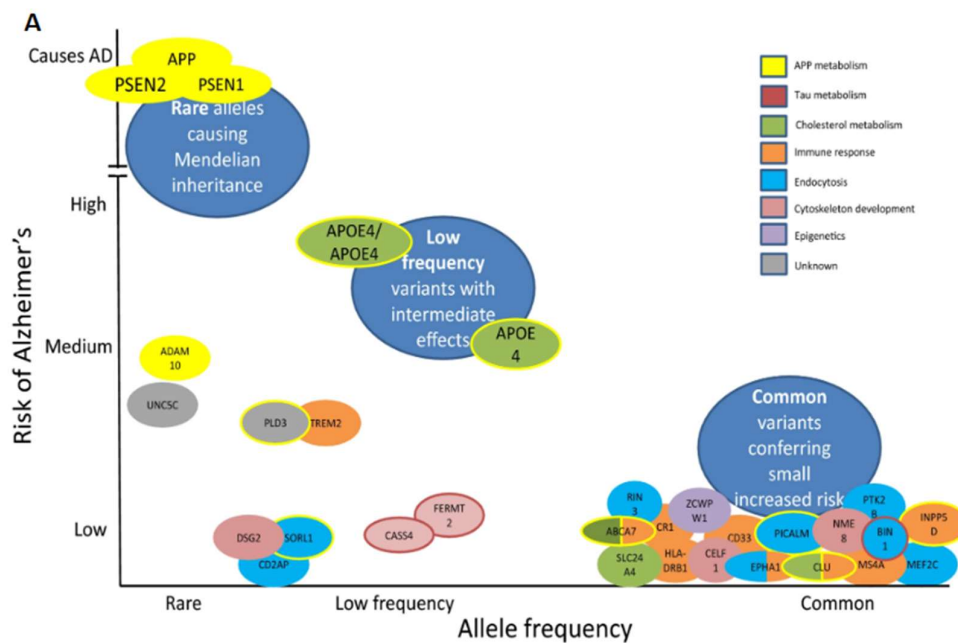


Figura 9. Genes de riesgo para el desarrollo de la EA. (A) Factores causales y de riesgo genético para el desarrollo de EA clasificados por frecuencia poblacional y participación en el desarrollo de la enfermedad. Tomada de ref: (61)

1.7. Características clínicas de la EA

La enfermedad de Alzheimer se puede dividir en 4 etapas dependiendo de la atrofia y pérdida de sinapsis neuronales: la fase preclínica, el deterioro cognitivo leve, la demencia moderada y la demencia severa (108, 109, 110). Los primeros estadios de la neurodegeneración empiezan en la corteza entorrinal, en la zona C1 (72) con la acumulación de A β y Tau, pero sin síntomas clínicos (109,110). Esta etapa puede empezar hasta 20 años antes del desarrollo de síntomas (108,111), posteriormente se da el aumento gradual de PS y NFT y la neurodegeneración se difunde a las células piramidales del hipocampo (112), por lo que la primera manifestación clínica es la disminución de la memoria a corto plazo (fig 10) (12,113).

A medida que la destrucción neuronal avanza a otras áreas cerebrales de forma cortical, se presenta un deterioro cognitivo marcado con pérdida grave de la memoria, confusión, juicio pobre, alteraciones del lenguaje, agitación, desorientación y alucinaciones (113-114). En la etapa final de la enfermedad, la atrofia se ha extendido a otras zonas cerebrales como el lóbulo frontal y occipital del paciente, perdiendo las funciones operativas y cognitivas, derivando a largo plazo en el fallecimiento del individuo (108,109). El promedio de supervivencia desde la presentación de los síntomas oscila entre 3 y 10 años, con una media de 7 años (115,111).

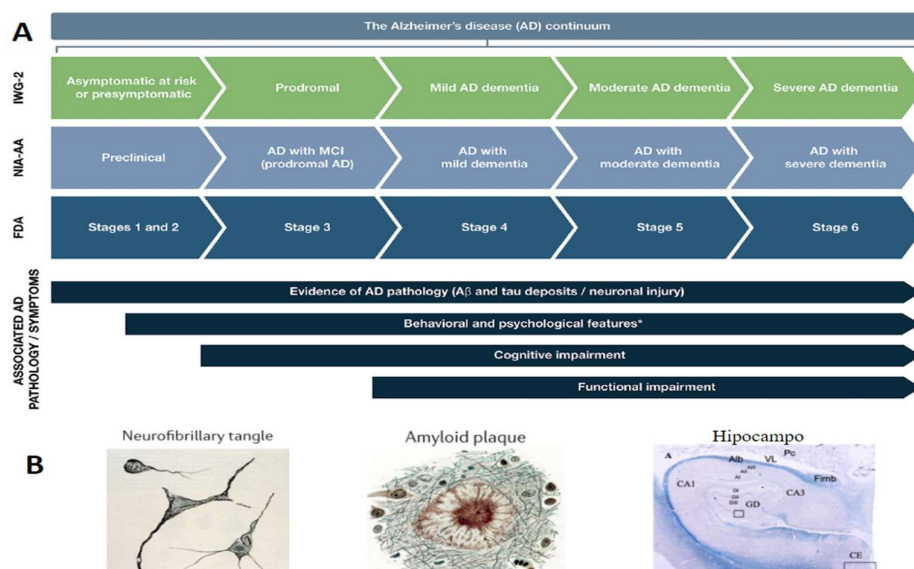


Figura 10. Las manifestaciones clínicas y su correlación con los estadios neuropatológicos de la EA. (A) Correlación entre estadios de Brack, manifestaciones sintomáticas y signos histopatológicos. **(B)** Hallazgos neuropatológicos clásicos de la EA. Imagen tomada de ref (110,111).

1.8. Diagnóstico de la EA

El diagnóstico de la EA se realiza por evaluaciones neurológicas (110). Los test neurológicos más usados para detectar el deterioro cognitivo y evaluar la progresión de las demencias son el mini mental State Examination o MMSE, el Mini-cog, el CERAD y el MoCA (fig 11) (116,117), los cuales evalúan la memoria operativa, atención, abstracción, orientación espaciotemporal y capacidad para entender y seguir instrucciones (1,116). Adicionalmente en los últimos años se han desarrollado biomarcadores que aunque no permiten diagnosticar el trastorno, ayudan a predecir el desarrollo futuro de la enfermedad. Los biomarcadores de imágenes más usados son la resonancia magnética nuclear (RMN), que evalúa la atrofia cerebral, y la tomografía por emisión de positrones para A β (Amyloid PET) y Tau (Tau PET), que permiten ver la acumulación cortical de A β y Tau en el cerebro respectivamente (117,109,118).

Los marcadores bioquímicos permiten cuantificar biomarcadores como APP 669–711, A β 40, A β 42, Tau total, y Tau fosforilada (119) en fluidos corporales como LCR, sangre y plasmas. Estos marcadores son altamente sensibles y específicos (más de 80%)(116,119) en la predicción del desarrollo de EA (fig 11). También existen pruebas genéticas para detectar mutaciones asociadas con EAF como *PSEN1*. Actualmente el gold standard para diagnóstico de EA son las técnicas histológicas en tejido cerebral postmortem, con tinciones especiales, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para A β y Tau, que evidencien los cambios neuropatológicos típicos de EA (32) como placas amiloides, ovillos neurofibrilares, astrogliosis, activación microglial, distrofia neuronal, cuerpos de hirano, angiopatía cerebral amiloide y pérdida neuronal (5).

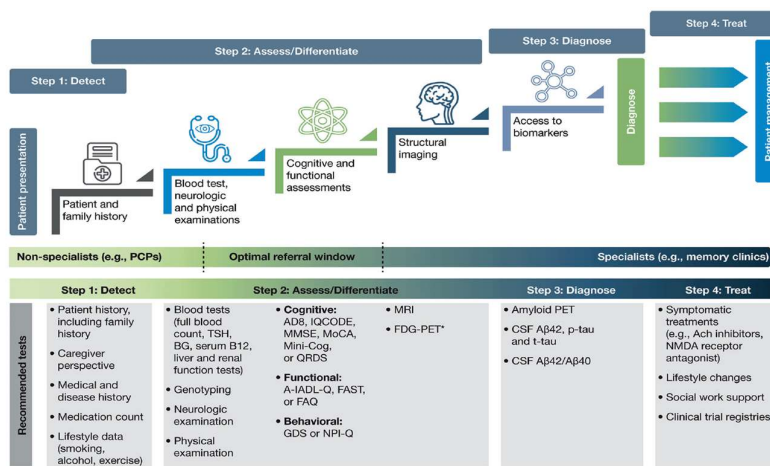


Figura 11. Métodos diagnósticos para la predicción, evaluación, diagnóstico y seguimiento de la EA.

Tomado de ref (110)

CAPÍTULO II: MODELOS Y NEUROTOXINAS PARA EL ESTUDIO DE LA EA

2. Modelos de estudio

Para poder comprender y evaluar la etiología de la EA, el curso de la enfermedad, los mecanismos fisiopatológicos de la neurodegeneración, y ensayar posibles estrategias terapéuticas, se han desarrollado modelos *in vitro* e *in vivo* que incluyen: Modelos celulares *in vitro* (120) con la mutación o característica de interés, estos pueden ser de 4 tipos, líneas celulares inmortalizadas, cultivos primarios de neuronas, astrocitos y microglia, células madre pluripotentes inducidas (iPSc) y células mesenquimales estromales (CME) transdiferenciadas (121). También se han desarrollado modelos *in vivo* (122) de animales invertebrados, zebrafish y mamíferos genéticamente modificados. Con los avances tecnológicos también se han creado modelos computacionales o *in silico*, los cuales por medio de machine learning permiten predecir el desarrollo de la enfermedad y la interacción topológica de posibles fármacos con el ligando de interés como el A β (123).

2.1. Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* son una herramienta fundamental para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, al permitir dilucidar los procesos moleculares involucrados en la etiología, identificar los eventos claves en la patogenia y evaluar el efecto bioquímico de posibles fármacos. Entre los modelos *in vitro* se encuentran: cultivos primarios derivados de tejido cerebral post mortem de pacientes, líneas celulares inmortalizadas, iPSc y CME transdiferenciadas a neuronas (121,98) (Figura 12). Estas últimas son obtenidas de cordón umbilical o sangre menstrual y sus principales ventajas son su fácil obtención y su diferenciación a múltiples linajes como astrocitos, neuronas o microglia que poseen características citogenéticas iguales entre ellas y a las del paciente (124).

Todos estos modelos en el caso de la EAF pueden ser derivadas de pacientes con la enfermedad o ser genéticamente modificadas con técnicas como CRISPR/CAS9 para introducir la mutación de interés o para crear líneas isogénicas, esto permite comparar los aspectos bioquímicos, celulares y moleculares entre células con mutaciones para EAF y las células WT (125). En diversas investigaciones se ha confirmado mayor producción de A β , pérdida del $\Delta\Psi_m$, y un aumento del ratio de A β 40/A β 42, del EO, de la concentración

intracelular de calcio y de los factores de transcripción relacionados con vías apoptóticas como -Jun, NF- κ B, p53 y Par4. En los modelos celulares con mutaciones de EAF (97,98).

Estos modelos también se usan para entender la EAE, al posibilitar la replicación de los hallazgos patológicos observados en la EA por medio de cambios en el ambiente celular, lo que permite identificar factores de riesgo, evaluar fármacos, y determinar los eventos que desencadenan la variable estudiada, como por ejemplo, la adición de A β en el medio extracelular se usa para analizar el efecto de la amiloidosis y sus consecuencias (126), el tratamiento con ácido okadaico o hipotermia se utiliza para evaluar el efecto de las taupatas (126), la adición de peróxido de hidrógeno permite el estudio de las consecuencias del estrés oxidativo, y la adición de glutamato en el sobrenadante permite investigar los mecanismos de daño de la excitotoxicidad (127).

Adicionalmente, con el fin de estudiar de forma controlada la patología de la enfermedad en modelos más aproximados a los tejidos de los pacientes, en los cuales interactúan múltiples tipos celulares por medio de redes de comunicación y retroalimentación de estímulos (como la microglia que produce factores inflamatorios que agravan las alteraciones neuronales), se han desarrollado nuevos modelos más complejos, como los cultivos 3D y organoides derivados de CME o IPSc (254,100) (fig 12), que replican de forma más precisa los eventos observados en la enfermedad, por la formación de las redes neuronales y las interacciones entre varias líneas celulares cerebrales como neuronas, astrocitos y microglia, adicionalmente en el caso de organoides, permite el estudio de alteraciones que no era posible analizar en modelos *in vitro* (254,255), como el estudio de la barrera hematoencefálica y la acumulación de A β en los vasos sanguíneos (130,131), otorgando resultados más realistas tanto en la etiología como en la evaluación de fármacos, lo que facilita el desarrollo de la medicina de precisión en estos pacientes.

2.2. Modelos *in vivo*

Debido a que en los modelos *in vitro* no es posible estudiar todos los aspectos cognitivos, morfológicos y fisiopatológicos de la enfermedad, es necesario el uso de modelos *in vivo* que permitan el análisis de los factores de riesgo, efecto farmacológico, los cambios neurológicos, fisioneuropatológicos e histológicos durante la evolución de la enfermedad (133). Los modelos animales más usados en el estudio de EA han sido genéticamente

modificados para imitar los genes relacionados con la EAF. Los organismos más usados para el estudio de la EA son los modelos invertebrados y los murinos. Los modelos invertebrados se han usado en la investigación de EA por su fácil mantenimiento, la posibilidad de analizar los cambios patológicos en un sistema nervioso complejo y la observación de la neurodegeneración en partes de cuerpo del organismo sin matarlo, los organismos más usados son *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*.

El primero es modificado genéticamente al introducir los genes de la β secretasas y A β 42, y se usa para investigar las alteraciones en microtúbulos, la formación de A β y la función de las Presenilinas en estos procesos. En este modelo se ha observado que la formación de acúmulos de A β de estructura fibrilar causa degeneración neuronal, otro resultado notable es la parálisis gradual del organismo por alteraciones en PTL-1 (homólogo de Tau) (134). Por otro lado, los modelos de *D. melanogaster* se usan para estudiar la patología de la EA relacionada con el exceso de producción de Tau y A β 42, por medio del uso de especímenes con sobreexpresión de APP o con modelos triple transgénicos para APP, β -secretasa humana, y presenilina y secretasa de *Drosophila* (dPsn). Algunos estudios han evidenciado elevación de A β 40 y A β 42, formación de placas amiloides y degeneración retinal asociada a la neurodegeneración cerebral, que mejora con inhibidores de la β y γ secretasas (135).

Finalmente, los modelos más usados son los modelos murinos transgénicos, de los cuales cerca de 200 han sido desarrollados para investigar la EA, basados en las mutaciones de EAF, Tau, y los factores de riesgo genético para EAE (136-138). Su uso ha permitido analizar la aglomeración de A β , la formación de PS, la pérdida neuronal, la pérdida sináptica, la astrogliosis y microgliosis, la neuroinflamación, los cambios en el LTP y el deterioro cognitivo causado por la enfermedad (137), además de ser usados en estudios preclínicos para evaluar los efectos farmacológicos de nuevas moléculas terapéuticas. En trabajos realizados en estos modelos transgénicos para EAF se ha observado el aumento de la formación de placa A β , hiperfosforilación de Tau por interacción con el A β , incremento de citoquinas, microgliosis asociada a taupatías, disminución de espinas dendríticas tipo hongo, citotoxicidad por acumulación de oligómeros intracelulares de A β , disminución del LTP, aumento intracelular de calcio y alteraciones comportamentales como amnesia y falta de socialización (136-138), por lo que se puede concluir que todos estos modelos son útiles para investigar los mecanismos patológicos de la enfermedad.

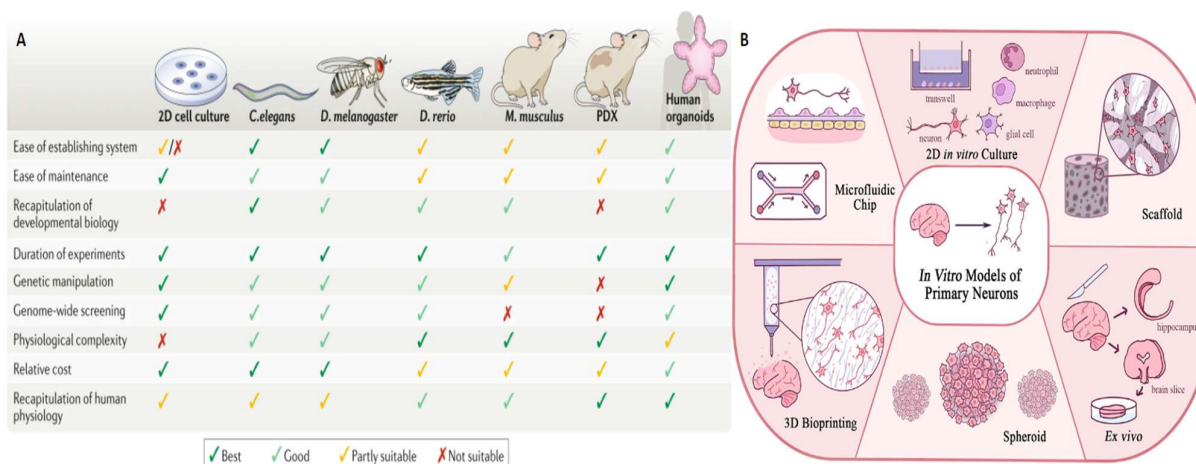


Figura 12. Modelos de investigación en EA. (A) Comparación entre modelos *in vitro* e *in vivo*. **(B)** modelos *in vitro*. tomado de ref (120,132).

2.3 Modelos químicos

Debido a su facilidad de uso, su bajo precio y a la posibilidad de simular factores ambientales o vías patológicas que se relacionan con el desarrollo de EA, los modelos químicos han sido una de las plataformas más populares para el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Se han estudiado varios productos químicos para desarrollar modelos inductores de EA *In vitro* e *in vivo* que repliquen los mecanismos de acción de este trastorno (140).

Algunos de estos químicos son los metales pesados que simulan el EO, la escopolamina que causa disfunción colinérgica y activación de quinasas, el etanol y el H₂O₂ que aumentan la formación de EROs, la colchicina y el ácido okadaico que causan daño microtubular e inducen hiperfosforilación de Tau, la estreptozotocina que produce disfunción sináptica y un aumento intracelular de Ca²⁺, el lipopolisacárido que incrementa la producción de Citoquinas proinflamatorias y causa activación glial (139), uno de los más interesantes en la actualidad es la rotenona, un pesticida inductor de disfunción mitocondrial usado como modelo de estudio para enfermedad de parkinson en el que se ha descubierto que también tiene réplica varias vías patológicas en EA en el hipocampo (140).

2.4. La Rotenona, neurotoxina modelo de la EA

La rotenona es un compuesto químico producido por las raíces y rizomas de las plantas leguminosas de la familia Fabaceae, principalmente los géneros *Tephrosia*, *Lonchocarpus* y *Derris* como mecanismo de protección contra la ingesta por insectos y cuyo nombre químico es (2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahydro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromeno[3,4-b]furo(2,3-h)chromen-6-one) (141). Desde tiempos remotos se ha usado como insecticida natural en cultivos y como método de pesca por envenenamiento. En el siglo XX se sintetizó la molécula y fue usado asiduamente como pesticida hasta su reciente prohibición y clasificación como tóxico medioambiental (142).

El mecanismo de acción de este compuesto se debe a que es un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (NADH ubiquinona - deshidrogenasa), en la CTE los electrones suministrados por el aceptor NADH son recibidos en el complejo I por un flavín mononucleótido (FMN) y son transportados por los grupos Fe-S hasta el grupo Fe-S N2, tiene el potencial redox más alto, y por lo tanto, se considera que es el grupo final de hierro y azufre el cual los traslada al bolsillo de unión a quinona, formado en la interfaz de las subunidades (PSST) que es quien trasloca los electrones al transportador ubiquinona. La rotenona bloquea la transferencia electrónica entre el grupo N2 y el PSST (143), impidiendo el funcionamiento de la CTE, esto genera un desacoplamiento de electrones antes de su unión a moléculas de Oxígeno e Hidrógeno para la formación de agua, lo que genera un incremento en la producción de EROs, así como la disminución de la producción de ATP lo que desencadena disfunción mitocondrial (146).

El uso de la rotenona como modelo para el estudio de la enfermedad de parkinson (EP) ha sido ampliamente investigado al haber una asociación causal entre el uso del pesticida y el desarrollo de EP (146), así mismo esta molécula ha podido replicar *in vitro* e *in vivo* los mecanismos de este transtorno (147,148), como la alfa-sinucleinopatía, la disfunción dopaminérgica y mitocondrial, el EO y la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y el locus coeruleus (146). Sin embargo, en años recientes también se ha descubierto que la rotenona también induce la activación de la mayoría de las vías patogénicas de la EA (fig 13), como la acumulación y agregación del A β , la muerte neuronal (151), y la hiperfosforilación de Tau en células cultivadas de hipocampo de ratas de Lewis (140,148), en modelos murinos también se halló que la rotenona produce

neurodegeneración y activación glial en el hipocampo (149), así como disfunción colinérgica (150) sin embargo no hay modelos *in vitro* de cultivos neuronales colinérgicos humanos que utilicen la rotenona como plataforma de estudio para los mecanismos patológicos en EA (fig 13), por lo que sus mecanismos patológicos en estas células aún es desconocido, requiriendo más investigación sobre el uso de rotenona como posible modelo de investigación de mecanismos patológicos en EA.

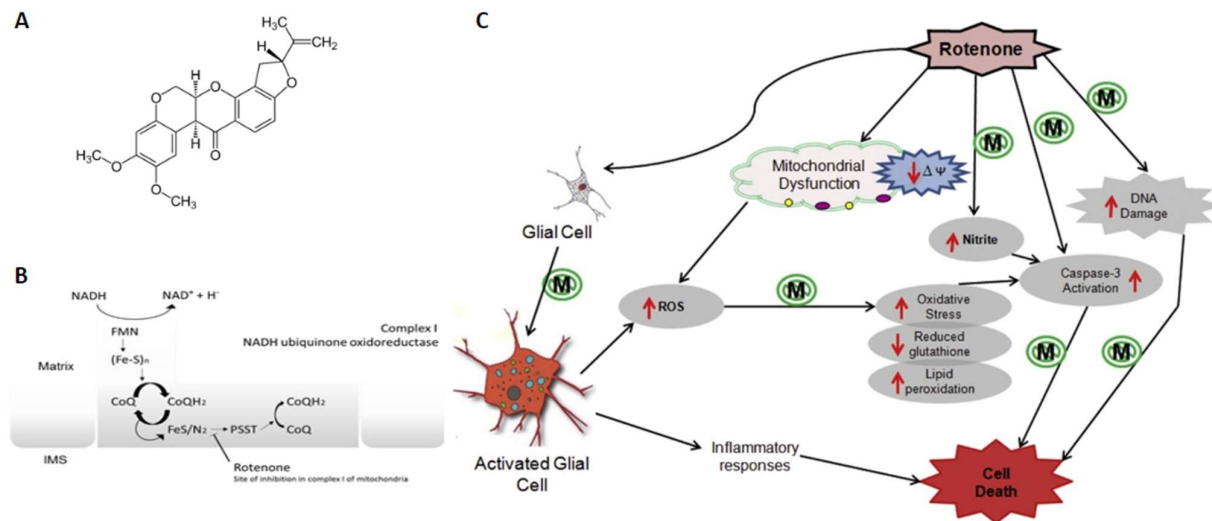


Figura 13. La rotenona como modelo de estudio de los mecanismos patológicos en la EA. (A) Estructura molecular de la rotenona. **(B)** Mecanismo de acción como inhibidor del complejo 1 mitocondrial. **(C)** Mecanismos neuropatológicos de la rotenona en las neuronas. Tomada de ref (151).

CAPÍTULO III: CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES (CME) COMO MODELO DE LA EA

3.1. Definición de CME

Las células mesenquimales estromales (CME) o células madre mesenquimales, son células madre adultas, multipotentes, lo cual les confiere la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse a múltiples linajes de su capa germinal, y su función es la reposición de las células perdidas en el organismo, manteniendo la concentración celular y fomentando la reparación de los tejidos (152). Los criterios mínimos para que las células puedan considerarse MSC establecidos por la ISCT (Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica) son: tener un fenotipo positivo en más de un 95% para los marcadores celulares CD105, CD73 y CD90, poseer una expresión de de menos del 2% de marcadores de linaje diferenciado como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 o moléculas de superficie del HLA clase 2, presentar adherencia al plástico en condiciones de cultivo y tener la habilidad para diferenciarse a células de origen mesodérmico como osteoblastos, adipocitos y condroblastos (fig 14)(153).

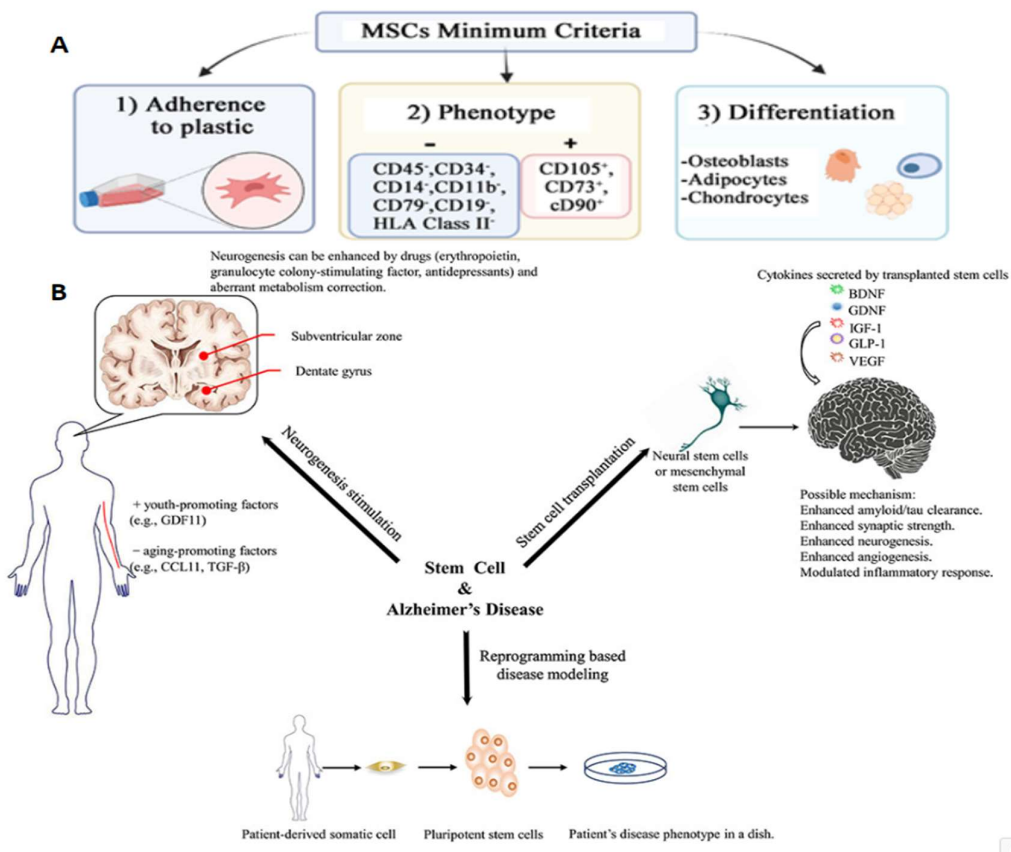


Figura 14. Criterios de selección y usos en investigación de las CME (A). Criterios mínimos de clasificación de las CME por la ISCT. **(B).** Uso en investigación de las CME en EA. tomado de referencia (154, 155, 158).

3.2. Fuentes de obtención

En tejidos adultos las CME cumplen la función de formar el estroma, un tejido conectivo sirve de estructura de soporte para las células funcionales de los tejidos. Estas pueden hallarse en médula ósea, periostio, pulpa dental, músculo, tejido adiposo, cerebro y en tejidos conectivos como el endometrio de la sangre menstrual. A nivel fetal pueden obtenerse del compartimento perivascular (PVC), del líquido amniótico o de la gelatina de Wharton (o CME-WJ, tejido conectivo mucoso del cordón umbilical) y la placenta (fig 15) (155-157). Las CME obtenidas de cordón umbilical presentan múltiples ventajas en comparación con CME obtenidas de otros tejidos debido a su origen embrionario, poseen gran potencial de diferenciación y proliferación *in vitro* e *in vivo*, un tiempo de duplicación más corto, fácil acceso para su recolección, ya que al ser un tejido descartable después del nacimiento no plantea problemas legales o éticos. (155-156) Potentes efectos inmunomoduladores, angiogénicos, y antiinflamatorios derivados de su secretoma, mayor concentración de CME en contraste con otros tejidos y, en el caso de enfermedades neurodegenerativas tiene la ventaja de generar una mayor expresión de genes neurotróficos (157), siendo un modelo celular ideal para el estudio de terapias vanguardistas en alzheimer como el trasplante de CME, terapia génica con CRISPR CAS9 y estimulación de la neurogénesis y la supervivencia neuronal con secretomas de CME. Así mismo, este modelo se ha usado asiduamente para el estudio de mecanismos patológicos, medicina de precisión y el diseño de fármacos en EA, al permitir una fácil obtención de neuronas con el genotipo del paciente (158).

3.3. Características biológicas y moleculares

Las CME secretan proteínas solubles que fungen como factores de crecimiento y citoquinas, las cuales generan un microambiente local que favorece la angiogénesis, la neurogénesis, la migración celular, la inmunomodulación y la cicatrización (157). Ejemplos de proteínas del secretoma de las CME son el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor 1 inducible por la hipoxia (HIF-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF),

prostaglandina 2 (PGE 2), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor derivado de plaquetas (PDGF), factor derivado de células estromal-1 (SDF-1), proteína 6 del gen estimulado por TNF (TSG-6), así como citocinas inmunomoduladoras (IDO, PGE 2 , interleucina-6)(178,180). Estas moléculas activan vías de señalización antioxidantes y neuroprotectoras como las vías Akt, ERK y p38 MAPK (159).

Las CME como parte de su proceso de comunicación y señalización producen vesículas extracelulares (VE), las cuales por su contenido explican parte de los efectos terapéuticos de estas células, las VE son partículas encapsuladas en fragmentos de membranas celulares que están en el intersticio y pueden clasificarse según su tamaño y composición en exosomas, que son pequeñas vesículas (30–120 nm) de origen endosomal, en microvesículas o micropartículas, con un volumen intermedio (100 nm-1 µm), producido por la evaginación de la membrana plasmática, y en cuerpos apoptóticos de tamaño más grande (1-5 µm.) y producidas como parte de procesos apoptótico (180). Las VE transportan moléculas biológicamente activas e información genética a otras células para modificar su comportamiento. El contenido de éstas cambia dependiendo del microambiente local, por lo que actualmente se investigan como biomarcadores de múltiples patologías (160).

Entre las moléculas transportadas en las VE se encuentran factores de transcripción, proteínas, mitocondrias, lípidos, DNA bicatenario, SI-ARN y Mi-ARN. Entre las moléculas transportadas se encuentran quimiocinas y mi-RNA que regulan el ciclo celular (miR-191, miR-222,) moléculas antiinflamatorias (miR-204-5p)), pro-angiogénicas (miR -222 y miR-21) y pro migratorias (miR-21 y let-7a) (159,160). Investigaciones recientes hallaron que la administración de VE de CME tuvo efectos antiinflamatorios, anti apoptóticos, angiogénicos e inmunomoduladores en estudios *in vitro* e *in vivo*, reduciendo la muerte celular en células del SNC, y mejorando la cognición y locomoción, lo que hace del uso de VE obtenidas de CME una terapia promisorio para enfermedades neurodegenerativas (157,159).

Estas células también pueden impulsar el rescate de muerte celular (RCD), promoviendo la supervivencia celular de células lesionadas o que inician procesos de muerte celular. En los mecanismos de rescate contacto célula a célula se requiere un contacto intercelular, para la transferencia de organelas y iones. La transferencia de organelas como las mitocondrias por túneles de nanotubos facilita el rescate de la respiración aeróbica, mejorando la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. Así mismo la red de conexinas permite la transferencia de calcio entre células, disminuyendo la excitotoxicidad celular.

Entre las estrategias de RCD a larga distancia está la producción de Factores paracrinos neurotróficos (BDNF) e inmunomoduladores (IL-6, IL-10) los cuales disminuyen la activación de vías apoptóticas e inflamatorias (178-180).

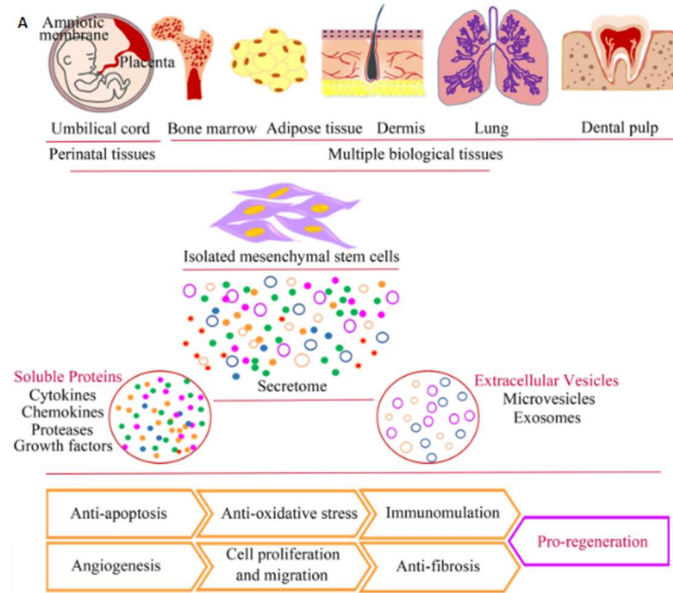


Figura 15. Fuentes de obtención y alternativas terapéuticas derivadas de las CME. (A) Fuentes de obtención de las CME y los efectos de sus secretos en enfermedades neurodegenerativas. Tomado de ref (157)

3.4. Mecanismos de transdiferenciación de las CME en neuronas

La transdiferenciación consiste en la transformación de una célula madre a una diferenciada de un linaje diferente al de su línea germinal o de origen (v.gr. células mesenquimales de origen mesodermo pueden transdiferenciarse en neuronas que son de origen de la capa embrionaria del ectodermo). Este proceso implica una reprogramación que varía el comportamiento de la expresión génica de estas células. Este proceso está regulado por los factores de transcripción, proteínas que incrementan la transcripción (FT) de los genes al unirse a sus regiones promotoras. La expresión o incubación de estos factores de transcripción en células somáticas puede modificar el linaje celular.

Las CME provienen del mesodermo y poseen la habilidad innata de diferenciarse en células de esa línea terminal, como adipocitos, osteocitos, condrocitos y cardiomiocitos. Sin embargo, por medio de inducción mediada por factores químicos y biológicos estas células también pueden transdiferenciarse en células de otras capas germinales, como endodermo y ectodermo, permitiendo la obtención de líneas celulares como neuronas (152). Otro proceso celular que puede ocurrir es el de reprogramación de células diferenciadas a células inmaduras o no diferenciadas o células madre. Un ejemplo de esto es la

transformación fibroblastos a células madre pluripotentes inducidas por la adición de los FT Nanog, Sox2 y Oct4, Klf4, c-Myc (162).

Debido a la facilidad de obtención y manejo de las CME y sus posibilidades como modelo de estudio del envejecimiento y como posible alternativa terapéutica, desde el año 2001 se han desarrollado diversos protocolos de transdiferenciación de las CME a neuronas, siendo el primer método la transdiferenciación con B-mercaptoetanol, existiendo en la actualidad diversas estrategias de transdiferenciación con sustancias químicas, factores de crecimiento, cocultivos con células del linaje neural, transfección de genes, miRNAs, diferenciación inducida por células madre pluripotentes y la utilización de matrices biológicas para su transdiferenciación (154). El uso de medios suplementados con factores de crecimiento es uno de los más usados actualmente al producir una diferenciación eficiente demostrada por la expresión de los marcadores neuronales TUJ1 y β -tubulina III (124, 162), su uso replica la diferenciación endógena en el organismo, las células obtenidas poseen propiedades fenotípicas, fisiológicas y de funcionalidad similares a las neuronas.

Entre los factores biológicos más usados en los medios de transdiferenciación se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Así como moléculas reguladoras de la morfogénesis como el SHH (Sonic Hedgehog), y compuestos promotores de la expresión de marcadores neurales como el ácido retinóico y la heparina (124, 154, 162). El proceso de transdiferenciación a neuronas se puede dar de forma directa o en 2 pasos. En la conversión directa las CME se incuban en medios con compuestos químicos y biológicos que varían su conformación según el linaje neuronal de interés (diana, viviana, miguel.), obteniéndose luego del tiempo de incubación (7-21 días) células similares a neuronas, las cuales expresan marcadores neuronales como NeuN, MAP 2, β -tubulina III y Tuc-4 (tabla 1).

Dependiendo del medio de transdiferenciación, las CME se transdiferencian a linajes diferentes, pudiendo expresar marcadores neuronales de tipo colinérgico como VACHT y ChAT. (136), dopaminérgico como TH, o incluso marcadores astrocíticos como GFAP (163), o de otro tipo. En la transdiferenciación indirecta, el primer paso consiste en la generación de neuroesferas conocidas como Células Precursoras Neuronales (NPC), las cuales son tripsinizadas para su transdiferenciación en células similares a neuronas. Entre los mecanismos bioquímicos que actualmente están involucrados en inducir la transdiferenciación de las CME están: la inhibición de las vías de señalización de activina/nodal/TGF- β proteína morfogénica ósea (BMP), el aumento de AMPc activando la

vía clásica de PKA, el silenciamiento de la vía Notch/REST., la señalización por MEK-ERK, la regulación negativa de factores de transcripción homeobox como LMX1a (154,162).

Tabla 1. Principales métodos de transdiferenciación a partir de CME. Información modificada de referencia (154).

Referencia	Inductor	Origen de las MSC	Pasos	Tiempo	Porcentaje de diferenciación informado	Técnica utilizada para demostrar la diferenciación	Demostración de funcionalidad
(Black et al., 2001)	β -Mercaptoetanol	Médula ósea humana adulta	Preinducción en medio DMEM/SFB 20% y β -Me 1 mM durante 24 h. Inducción posterior con β -Me 10 mM.	5 horas	50% presentaban cambios morfológicos de naturaleza neuronal (contracción del citoplasma, extensión de neuritas, ramificación secundaria).	La morfología neuronal se observó al microscopio. Aumento de la expresión de NF-M y NSE por RT-PCR. Inmunotinción para NSE.	No
(Hung et al., 2002)	β -Mercaptoetanol y Acido Retinoico	Médula ósea humana adulta	Preinducción en medio DMEM/SFB 20%, β -Me 10-3 M y RA 5×10^{-7} M por 24 h. Inducción posterior por depleción de suero.	5 horas	mediante IF se halló que el 98% de las células fueron positivas para NeuN y β -tubulina III.	La morfología neuronal se observó al microscopio. Expresión de Novo de Tau y NF-H y aumento de la expresión de NSE y NeuN por RT-PCR. Aumento de nestina, NSE, NeuN y Tuj-1 después de la inducción por WB. Inmunotinción para NSE, NeuN y Tuj1.	Presencia de corriente de Na ⁺ y corriente de K ⁺ post-tratamiento demostrada por Patch-clamp. Aumentar la concentración de Ca ²⁺ intracelular cuando se le desafia con glutamato o potasio (K ⁺).
(zok et al., 2002)	β -Mercaptoetanol	Tejido adiposo de humanos adultos.	Preinducción en medio DMEM/SFB 20% y β -Me 1 mM durante 24 h. Inducción posterior con β -Me 10 mM.	9 horas	70% presentaban cambios morfológicos de naturaleza neuronal.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de la expresión de NSE, NeuN y nestina por RT-PCR. Inmunotinción para NSE. Aumento de NSE por WB.	No
(Khanabadi et al., 2016)	β -Mercaptoetanol	Médula ósea de ratas Sprague Dawley adultas.	Preinducción en medio DMEM/SFB 20% y β -Me 1 mM durante 24 h. Inducción posterior con β -Me 10 mM.	3 horas	40% presentaban cambios morfológicos de naturaleza neuronal.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de la expresión de Map2, Nefl, Tau y Nestin por RT-PCR. Inmunotinción positiva para nestin, tuj1, Nef y Flk.	No
(Shi et al., 2016)	β -Mercaptoetanol	Médula ósea de ratas Sprague Dawley adultas	Preinducción en medio DMEM/SFB 20% y β -Me 1 mM durante 24 h. Inducción posterior con β -Me 5 mM.	5 horas	70% presentaban cambios morfológicos de naturaleza neuronal.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de NSE y nestina y disminución de Notch1 y Hes1 por inmunotinción WBI para NSE.	No
(Deng et al., 2001)	Isobutilmetilxantina y AMP cíclico dibutilirilo	Médula ósea humana adulta	Inducción con IBMX 0,5 mM/dbcAMP 1 mM.	6 días	25% presentaban cambios morfológicos de naturaleza neuronal.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de NSE por WB.	No
(Ashjian et al., 2003)	IBMX, indometacina e insulina.	Tejido adiposo de humanos adultos.	Inducción con 5 g/ml de insulina, 200 M de indometacina e isobutil metilxantina 0,5 mM.	14 días	25% presentaban cambios morfológicos de naturaleza neuronal.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumentar NSE y trk-A por WB. Inmunotinción para NSE, trk-A y NeuN	Presencia de corrientes externas dependientes de voltaje y corrientes K ⁺ rectificadoras tardías demostradas por Patch-clamp.
(Alexania et al., 2007)	SazadC y TSA	Médula ósea de ratón Balb/c	Preinducción con 25 ng/ml de bFGF y EGF durante 2 días. Inducción posterior con 1 mM de SazadC y 40 nM de TSA.	2 días	70% poseían cambios morfológicos de naturaleza neuronal	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de la expresión de Sox2 por RT-PCR. Inmunotinción para Tuj1 y GFAP.	No
(Goodwin et al., 2001)	bFGF y EGF.	Cordón umbilical y médula ósea humana.	Inducción con 20 ng/ml bFGF y 20 ng/hEGF.	7 días	50% poseían cambios morfológicos de naturaleza neuronal.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Inmunotinción para Tuj1 y GFAP y por WB.	No
(Fu et al., 2004)	Cocultivo en medio condicionado por neuronas de ratas	Cordón umbilical humano fetal	Las MSC se cultivaron en un medio DMEM condicionado por neuronas extraídas de los cerebros de ratas Sprague-Dawley de	12 días	Se halló por IF que el 87,4% y el 58,2% de las células eran positivas para NF y NeuN, respectivamente.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Inmunotinción para NeuN, NF, GFAP, OX42, parvalbúmina y calbindina. Presencia de GluR6, GluR7 y KA2 por WB y RT-PCR.	Generación de corrientes de entrada en respuesta a un baño de glutamato 1 mM demostrado por Patch-clamp.

	Sprague-Dawley.		siete días.				
(Fu et al., 2006)	Cultivo en medio condicionado por neuronas de rata Sprague-Dawley, Shh y FGF8	cordón umbilical humano	Las MSC se cultivaron en un medio DMEM condicionado por neuronas extraídas de los cerebros de ratas Sprague-Dawley de siete días nacidas durante 9 días. Posteriormente, se añadieron Shh 500 ng/ml y FGF8 100 ng/ml.	6 días	El 87,4% y el 58,2% de las células eran positivas para NF y NeuN, respectivamente.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Inmunotinción para TH y GAD. Presencia de TH por WB.	Liberación de dopamina al medio demostrada por HPLC.
(Zurita et al., 2005)	Cocultivo con células de Schwann	Médula ósea de rata Wistar adulta.	CMM y células de Schwann extraídas del nervio ciático de ratas Wistar adultas se cultivaron.	2 semanas	60%, 52% y 34% presentaron positividad para NSE, NF-200 y Tuj1, respectivamente	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Inmunotinción para nestina, NF-200 y Tuj1.	No
(Zurita et al., 2007)	Cocultivo con células de Schwann	La médula ósea de rata Wistar adulta.	CMM y células de Schwann extraídas del nervio ciático de ratas Wistar adultas se cultivaron en placas de cultivo transwell con membrana de policarbonato.	2 semanas	Se halló por IF que el 48,2%, 46,2% y 27,4% de las células eran positivas para NF-200, Tuj1 y GFAP, respectivamente.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Inmunotinción para nestina, NF-200, Tuj1 y GFAP. Mayor expresión de nestina, Tuj1 y GFAP por RT-PCR	No
(Trzaska et al., 2008)	Shh, FGF8 y bFGF en CMM con caída REST.	Médula ósea de humanos adultos.	Los vectores de ARN IP se transfectaron contra REST en CMM antes de la inducción con 250 ng/ml de SHH, 100 ng/ml de FGF8 y 50 ng/ml de bFGF.	12 días	Se halló por IF una Positividad para NeuN y TH del 90% y 68,7%, respectivamente.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de TH, NaV11, NeuN, Pitx3 y Nurr1 por WB.	Presencia de descargas espontáneas y corrientes postsinápticas espontáneas demostradas por Patch-clamp.
(Alexanian et al, 2013)	SB431542, dorsomorfina, TSA, RG-108, 8-BrcAMP, Rolipram y bFGF.	Médula humana adulto	Inducción con TSA 200 nM, RG-108 10 µM, 8BrcAMP 300 µM, Rolipram 1 µM y 20 ng bFGF, junto con dorsomorfina 2 µM y SB431542 2 µM.	3 semanas	95% presentó cambios morfológicos de naturaleza neuronal. Se halló por IF que el 68,05% y el 89,12% fueron positivas para HT y Nurr1, respectivamente.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Inmunotinción para Sox2, NCAM, A2B5, NeuN, Map2, β-tubulina III, NSE, Nurr-1, ChAT, TH, NF, VGLUT1, SYP, SYN-1, GAB VGAT, GAD67, PITX3 y sinaptosina. Mayor expresión de Sox2, Map2, B3T, NSE, Nurr-1, ChAT, TH, NF, VGLUT1, SYP, SYN-1, VGAT, GAD67 y PITX3 por RT-PCR y por WB.	La inmunotinción de sinaptosina revela estructuras similares a sinapsis que se forman entre células diferenciadas. Presencia de rectificador de corriente K ⁺ demostrada por Patch-clamp.
(Madhu et al., 2016)	SB431542 y Dorsomorfina	Tejido adiposo de humanos adultos.	Inducción con Dorsomorfina 2 µM y SB431542 20 µM	14 días	Se halló por IF que el 85% de las células eran positivas para NSE.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. RT-PCR aumentó Pax6, Sox1, NF-200, NES y β-tubulina III. Inmunotinción para Pax6, Sox1, NF-200, NES y β-tubulina III. Activación vía Erk1/2, PI3K y Akt por fosforilación e inhibición de fosforilación SMAD 1/5/8 y 2 WB.	La diferenciación neuronal in vivo cuando se implantó por vía subcutánea en ratones SCID CB-17 después del tratamiento con DM y SB se demostró mediante la expresión de la proteína GAP43 específica del cono de crecimiento del axón.
(Park et al, 2017)	bFGF, SB431542, noggin, LDN193289, ac. ascórbico, dbcAMP y BDNF.	Tejido adiposo de humanos adultos.	Preinducción con bFGF 4 ng/ml, SB431542 10 µM, noggin 100 ng/ml y LDN193289 0,5 µM, durante 8 días. Tratamiento posterior con 200 µM de ácido ascórbico durante 14 días. Finalmente, la exposición a dbcAMP 50 µM y BDNF 20 ng/ml	12 días.	Se demostró mediante inmunofluorescencia positividad del 93 %, el 37 % y el 47 % para Tuj1, GAD y GABA, respectivamente.	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de expresión Tuj1, MAP2, Dlx5, Lhx6, GAD67, SCN1A, SCN5A, Nkx2.1, Dlx2, Dlx5 y Lhx6, vGat1, vGlut2, GAD65, GAD67, CALB2 y GABRA1 por RT-PCR. Inmunotinción para Tuj 1, Pax6, MAP2, NeuN, GFAP, OLIG2, NKX2.1, DLX2, LHX6, GAD y GABA.	Capacidad para desencadenar potenciales de acción, presencia de corrientes iónicas activadas por voltaje y presencia de una corriente postsináptica inhibitoria cuando se expone a antagonistas de NMDAR y AMPA.
(Mendivil et al, 2019)	DMEM/F12 + 1%SBF + + 50 µg/mL de heparina + 10 ng/mL bFGF + 0.5 µM de AR + 50 ng/mL SHH	Cordón umbilical Humano	Inducción con DMEM/F12 + 1%SBF + + 50 µg/mL de heparina + 10 ng/mL bFGF + 0.5 µM de AR + 50 ng/mL SHH	7 días	Se demostró mediante inmunofluorescencia positividad de VaCHT y ChAT en un 76% de las CSNC	La morfología neuronal se observó bajo un microscopio. Aumento de expresión MAP2, β-Tub-III, VaCHT, ChAT y Acetilcolinesterasa. No se apreció una expresión significativa de GFAP, TH y GAD67. Así mismo se observó la Respuesta de Ca ⁺⁺ intracelular al estímulo con acetilcolina.	Capacidad para desencadenar potenciales de acción. Respuesta de la entrada de Ca ⁺⁺ intracelular al estímulo con acetilcolina 1 mM

Recientemente se estandarizó en el laboratorio un nuevo protocolo basado en el uso de factores de crecimiento de transdiferenciación de CME-CU a células similares a neuronas de linaje colinérgico (CSNC) de manera directa (124), el cual tarda 5 días menos que el más corto de los anteriores protocolos de transdiferenciación por compuestos biológicos a neuronas. Asimismo se halló que la-transdiferenciación luego de 7 días con el medio Cholinergic-N-Run (DMEM/F12 , 1% SBF, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de heparina, 10 ng/mL bFGF, 0.5 μM de Ácido Retinóico , 50 ng/mL SHH) indujo en las CME-CU niveles elevados de los marcadores de superficie neuronales específicos NeuN, TUC-4, NF-L, β -Tubulina III y MAP2 mientras se reducía la expresión de los factores de transcripción de indiferenciación y proliferación de CME SOX2 y Ki-67, indicando una migración del linaje de CME a neuronas. Otro resultado notable fue el alto porcentaje de eficiencia a la transdiferenciación pues el 76% de las células presentaban marcadores de linaje colinérgicos específicos acetilcolina transferasa (ChAT), acetilcolinesterasa (AChE) y el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), comprobando la funcionalidad de éstas CSNC por la respuesta positiva al estímulo con acetilcolina que indujo la entrada intracelular de calcio.

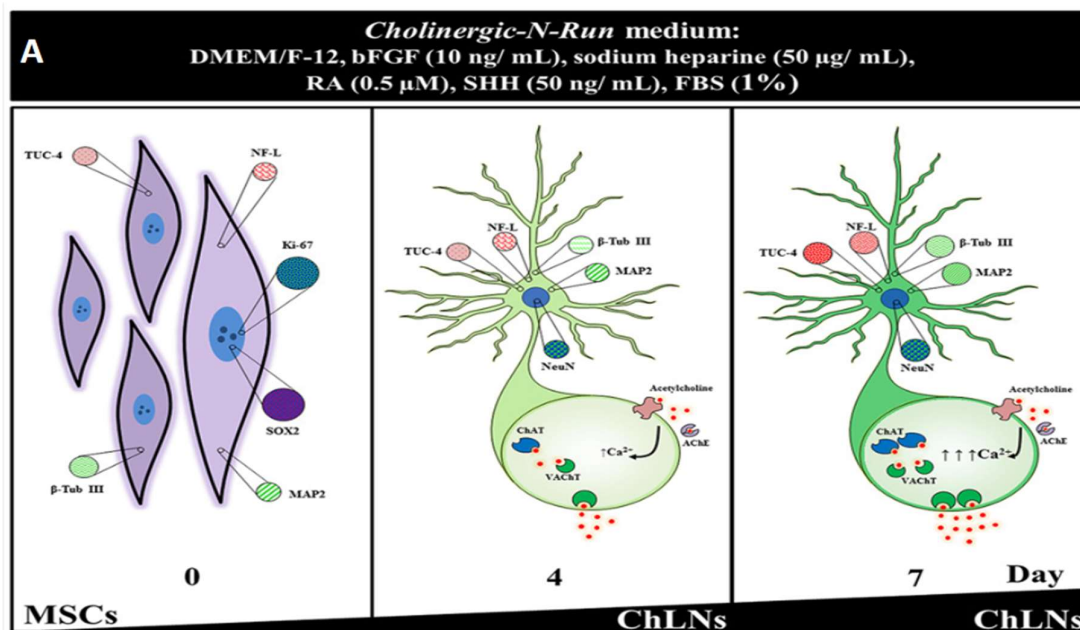


Figura 16. Marcadores neuronales durante el proceso de transdiferenciación de CME a Neuronas.
 (A) Principales factores del proceso de transdiferenciación de CME a neuronas. Imagen tomada de ref (124).

CAPÍTULO IV: OPCIONES TERAPÉUTICAS PARA LA EA

4. Tratamientos para la EA

A pesar de los avances en el entendimiento de la etiología de la enfermedad y de los múltiples ensayos clínicos que buscan desarrollar una terapia para la EA, aún no existe un tratamiento terapéutico eficaz que haya logrado revertir o detener la neurodegeneración o la progresión de la demencia (164), por lo que los medicamentos aprobados para su uso en pacientes con este trastorno sólo tratan los síntomas con éxito limitado. Por tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos que puedan ser usados en el futuro tratamiento de esta enfermedad.

4.1. Convencionales

Actualmente existen 6 medicamentos aprobados para su uso en EA, Donepezil, galantamina, rivastigmina, memantina, Aducanumab y Lecanemab. La galantamina y el donepezil son inhibidores de la Acetilcolinesterasa (AChE) (164-166), mientras que la rivastigmina es un inhibidor reversible tanto de la AChE como de la butirilcolinesterasa (BChE) (165).

Estas enzimas degradan la ACh en Colina y acetato, por lo que su inhibición aumenta la concentración de este neurotransmisor, paliando la disfunción colinérgica. Por otro lado, la memantina es un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), el cual en presencia de glutamato e inespecíficamente de A β abre canales de calcio que incrementan su concentración intracelular (166), por lo que su inhibición disminuye la sobreestimulación del receptor, la sobrecarga de calcio en las neuronas y la excitotoxicidad, mejorando la supervivencia neuronal. Finalmente, el Aducanumab y el Lecanemab son anticuerpos monoclonales IgG1 humanos dirigidos a los oligómeros de A β , facilitando su fagocitosis y eliminación por las células de la glía (167). Desafortunadamente todos estos se han asociado con efectos adversos. Por una parte, los inhibidores de la acetilcolinesterasa pueden causar náuseas, vómitos, diarrea y pérdida de peso (165), mientras que la memantina es conocida por causar alucinaciones, mareos y fatiga (166,170).

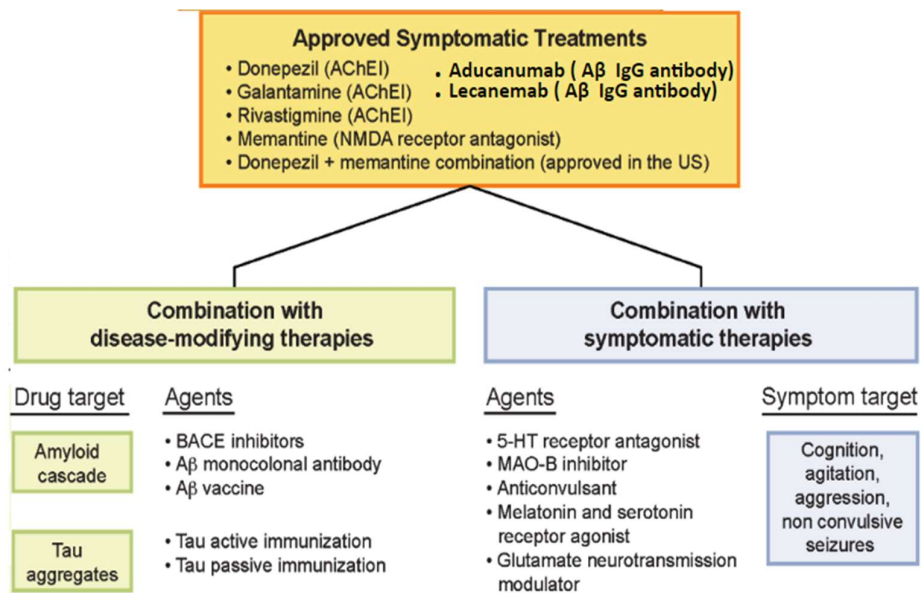


Figura 17. Alternativas terapéuticas aprobadas por la FDA o en ensayos clínicos para el tratamiento de la EA. Imágen modificada de ref (168, 169).

4.2. Alternativas terapéuticas de la EA

En la actualidad varios posibles medicamentos con diferentes mecanismos de acción están en evaluación preclínica y clínica. Entre estos están los medicamentos anti amiloidogénicos (inhibidores de la β y γ -secretasas, inmunización contra oligómeros de A β , promotores de enzimas implicadas en la degradación de A β , inhibidores de la agregación de A β) (170), terapias neuroprotectoras (como inhibidores de quinasas, antiagregante de Tau, inhibidores de caspasas, bloqueadores de NMDAR), (169,172) y terapias neuro reparadoras (uso de factores neurotróficos)(169- 171).

En los últimos años también se han estudiado nuevos abordajes para su posible uso en esta enfermedad, como el tratamiento con células madre mediante trasplante autólogo, que reemplazan a las neuronas perdidas, aunque el porcentaje de supervivencia en el tejido es muy bajo (menos del 10% en las primeras 24 horas) (157), o el uso de terapia génica como CRISPR/CAS9 para eliminar las mutaciones causales en la EAF (99,172). Sin embargo, la eficiencia celular de la edición génica es baja y aún no se ha aprobado ningún tipo de terapia génica para la EA.

Debido al origen multifactorial del trastorno y las fallas terapéuticas con el uso de un solo compuesto, es poco probable que terapias que intervienen en una sola vía detengan la

compleja cadena patogénica que causa la enfermedad, por lo que el enfoque actual es el desarrollo de terapias multifuncionales con varios compuestos que tratan diferentes vías patológicas (173). Así mismo en la EAF, el análisis de biomarcadores halló que los primeros signos patológicos de la EA aparecen en el cerebro hasta 25 años antes del deterioro cognitivo (111), a nivel clínico, los ensayos en población con DCL y demencia indican que los tratamientos aplicados en poblaciones asintomáticas no logran revertir el deterioro cognitivo y el daño neuronal, siendo solo tratamientos sintomáticos, esto sugiere que la neurodegeneración es irreversible en estadios sintomáticos (263).

A causa de estos hallazgos el enfoque actual es el de detección temprana de población de riesgo con marcadores moleculares, lo que permitiría detectar estas poblaciones con alta probabilidad de desarrollo de la enfermedad en el futuro (110,111). Esta detección temprana de biomarcadores permitirá una intervención terapéutica preventiva en personas que aún no presentan daños irreversibles o muerte neuronal, por lo que esfuerzos terapéuticos actuales se enfocan en el desarrollo de terapias modificadoras de la enfermedad en estadios tempranos de la neurodegeneración, lo que permitiría la prevención, retraso o aminoramiento de los síntomas de la EA (174).

En este contexto, en la literatura científica se ha reportado que los productos naturales, como extractos de plantas o compuestos de origen orgánico tienen un gran potencial para transformarse en futuros medicamentos que eviten la neurodegeneración y detengan la progresión de la EA (173,174). Entre ellos se encuentran la curcumina, el tramiprosato y el azul de metileno, los cuales tienen el potencial de intervenir simultáneamente en múltiples vías asociadas con la EA (176-179). Dentro de sus actividades biológicas se han reportado propiedades anti amiloidogénicas (175, 179, 182), antiagregantes de Tau (176), antioxidantes (176), antiinflamatorias, y quelantes (184,185). Los estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que la curcumina y el tramiprosato disminuyen la formación de placas seniles por su interacción con el A β , además de tener efectos antiinflamatorios y anti apoptóticos (186-189). Mientras que el azul de metileno ha demostrado la capacidad de reducir la auto agregación de Tau, la disfunción mitocondrial y el EO (189-176).

CAPÍTULO V: LA CURCUMINA COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA EA

5.1 Estructura química y características de la Curcumina

La curcumina es un componente polifenólico perteneciente a la familia de los curcuminoides. Su nombre químico es 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione y es obtenido del rizoma de la planta *Curcuma longa* y utilizado como tinte alimenticio (191). Este compuesto pertenece al grupo de los Diarilheptanoides, metabolitos secundarios de las plantas que constan de dos anillos de arilo (compuesto fenólico con sustitución de 1 hidrógeno por un grupo funcional) con adiciones de un grupo hidroxilo y un grupo metoxilo, los cuales están unidos por una dicetona con siete carbonos acíclicos (182,190) (Fig 18).

La curcumina es un compuesto tautomérico que puede existir en 2 isoformas. La forma ceto está presente en pH ácido y presenta 2 grupos cetona. Mientras que la forma enólica se da en un pH básico y es causada por la sustitución de 1 grupo cetona por un hidroxilo (192). Si bien la curcumina posee una baja biodisponibilidad en sangre y no es eficiente en la migración de la BHE, se encontró que su encapsulación en nanopartículas incrementa su disponibilidad en SNC, lo que favorece su uso como posible fármaco para la EA (182).

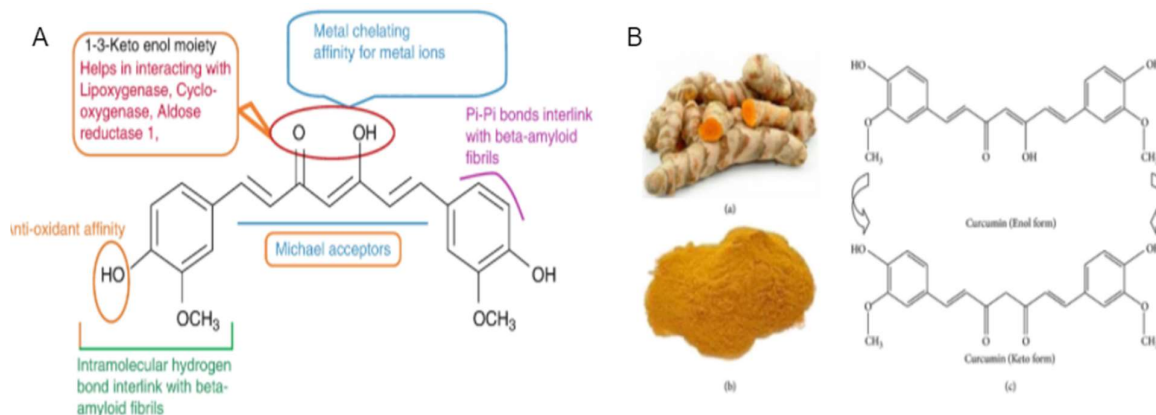


Figura 18. Características estructurales de la curcumina. (A) Estructura molecular y sitios de unión a ligandos; **(B)** Formas enol y ceto de la curcumina en la EA. Tomada de ref (180,192).

5.2. Actividades biológicas y mecanismos de acción de curcuminoides en la EA

La curcumina posee un gran espectro de propiedades farmacológicas, principalmente por su capacidad como aceptor/receptor de electrones y como estabilizante de agregados proteicos, así como por sus efectos inhibidores sobre enzimas metabólicas, receptores y canales celulares (180-185,177-193). Adicionalmente, este polifenol posee fuertes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, por lo que ha sido investigada en los últimos años como agente terapéutico en enfermedades en las cuales el estrés oxidativo juega un papel importante, como las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer.

Actualmente se sabe que, a diferencia de los medicamentos aprobados para su uso en pacientes con EA, este compuesto interviene en mayor o menor medida en todas las vías patológicas relacionadas con el desarrollo de la EA (figura 4) (194-232), lo que permite el abordaje terapéutico de múltiples dianas con un solo compuesto. Otra ventaja de su uso es su seguridad al tener una DL50 alta. Por todo esto se han desarrollado compuestos sintéticos derivados de la curcumina que potencian sus efectos y su biodisponibilidad en el SNC (198), lo que hace de la curcumina un tratamiento seguro, económico y con resultados prometedores para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (190-193).

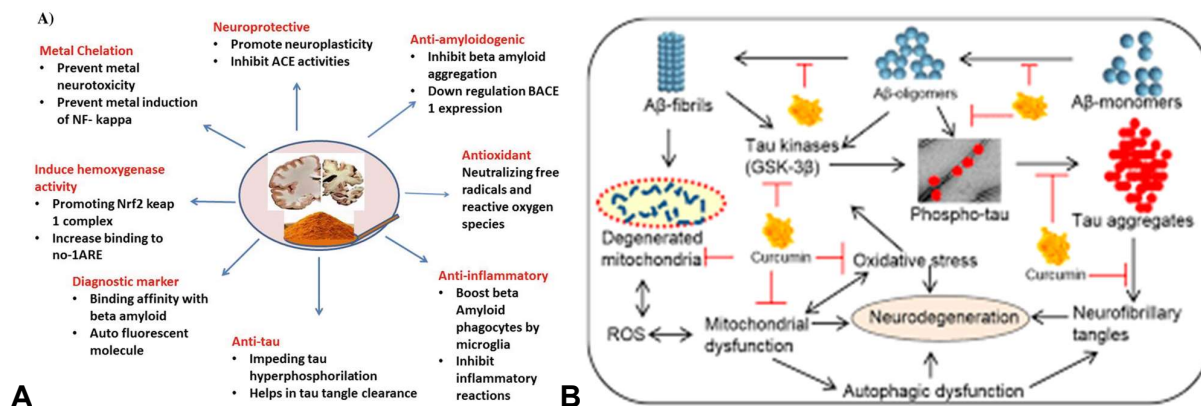


Figura 19. Mecanismos neuroprotectores de la curcumina en la EA. (A) Actividades biológicas. (B) Interacción entre los mecanismos de acción neuroprotectora de la curcumina en la EA .Tomada de ref: (180-182).

5.2.1 Actividad antioxidante

El aumento del EO en el SNC está relacionado con varias vías patológicas en la EA y se ha descrito que la curcumina reduce la concentración de moléculas oxidantes en esta patología por múltiples mecanismos (Fig 19). En estudios *in vitro* se encontró que la

curcumina forma interacciones redox entre su grupo hidroxilo y las ERO y ERN, eliminando sus radicales libres, lo que disminuye la oxidación de macromoléculas celulares y regula a la baja, tanto la expresión de proteínas quinasas activadas por mitógenos (como ERK1/2 y p38), como la activación de vías de estrés oxidativo (como JNK y MAPK) (196,199-200), lo que reduce la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial y la apoptosis (221).

También se halló que esta molécula incrementa la expresión de los elementos de respuesta antioxidante Nrf2 / ARE, encargados de restaurar los niveles de enzimas como el glutatión (GSH) y el superóxido dismutasa (202,228) las cuales degradan las ERO. La curcumina también posee la capacidad de quelar iones metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{3+} , disminuyendo la muerte neuronal (198). Así mismo se ha encontrado que este compuesto disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} por quelación del ión y por bloqueo de canales de Ca^{2+} dependiente de la liberación de Ca^{2+} (CRAC), lo cual reduce el exceso de calcio intracelular, la hinchazón mitocondrial, la pérdida del $\Delta\Psi_m$ y la apoptosis (201).

5.2.2 Actividad antiinflamatoria

La neuroinflamación es uno de los pasos iniciales en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas y existe una evidencia particularmente fuerte de efectos protectores de las curcuminas en el contexto de la neuroinflamación (204). En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha encontrado que este polifenol disminuye la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1, 2, 6, 8 y 12 (186) (185). También se ha hallado que inhibe múltiples vías de señalización, como MAPK, NF- κ B, WNT / β -catenina, PI3K / Akt, AP-1 y STAT3 en microglia y neuronas, interfiriendo con los primeros pasos de señalización tanto de la producción de citoquinas proinflamatorias como de apoptosis (184), además de regular negativamente el cambio fenotípico de la microglia a un perfil proinflamatorio M1. También se ha encontrado que este compuesto inhibe las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y la migración de células del sistema inmune. A nivel de astrocitos, la curcumina disminuye la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) relacionada con la activación glial (205), mientras que en la microglia el tratamiento incrementa la fagocitosis del A β , reduciendo la concentración extracelular del mismo (194).

5.2.3. Actividad anti-amiloidogénica

La agregación de A β es un paso crítico en el desarrollo de esta enfermedad, activando múltiples mecanismos de neurodegeneración, y se encontró que la curcumina reduce la amiloidosis en esta patología. En estudios *in vitro* los resultados muestran que modula a la baja la traducción y actividad de la proteína APP (208), e inhibe fuertemente el complejo BACE-1 al inhibir su transcripción por medio de la activación de la vía Wnt / β -catenina (197), lo que favorece la vía no amiloidogénica y reduce la producción de A β (226,187).

Adicionalmente, los estudios han indicado que la curcumina puede unirse a péptidos A β por medio de interacciones hidrofóbicas entre los grupos fenol o metoxilo de la molécula y los motivos apolares del A β , estabilizándose la unión por puentes de Hidrógeno entre los grupos OH del puente dicetona de la curcumina y los aminoácidos polares del péptido (182), este acoplamiento molécula-péptido genera fluctuaciones significativas en la organización terciaria de los aminoácidos en el dominio VHHQKLVFF del A β (206), el cual es fundamental en su agregación, por lo que el tratamiento previene la agregación, principalmente de las isoformas A β 40, A β 42, y disminuye la formación de oligómeros y fibrillas, manteniendo el A β en su forma oligomérica no tóxica (207).

5.2.4 Actividad anti-agregante de la proteína TAU

La formación de ovillos neurofibrilares se correlaciona directamente con la neurodegeneración al causar la pérdida del transporte axonal y alteraciones en la neurotransmisión. Se ha encontrado que la curcumina inhibe las quinasas a GSK-3 β (197) ERK1 / 2 y p38, quinasas involucradas en la hiperfosforilación de Tau (208). Otro efecto del tratamiento con esta molécula es la disociación de los NFT a monómeros de Tau por la unión del polifenol y p-Tau, causando un desacoplamiento de las fibrillas (209), lo cual está asociado con la disminución de niveles de p-Tau, pero no de Tau total (210), probablemente porque no interfiere con la expresión de la proteína, pero sí con sus vías de fosforilación.

5.2.5 Actividad de Protección mitocondrial

La disfunción mitocondrial causa una reducción de la producción de energía en las células, activación glial y la activación de vías apoptóticas intrínsecas, y se ha encontrado que la disfunción mitocondrial se relaciona fuertemente a la muerte neuronal. Los resultados de investigaciones *in vitro* demostraron que la curcumina disminuye la disfunción mitocondrial al mantener el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), y la actividad de los cuatro

complejos mitocondriales (complejos I, II, III y IV) por disminución de ERO (200). También se ha encontrado que la curcumina aumenta la fusión mitocondrial, la biogénesis mitocondrial, y la producción de ATP_γ y reduce la mitofagia, la fisión mitocondrial, la presencia citoplasmática del citocromo c, activación de caspasa 3 y 9 y el ratio Bax/Bcl-2, lo que disminuye la expresión de factores de daño neuronal, reduce la apoptosis y la atrofia (196-211).

5.2.6 Actividad Neuroprotectora Colinérgica

Actualmente los medicamentos anticolinesterásicos son los más usados para el tratamiento de EA, al ser el grupo neuronal más afectado por la EA. En diversos estudios la curcumina ha inhibido la acción de las enzimas AChE y BChE (213) al interactuar los 2 anillos aromáticos de la curcumina con los sitios cuaternarios y periféricos CAS y PAS de la AChE y BChE. Adicionalmente, los enlaces de hidrógeno estabilizan aún más el complejo curcumina-AChE, lo que regula a la baja la degradación de ACh (193). En un estudio *in vivo* en modelos murinos también se informó el potencial anti amnésico e inhibidor de la AChE del tratamiento con curcumina (226). Este estudio informó una pronunciada actividad inhibidora de la AChE dependiente de la dosis, especialmente en la corteza frontal y la región del hipocampo (214). La mejoría de la memoria probablemente es causada por la recuperación de circuitos neuronales colinérgicos asociados con la producción de señales de potenciación a largo plazo (LTP) (214).

CAPÍTULO VI: EL TRAMIPROSATO COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA EA

6.1. Estructura química y características del Tramiprosato

El tramiprosato, homotaurina o ácido 3-amino-1-propanosulfónico es un pequeño compuesto de amino sulfonato que se encuentra naturalmente en las algas marinas (216). La molécula es un análogo sintético de la taurina, un ácido sulfónico semi esencial derivado de la cisteína, pero con un carbono extra en su cadena principal. A nivel biológico es un mimético de los glicosaminoglicanos y posee actividad GABAérgica por su similitud estructural con el neurotransmisor GABA (ácido γ -aminobutírico) (218). El principal metabolito del metabolismo del tramiprosato es el ácido 3-sulfo propanoico (3-SPA), el cual está presente endógenamente en el cerebro, aunque se desconoce su función o vía metabólica, compartiendo ambas moléculas sus propiedades farmacológicas (219) (figura 5). Por su tamaño y grupos funcionales, el compuesto es fácilmente absorbido por el intestino, atravesando fácilmente la BHE, además de poseer una alta biodisponibilidad, fácil administración (oral) y pocos efectos adversos, por lo que es un buen candidato para su posible uso terapéutico en la EA.

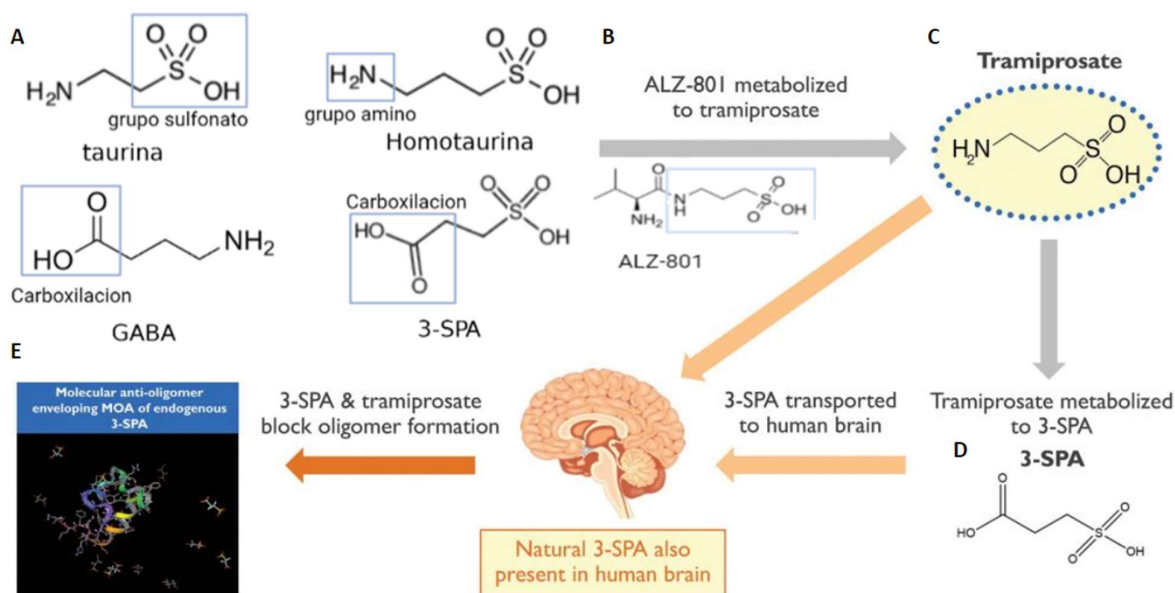


Figura 20. Estructura química y metabolismo del tramiprosato (Homotaurina). (A) Estructura química del tramiprosato y similitud estructural con las moléculas Taurina, GABA y 3-SPA; (B) Metabolismo del

profármaco ALZ-801, este medicamento posee propiedades farmacocinéticas y tolerabilidad gastrointestinal mejorada, (C) El ALZ-801 al ser metabolizado por el hígado se transforma en tramiprosato. (D) Parte del tramiprosato se metaboliza en ácido 3-sulfo propanoico (3-SPA), un metabolito endógeno. (E) finalmente el tramiprosato y el 3-SPA atraviesan la BHE y se une al A β , evitando su oligomerización. Modificado de ref: (216,217).

6.2. Actividades biológicas y mecanismos de acción del tramiprosato en la EA

El tramiprosato y sus derivados han sido estudiados para su posible uso en enfermedades neurodegenerativas por sus mecanismos neuroprotectores que involucran tanto vías GABAérgicas como no GABAérgicas (figura 21). En estudios recientes se ha demostrado que el tramiprosato tiene efectos neuroprotectores *in vitro* por su capacidad de disminuir la amiloidosis (36) (figura 20) y la producción de la citoquina proinflamatoria IL-18 (183), además por su potencial antioxidante, evitando la genotoxicidad en el DNA relacionada con las ERO (220).

A nivel clínico se ha observado que el tratamiento con el fármaco análogo a la homotaurina ALZ-801 mejoró la memoria a corto plazo en pacientes con DCL homocigotos para ApoE4 (221), desaceleró la atrofia hipocampal en pacientes con EA (202), e incrementó la LTP y la inhibición aferente de latencia corta, lo que indica un mejoramiento de la transmisión de las interneuronas GABAérgicas y de las neuronas colinérgicas, la cual es dependiente de receptores colinérgicos M1 (36). Estos hallazgos indican (222) que el tramiprosato podría ser una terapia prometedora para disminuir la neurodegeneración y los síntomas clínicos en etapas tempranas de EA en pacientes $\epsilon 4/\epsilon 4$.

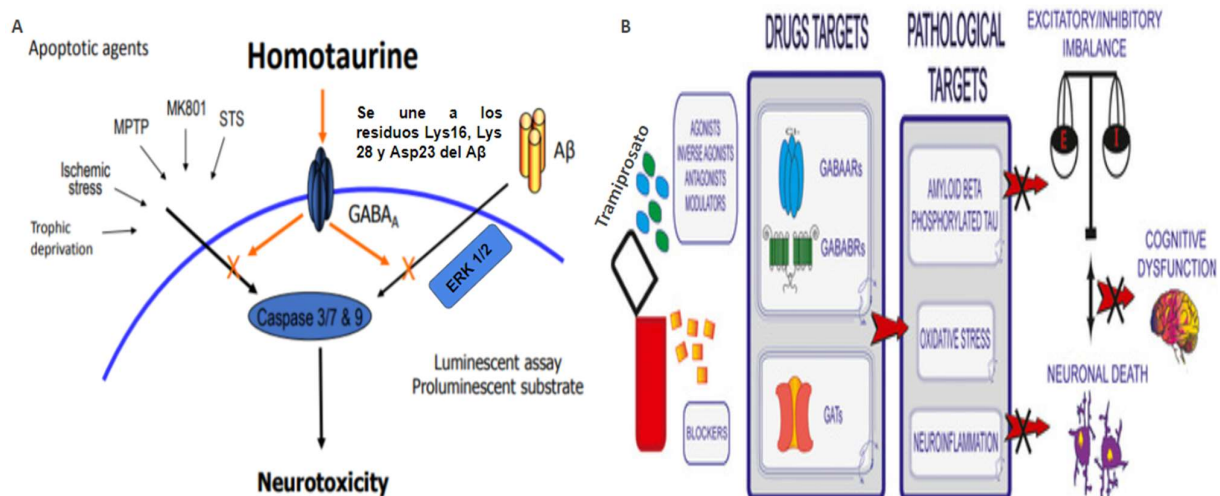


Figura 21. Mecanismos de neuroprotección del tramiprosato. (A) Mecanismos dependientes de la función agonista del tramiprosato en los receptores GABAérgicos, (B) mecanismos independientes de GABA, interacción del tramiprosato con A β y Tau. Tomado de ref: (223,52).

6.2.1. Actividad anti-amiloideogénica

En estudios *in vitro*, el tramiprosato redujo la formación de oligómeros y fibrillas amiloides (183), y en modelos murinos disminuyó el acúmulo de agregados de A β , los niveles de proteína amiloide soluble y la formación de placas seniles, favoreciendo la concentración de A β 40 de detrimento de A β 42 (225), esto se debe a que la molécula posee alta afinidad por este péptido, ocupando los sitios de unión con otros A β (figura 21), lo que impide su oligomerización, manteniendo los péptidos de forma monomérica (224). Además, en los pacientes con EA los niveles plasmáticos de A β decrecieron de manera dependiente de la dosis, por lo que podría estar involucrado en procesos de degradación del péptido. Esto explica en parte la mejoría cognitiva en etapas tempranas de EA, pero no en las etapas tardías, al causar la disminución de la formación de agregados intra y extracelulares de A β , antes de que ocurra un daño neuronal irreversible.

6.2.2. Actividad Neuroprotectora

Una de las características más llamativas del tramiprosato es su habilidad de incrementar la supervivencia celular, se ha encontrado que en neuronas primarias tratadas con A β 42, este compuesto redujo la actividad de las caspasa 3/7 y 9 tanto a nivel basal como en presencia de A β 42 (226), siendo un compuesto anti apoptótico que inhibe la vía de las caspasas (figura 21), aumentada en EA, lo cual disminuye la mortalidad celular. Además, también inhibe la activación de las quinasas activadas por mitógenos (ERK1 / 2) inducidas por las fibrillas de A β de forma independiente del receptor GABA-A (227), regulando la vía de las MAPK quinasas, lo que podría tener efectos anti inflamatorios al disminuir el fenotipo de la glía a perfiles proinflamatorios y regular negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias.

6.2.3. Actividad GABAérgica

Por su similitud química al neurotransmisor GABA el tramiprosato es un agonista de los receptores GABA-A (GABA α R), los cuales son receptores ionotrópicos que, en presencia de su ligando GABA, funcionan como un canal iónico para el ingreso intracelular de cloro y

bicarbonato. En la EA existe una disfunción del circuito GABAérgico y una insuficiencia del neurotransmisor (52), por lo que el tramiprosato podría disminuir las alteraciones en estas vías de señalización (228), al activar estos receptores, lo que aumentaría la repolarización celular, incrementaría el umbral de activación neuronal y restablecería el ratio de excitación/inhibición, lo que disminuye la excitotoxicidad por glutamato observada en la EAE (226,52). Adicionalmente, en neuronas de ratas se ha encontrado que el tramiprosato se une a los receptores GABA_AR, bloqueando la activación de la caspasa 3/7 por inhibición de vías quinasas como ERK 1/2 (183), por lo que la unión del compuesto con el receptor se asocia al mantenimiento de la viabilidad celular por disminución de vías apoptóticas activadas por caspasas.

CAPÍTULO VII: EL AZUL DE METILENO COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA EA

7.1. Estructura química y características del Azul de metileno

El azul de metileno, también conocido como MB o cloruro de metiltionina, es un compuesto aromático heterocíclico, su nombre químico es (7-(dimetilamino) fenotiazin-3-iliden) - dimetilazanio; cloruro, y su fórmula molecular es $C_{16}H_{18}ClN_3S$ (245). El MB es una fenotiazina compuesta por una estructura de tres anillos, en la que dos anillos de dimetilfenilamina o dimetilnilina se unen por un átomo de azufre y de nitrógeno en posiciones opuestas, formando un derivado benzóico de la tiazina en presencia de sales de cloruro (Figura 22). Su principal uso es como colorante catiónico histológico que, en su estado oxidado es de color azul, mientras que es incoloro en su forma reducida (azul de leucometileno). Formando ambos compuestos un sistema redox reversible (230).

El MB posee un carácter apolar y en su forma reducida atraviesa la BHE, pasando por difusión pasiva la membrana plasmática de las neuronas, lo que le permite alcanzar múltiples dianas celulares relacionadas con la EA, lo cual sumado a su clasificación como medicamento esencial lo hace una molécula atractiva para la investigación de tratamientos para la EA (176).

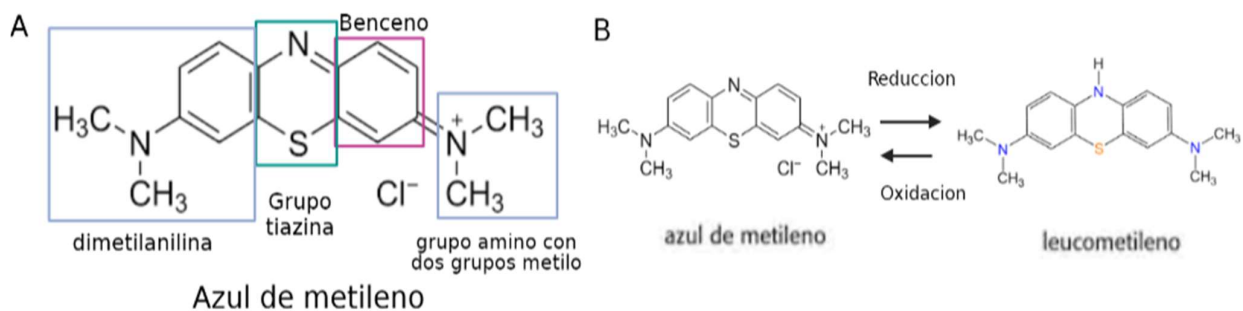


Figura 22. Características químicas del Azul de Metileno (Methylene Blue, MB). (A) Grupos funcionales (B) Equilibrio Redox. Modificada de ref: (229).

7.2. Actividades biológicas y mecanismos de acción de Azul de metileno en la EA

Actualmente el MB tiene múltiples aplicaciones clínicas, siendo empleado como tratamiento para afecciones como metahemoglobinemia, hipoxia, y síndrome vasopléjico (231), lo cual se debe a que esta molécula es antioxidante, potenciadora de la cadena transportadora de electrones, inhibidora enzimática y formadora de complejos proteicos. En relación con la

EA (fig 23) se ha encontrado que el MB puede disminuir la expresión de BACE-1, así como promover la fibrilación del A β , inhibiendo así la formación de oligómeros de A β neurotóxicos, (232), (230). En estudios *in vivo* en modelos murinos para EAF se halló que el tratamiento con MB mejoró síntomas como la memoria y la actividad de locomoción, (233).

Investigaciones recientes han reportado que el MB puede reducir la recaptación de serotonina al inhibir la monoaminoxidasa (234), adicionalmente en modelos *in vitro* esta molécula reduce la actividad de la AChE y BChE (235) y regula negativamente la expresión de caspasa-6 (237), siendo una alternativa terapéutica para mejorar los síntomas depresivos, la disfunción colinérgica y la muerte neuronal respectivamente (237). Adicionalmente se ha encontrado que el MB modula la despolarización de la membrana neuronal al inhibir canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de Ca²⁺ (233), disminuyendo la excitotoxicidad por glutamato, por lo que podría ayudar en el tratamiento de la disfunción iónica presente en la EA, al mejorar la transmisión neuronal.

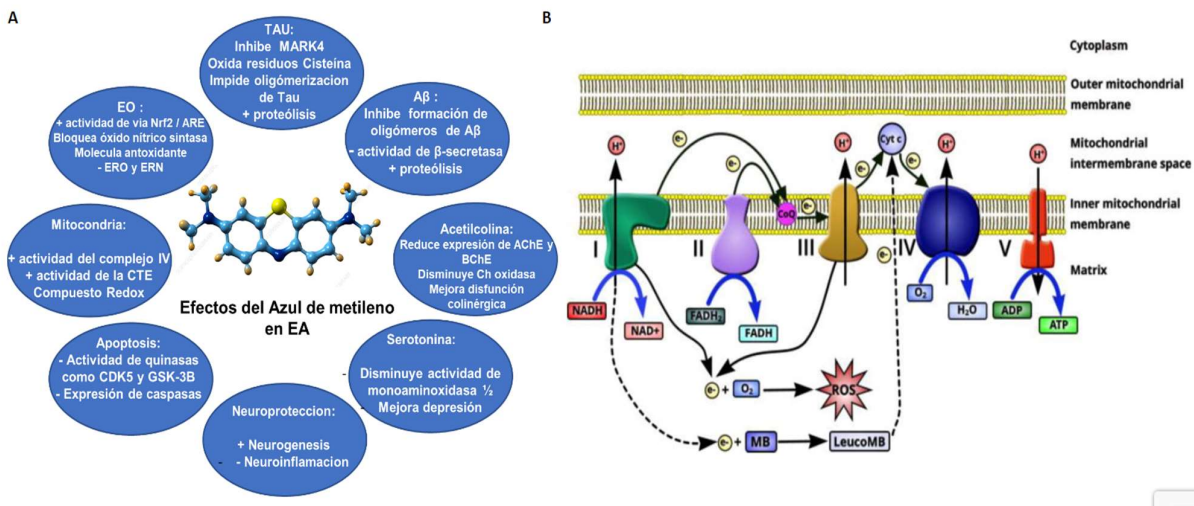


Figura 23. Mecanismos de neuroprotección del MB en la EA. (A) vías moleculares que interviene el MB. **(B)** efectos del MB en la cadena transportadora de electrones. Tomado de ref (238,237).

7.2.1 Actividad anti-agregante de la proteína TAU

En múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* se demostró la capacidad del MB de inhibir la formación de fibrillas de Tau. En estudios *in vitro* se observaron efectos antiagregantes de la proteína Tau a través de la estabilización de la conformación monomérica por medio de

la unión con puentes disulfuro entre la fenotiazina del MB y Tau, impidiendo su autoagregación (176). Este colorante también promueve la oxidación de residuos de cisteína de la proteína Tau, lo que mantiene la proteína en su forma monomérica e inhibe la formación de NFT (176).

En otra investigación se observó que el MB inhibe la fosforilación de Tau, al regular negativamente e inhibir a la quinasa reguladora de la afinidad de los microtúbulos (MARK4), impidiendo la adición de grupos fosfato en el residuo Ser 262 de Tau, lo que estabiliza su forma dimérica e impide su agregación (233). El MB también ha disminuido la taupatía *in vivo* cuando se administra a ratones P301L y atenúa la neurotoxicidad en un modelo de taupatía en *Caenorhabditis elegans* (176,233).

En modelos de ratón con mutaciones en Tau se demostró que el MB reduce los niveles de oligómeros de Tau, activando el sistema proteosomal y los mecanismos de autofagia celulares (236), sin embargo, no disminuye los niveles de NFT (176). Por lo tanto, se demostró que el MB estabiliza los monómeros fosforilados, aumenta la degradación de oligómeros de Tau y disminuye la expresión de enzimas relacionadas con su fosforilación, mejorando así el transporte axonal (233).

Estos resultados indican que el MB es un compuesto ideal para la investigación de terapias en enfermedades neurodegenerativas en las que la taupatía es un mecanismo patológico, como en la EA y en la demencia frontotemporal, al impedir la formación de oligómeros tóxicos de Tau y favorecer la degradación de los mismos.

7.2.2 Actividad antioxidante

Existe una gran evidencia de que el MB disminuye el EO en el SNC. En estudios *in vivo* se evidenció que esta molécula es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, lo que disminuye la producción de NO, el daño nitroxilativo y causa el bloqueo de la vía de óxido nítrico-GMP, la cual está implicada con aumento intracelular de calcio, mitofagia y disminución de la efectividad de los complejos I y III de la respiración mitocondrial (239).

Adicionalmente, el MB por su capacidad redox puede reducir el NO y aumentar la actividad del complejo IV de la cadena transportadora de electrones, al servir de aceptor/donador de electrones entre el complejo I y el citocromo c, (figura 23), sirviendo de catalizador en el transporte de electrones, lo cual aumenta la producción de ATP y restaura la función mitocondrial y neuronal (237, 239).

De igual forma, se demostró en otros estudios que este compuesto aumenta la producción de H_2O_2 de manera benigna, lo que activa el sistema de defensa antioxidante, al incrementar la expresión del factor 2 relacionado con el eritroide nuclear 2 (Nrf2), un factor de transcripción que se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE). Un acelerador de la transcripción de genes relacionados con la defensa del EO (239,240), aumentando la producción de enzimas que degradan las ERO como la superóxido dismutasa (239), por lo que el MB disminuye los daños derivados del EO en la EA al favorecer la función mitocondrial, bloquear enzimas productoras de ERN, servir de donador de electrones para ERN y promover la expresión de enzimas que disminuyan las ERO y ERN (176, 239,240).

PARTE II: INVESTIGACIÓN

CAPITULO VIII: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

La EA es el trastorno neurodegenerativo más común a nivel mundial, representando entre el 60% y el 80% de los casos de demencia. Actualmente el número de afectados oscila entre 37.8 y 51 millones, y se estima que la cifra se triplique para el 2050 (10,12), siendo en 2019 la EA y otras demencias la causa número 7 de muerte a nivel mundial, pasando de 600.000 fallecimientos en 2000 a 1.6 millones en la actualidad (14). Para el año 2030 se calcula que los gastos derivados de las demencias aumenten hasta los 2 trillones de dólares, representando un grave problema económico y de salud pública (242).

La situación de Colombia plantea retos particulares, debido a su alta prevalencia de demencias y principalmente la demencia tipo EAF, y a la carencia de datos estadísticos sobre la prevalencia de la EA en la población. Durante el 2016 hubo en el país aproximadamente 248.583 casos de demencia (15) y en el territorio se han identificado múltiples mutaciones en PSEN1, causantes de la EAF en un rango temprano de aparición entre 30-60 años de edad (91). Estas mutaciones fueron la Ile143Thr (I143T), Glu280Ala (E280A), Glu318Gly (E180G) y Pro117Ala (P117A) (25). Siendo la mutación E280A la causa más frecuente de EAF a nivel nacional y mundial con 6000 personas de 25 familias de Antioquia, de las que se estima que 1000 individuos poseen la mutación (40).

A pesar de los avances en el entendimiento de la etiología de la enfermedad con modelos *in vitro* e *in vivo* unificar en todo el texto en *itálica*, y de los múltiples ensayos clínicos que buscan desarrollar una terapia para la EA, hasta ahora no se ha podido determinar con exactitud las causas ni los mecanismos de señalización que conducen a la muerte neuronal en los pacientes (32,65). Es por lo anterior, que se hace necesario generar nuevos modelos de estudio que permitan una mayor comprensión de la EA (129). En el caso de modelos *in vivo* de ratones transgénicos con expresión de genes inductores de proteinopatías como APP, PSEN1 y Tau son los más utilizados en la actualidad (122). Sin embargo, al presentar un fenotipo acelerado de la enfermedad no replican fielmente el desarrollo de la EAE ni todos sus

mecanismos patológicos (123). Asimismo, por la divergencia genética entre especies no es un modelo preciso para el estudio de screening farmacológico (242).

Al analizar los modelos *in vitro*, los cultivos primarios de neuronas poseen un limitado número de pases viables, además de obtenerse sólo de forma postmortem o por biopsias, lo que plantea debates éticos y hace difícil su obtención. Otro modelo utilizado son las líneas celulares inmortalizadas, sin embargo, estos modelos presentan la desventaja de expresar patrones genéticos diferentes a las células *in vivo* por lo que es posible que al comparar su comportamiento y funcionalidad, este sea diferente al de los tipos celulares de interés, lo cual dificulta su uso para el estudio de mecanismos patológicos y aproximaciones terapéuticas (242). El uso de células madre embrionarias e iPSc también plantea retos, ya que al ser células altamente indiferenciadas tienen la tendencia a formar tumores (243).

Tomando en consideración las observaciones anteriores Un modelo alternativo más idóneo para el estudio de la EAE sería el uso de CME, las cuales tienen la capacidad de diferenciación a células de linaje mesodérmico (154,157), y que por medio de compuestos químicos y biológicos tienen la habilidad de transdiferenciarse a células del SNC como neuronas colinérgicas, dopaminérgicas y astrocitos (124,163). Estas células son fáciles de obtener, no poseen tendencias a la formación de teratomas y tienen el mismo genotipo que el de los pacientes con la patología, lo que favorece su uso como una plataforma robusta para el estudio de los mecanismos neuropatológicos de la EA, así como su uso en el diseño de aproximaciones terapéuticas y farmacológicas, facilitando el desarrollo de la medicina de precisión en enfermedades neurodegenerativas (97,163).

En relación al desarrollo de modelos de neurodegeneración, diferentes estudios realizados a trabajadores agrícolas expuestos a pesticidas de forma ocupacional hallaron un aumento drástico en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas (228). Por ejemplo, en Francia el estudio longitudinal AGRICAN (229) determinó la correlación entre la exposición ocupacional a pesticidas como la rotenona y el desarrollo de enfermedad de parkinson. Estos hallazgos han permitido el descubrimiento de sustancias químicas inductoras de EA como modelo de estudio. al inducir en modelos neuronales los mecanismos patológicos observados en los

cerebros de los pacientes con EA (140), estos presentan múltiples ventajas en comparación a otros modelos como su bajo precio, facilidad de utilización, uso de modelos animales y neuronales no transgénicas para investigación, emulación del desarrollo de EAE y posibilidad de estudiar múltiples mecanismos patológicos a la vez. Una de las moléculas más utilizadas en este contexto es la rotenona (143), la cual es un inhibidor del complejo 1 mitocondrial que en estudios recientes se ha observado que provoca acumulación de A β , hiperfosforilación de Tau, disfunción mitocondrial, alteraciones colinérgicas y muerte neuronal en modelos *in vivo* e *in vitro*. Siendo una plataforma que permite replicar fácilmente los mecanismos implicados en el desarrollo de la EAE (148,150).

Actualmente no existe un tratamiento que haya logrado revertir o detener la neurodegeneración o la progresión de la demencia en los pacientes con EA (169), y las aproximaciones terapéuticas actuales apuntan a la medicina preventiva, desarrollando aproximaciones terapéuticas para EAF y EAE para su uso hasta 20 años antes del inicio previsto de los síntomas (112), debido a que las investigaciones han arrojado que el daño neuronal inicia décadas antes del DCL y para cuando los pacientes presentan manifestaciones clínicas, el daño neuronal está demasiado extendido para controlarlo o revertirlo. En este sentido, es necesaria la búsqueda e investigación de nuevos posibles compuestos farmacéuticos que puedan ser usados en la etapa prodrómica de la EA (174).

Para el tratamiento de la EA se ha reportado en la literatura científica que moléculas pequeñas, como extractos de plantas o compuestos de origen orgánico, entre ellos la curcumina, el azul de metileno y el tramiprosato, tienen el potencial de intervenir simultáneamente en múltiples vías asociadas con la EA (169) por sus capacidades antiamiloidogénicas, antiagregantes de Tau, antioxidantes, antiinflamatorias y quelantes (237). Los dos primeros han demostrado la capacidad de disminuir la acción de enzimas productoras de ERO o ERN como iNOS, inhibir la AChE, disminuir las EROs por reacciones Redox, incrementar la expresión de elementos de respuesta antioxidante Nrf2 / ARE, y facilitar el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (180-238), siendo la curcumina un compuesto antiamiloidogénico con propiedades antiinflamatorias (12), mientras que el MB es un potente inhibidor de la formación de fibrillas de Tau (176). Por otro lado, el

tramiprosato al ser un agonista del receptor GABA-A mejora la disfunción de las neuronas GABAérgicas y bloquea la vía de activación de caspasas de forma dependiente e independiente de GABA, asimismo reduce la activación tanto de quinasas que causan hiperfosforilación de Tau como de vías proinflamatorias como las ERK1 / 2 y MAPK, además de impedir la formación de fibrillas amiloides (183-184). Por lo que los 3 compuestos actúan sobre diferentes mecanismos patológicos en la EA, siendo complementarios en sus mecanismos de acción, por lo que son alternativas terapéuticas promisorias para futuros tratamientos contra esta patología.

Dentro de este contexto, la CME transdiferenciadas a neuronas colinérgicas expuestas o no a la rotenona (ROT) son una buena aproximación metodológica para establecer un modelo natural de la EAE. Asimismo, con el conocimiento de las características biológicas y los mecanismos de acción de los compuestos curcumina, tramiprosato y azul de metileno en la reducción de la neuropatología de la EA, los hacen estrategias promisorias terapéuticas para combatir la EA. Con esta información surge la pregunta de investigación: **¿Puede el Tratamiento Individual o combinado con los agentes terapéuticos Curcumina, Tramiprosato y Azul de metileno conferir resistencia al EO, la disfunción mitocondrial, la disfunción colinérgica, la activación de la vía intrínseca de la apoptosis y la hiperfosforilación de TAU en un modelo neuronal colinérgico CSNC sanas y con EAE inducido por rotenona?**

CAPÍTULO IX: DESARROLLO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

9.1. Hipótesis

El Tratamiento Individual o combinado con los agentes terapéuticos Curcumina, Tramiprosato y Azul de metileno conferirá resistencia al EO, la disfunción mitocondrial, la disfunción colinérgica, la activación de vías apoptóticas y la hiperfosforilación de TAU en un modelo neuronal colinérgico CSNC expuesto o no a la rotenona.

9.2. Objetivos del proyecto

9.2.1 *Objetivo general*

Evaluar moléculas con potencial terapéutico en un modelo neuronal colinérgico (CSNC) expuesto a la Rotenona como neurotoxina que simula el desarrollo de EAE

9.2.2 *Objetivos específicos*

1. Caracterizar células mesenquimales estromales de cordón umbilical (CME-CU) transdiferenciadas a células semejantes a neuronas colinérgicas (CSNC/CSNC).
2. Evaluar el efecto individual o combinado de la curcumina, tramiprosato, y azul de Metileno (MB) en función de la viabilidad celular en CSNC.
3. Caracterizar el efecto de la rotenona (ROT) en el modelo de estudio CSNC de la EAE en función de $\Delta\Psi_m$, la producción de H_2O_2 , la oxidación de la proteína sensor DJ-1, la fosforilación de la proteína Tau Ser202/ Thr205, la presencia de los marcadores proapoptóticos P-c-Jun y CASP3. y el flujo de la entrada de Ca^{2+} mediado por acetilcolina.
4. Evaluar el efecto individual o combinado de la Curcumina, Tramiprosato, y MB en CSNC en función del $\Delta\Psi_m$, la producción de H_2O_2 , la oxidación de la proteína sensor DJ-1, la fosforilación de la proteína Tau Ser202/ Thr205, la presencia de los marcadores proapoptóticos P-c-Jun y CASP3. y el flujo de la entrada de Ca^{2+} mediado por acetilcolina.

5. Caracterizar el efecto de la terapia combinada de curcumina, tramiprosato y en el modelo de estudio CSNC de la EAE expuesto a rotenona. en función. del $\Delta\Psi_m$, la oxidación de la proteína sensor DJ-1, la fosforilación de la proteína Tau Ser202/ Thr205, la presencia de marcadores proapoptóticos P-c-Jun y CASP3. y el flujo de la entrada de Ca^{2+} mediado por acetilcolina

CAPÍTULO X: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

10. Materiales y métodos

10.1 Ensayo de transdiferenciación de CME-CU a Células similares a Neuronas colinérgicas (CSNC)

La diferenciación de CSNC se realizó según la ref (136). Se sembraron MSC-CU WT (54160) a $1-1,5 \times 10^4$ células/cm² en placas de cultivo tratadas con laminina durante 48 h en medio de cultivo regular (RCm 10% SFB). Se retiró el medio y las células se incubaron en medio de diferenciación colinérgica (medio Colinergic-N- Run, en adelante Ch-N-Rm) que contenía medio DMEM/F-12 11 Nutrient Mixture (Gibco cat# 10565018; 1204 N Western St, Suite C, Amarillo, TX, USA), 10 ng/mL de proteína humana recombinante del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Gibco Cat# 13256029), 50 µg/mL de heparina sódica (Hep, Sigma-Aldrich cat# H3393; 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA), 50 µg/mL de heparina sódica (Hep, Sigma-Aldrich cat# H3393; 3050 Spruce Street, St.) Louis, MO 63103, USA), 0,5 µM de ácido retinoico, 50 ng/mL de péptido sonic hedgehog (SHH, Sigma cat# SRP3156) y 1% de SFB a 37 °C durante 7 días. Dado que el medio Ch-N-Rm contiene varios factores que podrían interferir en la interpretación y las mediciones del experimento, las CSNC (obtenidas tras 7 días en Ch-N-Rm) se dejaron en medio de cultivo normal (RCm) durante 4 días adicionales después de la transdiferenciación.

La evaluación inicial del efecto de la curcumina, el tramiprosato y el azul de metileno (MB en adelante) se realizó mediante el ensayo de viabilidad celular MTT al menos dos veces por triplicado a concentraciones entre 0,1 y 10 µM para la curcumina, 0,1 y 10 µM para el MB y 25 y 1000 µM para el tramiprosato. Posteriormente, la curcumina (1 y 10 µM), el MB (0,25 y 0,5 µM) y el tramiprosato (50 y 250 µM) se establecieron como las concentraciones óptimas para las evaluaciones posteriores. Para los experimentos de medición de formación de H₂O₂, $\Delta\Psi_m$, análisis de inmunofluorescencia y medición intracelular de calcio los CSNCs se dividieron en 4 grupos expuestos por 4 días: (I) sin tratar; (II) tratadas con el agente neurotóxico rotenona 50 µM (dejada por 6 horas al final de la incubación experimental); (III) tratados con una concentración individual baja (1 µM para la Curcumina, 0,25 µM para el MB y 50 µM para el tramiprosato) o alta (10 µM para la Curcumina, 0,5 µM para el MB y 250 µM para el tramiprosato) y (IV) incubados con una combinación de tratamientos (1 µM de Curcumina + 0,25 µM de MB, 1 µM de Curcumina

+ 50 μM de tramiprosato, 0,25 μM de MB + 50 μM de tramiprosato y 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB. (Se seleccionaron las concentraciones bajas de cada molécula para disminuir la citotoxicidad).

Posteriormente para analizar el efecto de la terapia combinada en un modelo rotenona para EAE las CSNCs se dividieron en 4 grupos incubados durante 6 horas: (I) sin tratar; (II) tratadas con el agente citotóxico rotenona a 50 μM ; (III) tratados con la terapia combinada 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB. (IV) tratados con la terapia combinada (1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB) y la rotenona a 50 μM de forma simultánea.

10.2 Evaluación de marcadores Colinérgicos mediante microscopía de fluorescencia

La evaluación de los marcadores de linaje colinérgico se realizó exactamente como se describe en este artículo (62). Brevemente, las células CME incubadas en DMEM bajo en glucosa con 10 % SFB y las células transdiferenciadas con el medio Ch-N-Rm durante 7 días se fijaron con 3,7 % de paraformaldehído durante 20 minutos, luego se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,2 %) y se bloquearon con % 5 de albúmina de suero bovino (BSA). Las células se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios para el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT, cat# SAB4200559, Sigma-Aldrich) y para colina acetiltransferasa (ChAT, cat# AB144 P, Millipore), tras un lavado exhaustivo, incubamos las células con anticuerpos fluorescentes secundarios (DyLight 488 y 594 anti-conejo, -cabra y -ratón, cat DI 1094, DI 3088 y DI 2488, respectivamente) a 1:500. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 331 1 μM . La evaluación se repitió tres veces en experimentos independientes (124, 163).

10.3 Análisis de viabilidad celular por medio de espectrofotometría.

El efecto citotóxico de cada compuesto se determinó mediante el ensayo de bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las CSNC se trataron a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células por pocillo con las concentraciones deseadas de los compuestos curcumina (0.1, 0.5, 1, 1, 5, 10 μM) MB (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1, 3, 5, 10 μM) y tramiprosato (25, 50, 100, 250, 500, 1000 μM) durante 96 horas con RCm. Se evitó la luz durante todo el transcurso del experimento. Se añadieron aproximadamente 150 μL de solución de MTT (0,5 mg de MTT/ ml de PBS) al cultivo de CSNC en una placa de pocillos 24. Las células tratadas con MTT se incubaron a 37°C en un

incubador de CO₂ humidificado durante 3 horas, lo que permitió el desarrollo de cristales de formazan púrpura. Posteriormente se añadieron 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazan formados (246). La absorbancia se leyó utilizando un espectrofotómetro de microtitulación UV a una longitud de onda de 562 nm. El porcentaje de supervivencia se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{((\text{Absorbancia del tratamiento} - \text{Absorbancia del objetivo}) / (\text{Absorbancia del control negativo} - \text{Absorbancia del objetivo})) * 100}{(258)}$$

10.4 Evaluación de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante microscopía de fluorescencia.

Para evaluar los niveles intracelulares de H₂O₂ utilizamos diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (5 µM, DCFH₂-DA; Invitrogen, 168 Third Avenue. Waltham, MA, USA) según la ref. (58 Soto-Mercado et al., 2020). Las CSNCs se dejaron en RCm con el tratamiento durante 4 días. Después, las células (1,5 × 10⁴) se incubaron con el reactivo DCFH₂-DA durante 45 minutos a 37 °C en la oscuridad. A continuación, se lavaron las células 3 veces con PBS y se determinó la intensidad de la fluorescencia DCF mediante el análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia. La evaluación se repitió tres veces en experimentos independientes. Los núcleos se tiñeron con el compuesto de tinción Hoechst 33.342 0,5 µM. La evaluación se repitió tres veces en experimentos independientes sin tener en cuenta al experimentador (124, 163).

10.5 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por microscopía de fluorescencia.

Las CSNCs se dejaron en medio de cultivo regular (RCm) durante 4 días. A continuación, las células (1,5 × 10⁴) se incubaron con el compuesto rojo brillante MitoTracker que difunde pasivamente y se acumula en las mitocondrias activas (20 nM, concentración final) durante minutos 45 a 37 °C en la oscuridad (Invitrogen, cat # M22426, 168 Third Avenue. Waltham, MA, USA) (62). A continuación, las células se lavaron varias veces 3 con PBS. La intensidad de la fluorescencia del MitoTracker se determinó mediante el análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia (microscopio Floyd Cells Imaging Station, catálogo 4471136, Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue. Waltham, MA, USA). La evaluación se repitió tres veces en

experimentos independientes. Los núcleos se tiñeron con el compuesto de tinción Hoechst 33.342 0,5 μ M. La evaluación se repitió tres veces en experimentos independientes (124, 163).

10.6. Análisis de marcadores de EO, Taupatía, y apoptosis por microscopía de fluorescencia.

El análisis de los marcadores relacionados con la EA, el estrés oxidativo y la muerte celular se realizó exactamente como se describe en este artículo (62). Brevemente, las células tratadas en diferentes condiciones se fijaron con %3,7 de paraformaldehído durante 20 minutos, luego se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,2 %) y se bloquearon con % 5 de albúmina de suero bovino (BSA). Las células se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios contra el marcador de formación de NFT fosfo-TAU (p-Tau, 1:500, Ser202/Thr205, cat# MN1020Cat # MN1020 (AT8) , Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue, Waltham, MA, USA), y el marcador de estrés oxidativo DJ-1 oxidado (1:500; ox(Cys106)DJ-1; residuo de expansión C106 de PARK7/DJ1 humano; oxidado para producir ácido sulfónico de cisteína (SO₃); cat # ab169520, Abcam, Discovery Drive Cambridge Biomedical Campus Cambridge2 0AX, UK). Para evaluar la muerte celular, utilizamos anticuerpos primarios contra el factor de transcripción modulador de la apoptosis, fosfo-c-Jun (1:250; c-June (S63/73) cat# sc-16312, Santa Cruz Biotechnology, 2145 Delaware Avenue, Santa Cruz, CA 95060, USA.), y caspasa-3 (1:250; cat# AB3623, Millipore), tras un lavado exhaustivo, incubamos las células con anticuerpos fluorescentes secundarios (DyLight 488 y 594 anti-conejo, -cabra y -ratón, cat DI 1094, DI 3088 y DI 2488, respectivamente) a 1:500. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 331 1 μ M. La evaluación se repitió tres veces en experimentos independientes (124, 163).

Para todos los ensayos de IF as fotografías de microscopía óptica se tomaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiostart 50 equipado con una cámara digital Canon PowerShot G5 (Zeiss Wöhlk-Contact- Linsen, Gmb Schcönkirchen, Alemania), y las fotografías de microscopía de fluorescencia se tomaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiostart 50 equipado con una Zeiss AxioCam Cm1 y (Zeiss Wöhlk-Contact-Linsfluoreen, Gmb Schcönkirchen, Alemania) y un microscopio Floyd Cells Imaging Station. Las imágenes de fluorescencia se analizaron con el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, consultado el 25 de octubre de 2022). Las imágenes se transformaron en imágenes de 8 bits y se restó el fondo. Se dibujaron regiones celulares de interés (ROI) alrededor del núcleo (para el caso de los factores de transcripción y los efectores de

apoptosis) o de las células en general (para las sondas citoplasmáticas), y posteriormente se determinó la intensidad de fluorescencia aplicando el mismo umbral para las células en las condiciones de control y de tratamiento. La intensidad media de fluorescencia (MFI) se obtuvo normalizando la fluorescencia total al número de núcleos.

10.7. Evaluación de Ca²⁺ intracelular por microscopía de fluorescencia

Los cambios en la concentración de calcio intracelular (Ca²⁺) causados por la estimulación colinérgica se evaluaron según las refs. (63-64 Pap et al., 2009-Sekiguchi et al., 2009) con pequeñas modificaciones. El colorante fluorescente Fluo-3 (Fluo-3 AM; Thermo Fisher Scientific, cat: F1242, 168 Third Avenue. Waltham, MA, USA) se disolvió en DMSO (1 mM) para formar una solución madre. Antes de los experimentos, la solución madre se diluyó en tampón neuronal (tampón NBS en mM: 137 NaCl, 5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1 MgCl₂, pH 7,3 y 22 glucosa). La concentración de trabajo de la sonda fue de 2 μM. Las CSNCs se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con el colorante que contenía NBS y luego se lavaron cinco veces. Los transitorios de Ca²⁺ intracelulares se evocaron mediante acetilcolina (concentración final 1 mM) a los 4 días de la diferenciación. Las mediciones se realizaron con el objetivo 20x del microscopio. Se definieron varias regiones de interés (ROI) (entre 30 y 40) en el campo de visión de la cámara. 10 de las ROIs estaban libres de células, y la intensidad de fluorescencia medida aquí se consideró background de fluorescencia (F_{bg}). Se analizó la variación temporal de la emisión de fluorescencia, y la intensidad de la fluorescencia (que permite determinar los niveles de Ca²⁺ intracelular.) Se representó mediante pseudo colores en la opción Rainbow del software ZEN 3.4. Para calcular los cambios en el promedio de las intensidades de fluorescencia relacionadas con el Ca²⁺, se determinó el valor de F_{bg} a partir de la ROI libre de células, y luego se obtuvieron las intensidades de fluorescencia en reposo (F_{rest}) de las ROI que contenían células como el promedio de los puntos registrados durante un período consecutivo de 10 s antes de la adición de acetilcolina. Los picos de los transitorios de fluorescencia se encontraron calculando la media de seis puntos consecutivos e identificando aquellos puntos que daban el valor medio más alto (F_{max}). Las amplitudes de los transitorios de fluorescencia relacionados con el Ca²⁺ se expresaron en relación con la fluorescencia en reposo ($\Delta F/F$) y se calcularon mediante la siguiente fórmula: $\Delta F/F = (F_{max} - F_{rest}) / (F_{rest} - F_{bg})$. Se utilizó ImageJ para calcular las intensidades de fluorescencia. Los términos de intensidad de fluorescencia se utilizaron como un indicador

indirecto de la concentración de Ca^{2+} intracelular. La evaluación se repitió tres veces en experimentos independientes (136, 184).

Las fotografías de microscopía de fluorescencia se adquirieron usando el microscopio Zeiss Axiostar 50 Fluorescence con cámara Zeiss AxioCam Cm1 y el equipo Floyd Cells Imaging Station. Las imágenes de fluorescencia tomadas en el Zeiss Axiostar fueron editadas ZEN 3.4 Blue edition. Las imágenes resultantes fueron analizadas por el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Las fotografías fueron editadas en el ZEN con los mismos parámetros estandarizados con los controles negativos. Posteriormente se transformaron en imágenes de 8 bits en ImageJ y se halló la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI).

10.8. Análisis estadístico de datos

En este diseño experimental se descongelaron dos viales de MSC (PSEN1-WT y -E280A), se cultivaron y se pipeteó la suspensión celular a una densidad celular estandarizada de $1,5 \times 10^4$ células/cm² en diferentes pocillos de una placa de 24 pocillos. Las células (es decir, la unidad biológica y de observación) se asignaron aleatoriamente a los pocillos mediante una aleatorización simple (método de muestreo sin reemplazo) y luego los pocillos (es decir, las unidades experimentales) se asignaron aleatoriamente a los tratamientos mediante un método similar. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos de las réplicas individuales de los pozos se promediaron para obtener un valor de $n = 1$ para ese experimento y esto se repitió tres veces en un proceso doble ciego para el experimentador y/o el analista para obtener un valor final de $n = 3$. Basándose en la suposición de que los datos de la unidad experimental (es decir el pozo) cumplían con la independencia de las observaciones, se verificó la normalidad de la distribución de la variable dependiente en cada grupo de tratamiento (prueba de Shapiro-Wilk) y su homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), se determinó la significación estadística mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la comparación post hoc de Tukey calculada con el software GraphPad Prism 8.0. Las diferencias entre grupos sólo se consideraron significativas cuando un valor $p < 0,05$ (*), $< 0,001$ (**) y $< 0,001$ (***). Todos los datos se ilustran como media \pm desviación estándar.

CAPÍTULO XI: RESULTADOS

11.1 Las CME-CU transdiferenciadas a CSNC expresan marcadores VAcHT y ChAT colinérgicos.

La transdiferenciación de MSCs a CSNCs conduce a un aumento de la expresión de proteínas presentes en las neuronas colinérgicas relacionadas con la producción y el transporte de acetilcolina. Entre éstas los más relevantes son el transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) y la acetiltransferasa de colina (ChAT), por lo que son utilizadas como marcadores de linaje colinérgico (124,162). Para evidenciar la regulación de estas moléculas después de someter las CME-CU al proceso de transdiferenciación a CSNC se evaluó la expresión de los marcadores colinérgicos VAcHT y ChAT en MSC-CU y CSNCs incubadas durante 7 días con el medio Ch- N- Rm por medio de inmunofluorescencia. En la figura 1 se observa que la expresión tanto de VAcHT (fig. 1I) como de ChAT (fig 1J) era significativamente mayor en CSNCs (fig 1 E-H) en comparación con las MSC-CU (mean respectivamente) (fig 1A-D), lo que avala que el proceso de transdiferenciación con el medio Ch-N-Run de CME-CU a células similares a neuronas de linaje colinérgico (CSNC o ChLN por sus siglas en inglés) fue exitoso. Una vez confirmado el modelo de transdiferenciación colinérgico se quiso determinar el efecto de la rotenona en el desarrollo de las vías neuropatológicas presentes en la EA, así como el potencial neuroprotector individual o combinado de la Curcumina el tramiprosato y el MB en estas vías.

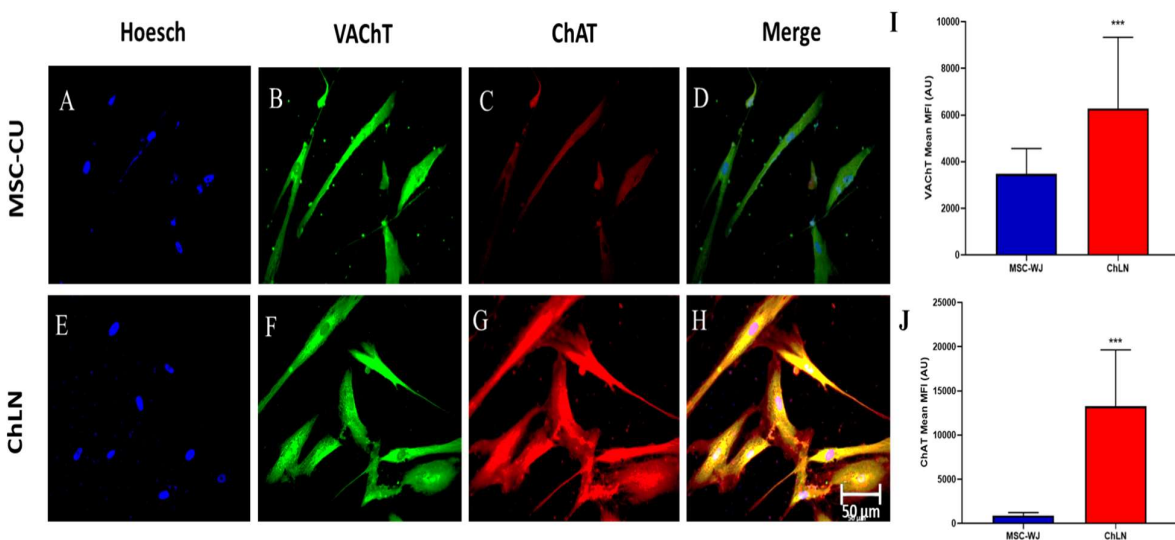


Figura 1. Las CME-CU transdiferenciadas a CSNC expresan marcadores VAcHT y ChAT colinérgicos. Las CME-CU (A-D) se cultivaron en Rcm durante 7 días, mientras que Las CSNC (E-H) Fueron cultivadas en Ch- N-Rm

como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días, las células se tiñeron doblemente como se indica en la figura con anticuerpos primarios contra VACHT (B,F) y ChAT (C,G) . Los núcleos se tiñeron con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por el análisis de inmunofluorescencia. **(C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ChAT. **(D)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de VACHT. (H) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoTracker. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, prueba Tukey post hoc. Los datos se presentan como media \pm SD (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

11.2 Los tratamientos con curcumina y tramiprosato no afectan la viabilidad celular, mientras que la rotenona disminuye la viabilidad celular y el Azul de metileno (MB) reduce la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis a partir de 0,5 μ M.

Para determinar el efecto de los tratamientos con curcumina, tramiprosato y azul de metileno sobre la viabilidad celular, se expusieron los CSNC a concentraciones crecientes de estos compuestos durante 4 días, como se muestra en la Figura 2, los tratamientos con curcumina (fig 2A) y tramiprosato (fig 2C) no afectaron a la viabilidad celular a las concentraciones evaluadas ($p > 0.05$), por lo que para los demás experimentos se eligieron 2 concentraciones de curcumina (1 y 10 μ M) y tramiprosato (50 y 250 μ M) para evaluar en los demás experimentos si los efectos son dependientes de la dosis. El azul de metileno redujo la viabilidad celular a concentraciones superiores a 0,5 μ M de forma dependiente de la dosis (fig 2B), por lo que se eligieron las concentraciones de 0.25 y 0.5 μ M para los demás ensayos. Al comparar las CSNC sin tratar con las expuestas a rotenona (fig 2B, 2C) se observa una disminución de la viabilidad celular (100% vs 57 %), causada probablemente por la disfunción mitocondrial ocasionada por el citotóxico, lo que confirma la capacidad de la rotenona en concentraciones de 50 μ M durante 6 horas de inducir muerte celular en las neuronas colinérgicas. Al analizar la viabilidad celular en las terapias combinadas (1 μ M de Curcumina + 0,25 μ M de MB , 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato, 0,25 μ M de MB + 50 μ M de tramiprosato y 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB) (fig 2D) se determinó que la viabilidad celular no era estadísticamente significativa en comparación a las células sin tratar por lo que se mantuvieron sus concentraciones.

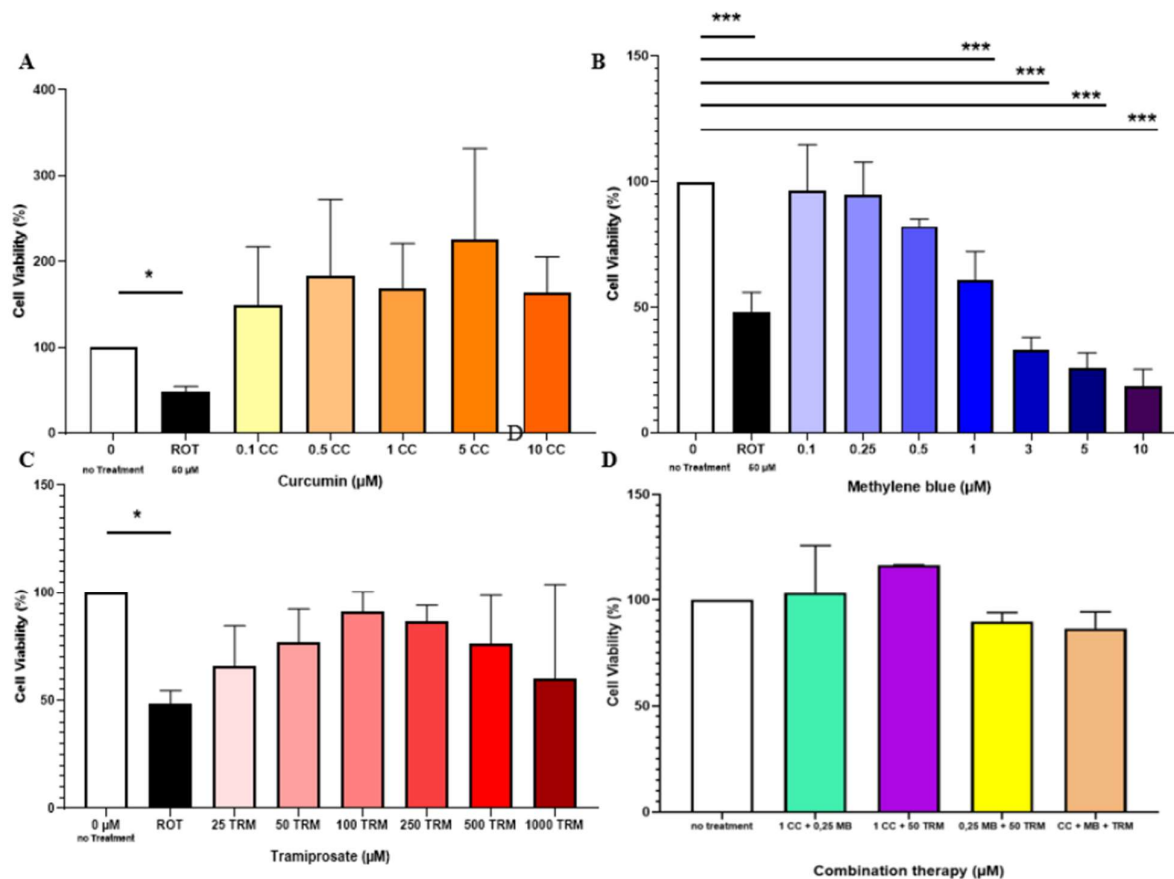


Figura 2. Los tratamientos con curcumina y tramiprosato no afectan la viabilidad celular, mientras que la rotenona disminuye la viabilidad celular y el Azul de metileno (MB) reduce la viabilidad celular de forma dosis dependiente a partir de 0,5 μM . Las WJMSC fueron cultivadas en Ch- N-Rm como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, se cambió el medio por el medio RCM con los tratamientos de curcumina (A) azul de metileno (B) y tramiprosato (C) respectivamente durante 4 días. El tratamiento con rotenona se incubó por 6 horas al final de las 96 horas (A-C). Posteriormente se retiró el medio RCM y se añadieron 200 μL de solución de MTT y se incubaron durante 3 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$, finalmente se añadieron 400 μL de DMSO para diluir los cristales de formazán Cuantificación de la densidad óptica (DO) obtenida por análisis espectrofotométrico. El cálculo de la supervivencia celular se realizó con la siguiente fórmula: (Densidad óptica del tratamiento - Densidad óptica blanca) / (Densidad óptica del control negativo - Densidad óptica blanca) * 100. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, prueba tukey post hoc. Los datos se presentan como media \pm SD (* $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$).

11.3. La rotenona aumenta la producción de EROs y disminuye el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) en las CSNC.

El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son eventos neuropatológicos tempranos en la EA (61,78) derivados de la inhibición de la CTE, lo que provoca la pérdida de $\Delta\Psi\text{m}$ y el

desacoplamiento de electrones, aumentando la producción de H_2O_2 y activando vías apoptóticas. Para evaluar el estrés oxidativo celular se realizó una inmunofluorescencia con la sonda DCF-DA para determinar si la expresión de H_2O_2 es detectable en CSNC y si su producción se ve afectada por el inhibidor del complejo 1 rotenona, como se observa en la figura 3, las CSNC poseen una producción basal de H_2O_2 derivada de la producción mitocondrial de ATP (fig 3A). También se halló que la rotenona aumentó significativamente la producción de H_2O_2 (fig 3H, 3I, 4H, 4J) en comparación con las CSNC sin tratar. La rotenona al inhibir el complejo 1 de la CTE causa un desacoplamiento prematuro de los electrones en la CTE, permitiendo que se unan a moléculas de oxígeno, lo que aumentaría la presencia de EROs como el peróxido de hidrógeno (149).

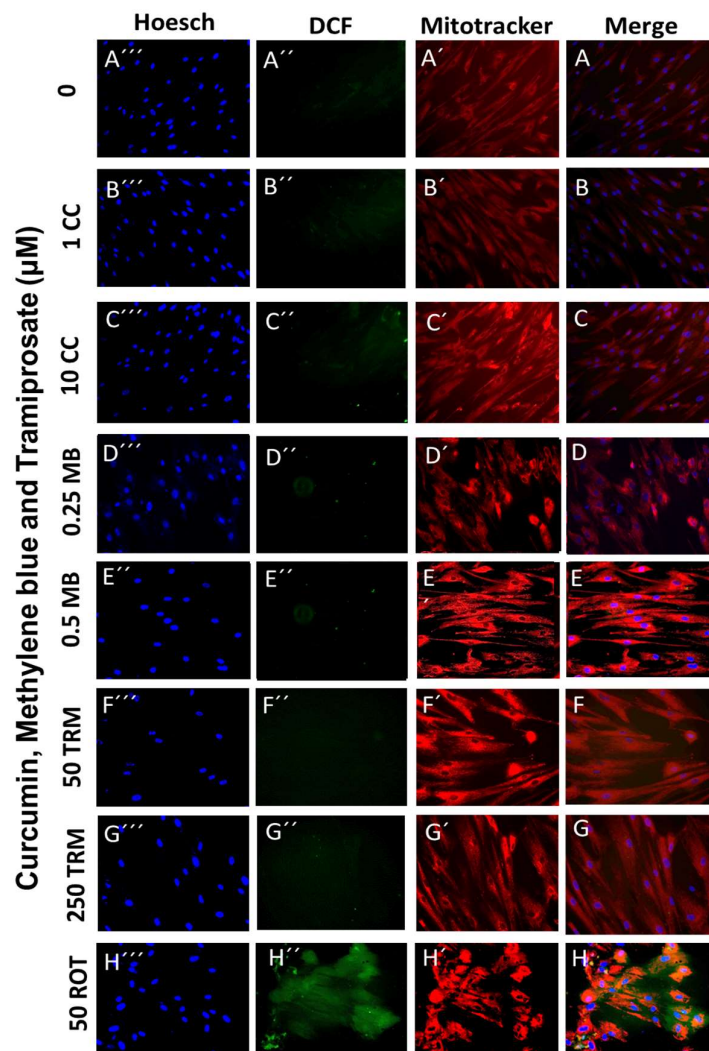
Debido a la estrecha correlación entre producción de EROs y la disfunción mitocondrial también se evaluó el efecto del inhibidor del complejo 1 mitocondrial rotenona sobre el $\Delta\Psi_m$ por medio de inmunofluorescencia con la sonda mitotracker. Como se observa en la figura 3 la rotenona disminuyó significativamente el $\Delta\Psi_m$ (fig 3H, 3J, 4H, 4J) en comparación con las CSNC sin tratar, al inhibir el complejo 1 de la CTE, lo que impide la respiración celular y causa una disminución de la producción de ATP, así como alteraciones en la relación de electrones entre la mitocondria y el citoplasma, disminuyendo la electronegatividad de esta organela y derivando en disfunción mitocondrial (143).

11.4 Los tratamientos con curcumina 1 μ M, MB 0.5 μ M, curcumina 1 μ M + tramiprosato 50 μ M y MB 0,25 μ M + tramiprosato 50 μ M disminuyeron la producción de EROS, mientras que el MB 0,25 μ M + tramiprosato 50 μ M aumenta el $\Delta\Psi_m$.

Debido a que la curcumina, tramiprosato y MB son moléculas antioxidantes o inductoras de vías de respuesta antioxidante, se decidió evaluar la producción de H_2O_2 . Nuestros resultados indican que los tratamientos de curcumina (10 μ M) (fig 3C), tramiprosato (50 y 250 μ M) (3D, 3E) y azul de metileno (0.25 μ M) (3F) no afectaron significativamente la cantidad de H_2O_2 ($p > 0.05$), mientras que el tratamiento con curcumina a 1 μ M (3B) y MB a una concentración de 0.5 μ M (3E) disminuyó significativamente su producción, la curcumina es una molécula antioxidante gracias a la capacidad de sus grupos fenólicos de secuestrar radicales libres como el H_2O_2 (247), mientras que el MB tiene una capacidad redox al reducirse a Leucometileno, confiriendo capacidades antioxidantes (237). Debido a la estrecha relación entre EO y disfunción mitocondrial se evaluó el $\Delta\Psi_m$ en estos tratamientos por medio de inmunofluorescencia con la sonda mitotracker, para determinar si la disminución del EO se debía a un aumento del $\Delta\Psi_m$, hallándose que los

tratamientos con curcumina (3B, 3C), azul de metileno (fig 3D, 3E) y tramiprosato (3F, 3G) no afectaron el potencial de membrana mitocondrial.

Para determinar si las terapias combinadas también podía tener un efecto en la regulación de la producción de H_2O_2 y el $\Delta\Psi_m$ en las CSNC se realizó un análisis de inmunofluorescencia con las sondas DCF-DA y mitotracker. En la figura 4 se halló que los tratamientos de 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato (fig 5D) y MB 0,5 μM + tramiprosato 50 μM (fig 4E) disminuyeron significativamente la expresión de H_2O_2 (fig 4G), lo que indica una posible sinergia entre la activación de vías gabaérgicas con el tramiprosato y la reducción de EROs con compuestos antioxidantes que incrementan el funcionamiento de la CTE, como la curcumina y el MB. En cuanto al $\Delta\Psi_m$ el tratamiento con MB 0,5 μM + tramiprosato 50 μM aumentó significativamente el $\Delta\Psi_m$, indicando un incremento en la funcionalidad de la CTE, siendo una alternativa promisoría en el tratamiento de la disfunción mitocondrial.



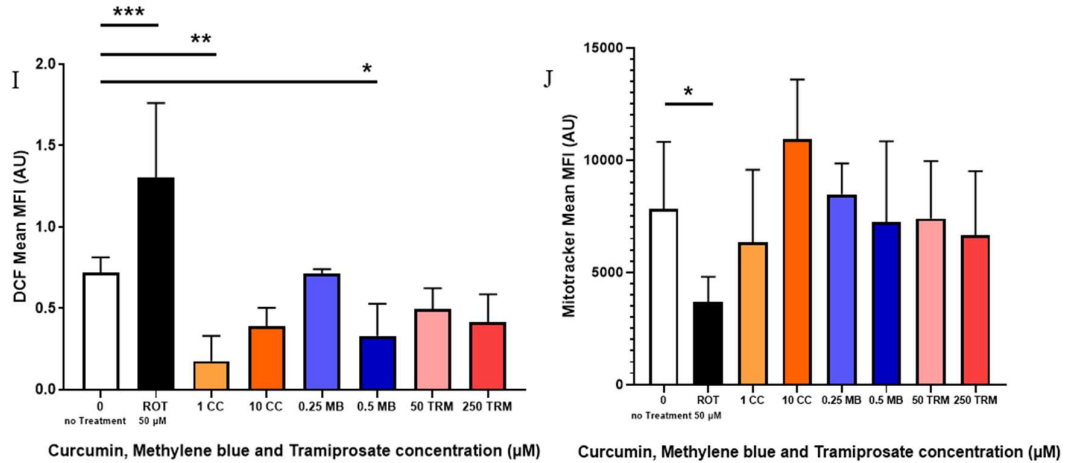
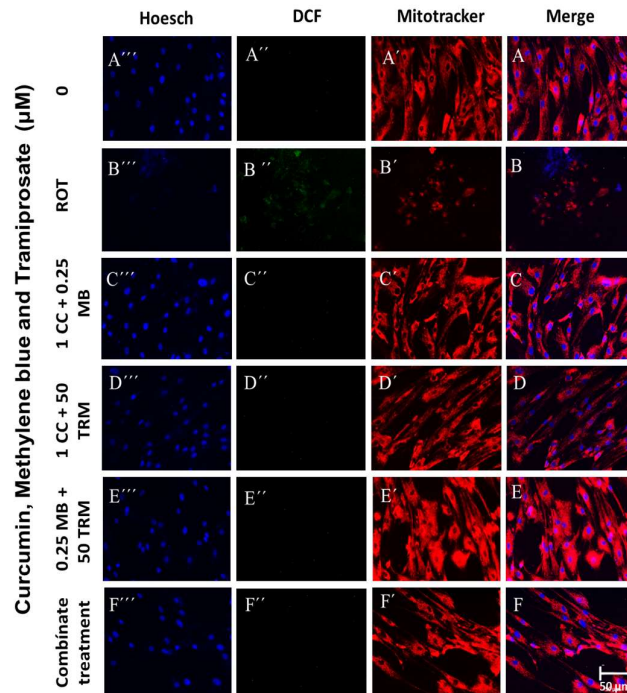


Figura 3. La rotenona aumenta la producción de EROs y disminuye el $\Delta\Psi_m$, mientras que los tratamientos con curcumina 1 μM y MB 0.5 μM reduce la producción de EROS. Las CME-CU fueron cultivadas en Ch- N- Rm como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos de curcumina (B-C), azul de metileno (D-E), tramiprosato (F-G) durante 4 días. (A-G) el tratamiento con rotenona se incubó por 6 horas al final de las 96 horas (H) las células se tiñeron con la sonda Mitotracker para analizar el $\Delta\Psi_m$. La sonda DCF-DA se utiliza para cuantificar la formación de H_2O_2 . Los núcleos se tiñen con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por análisis de inmunofluorescencia. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia DCF. (J) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoTracker. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (* $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$).



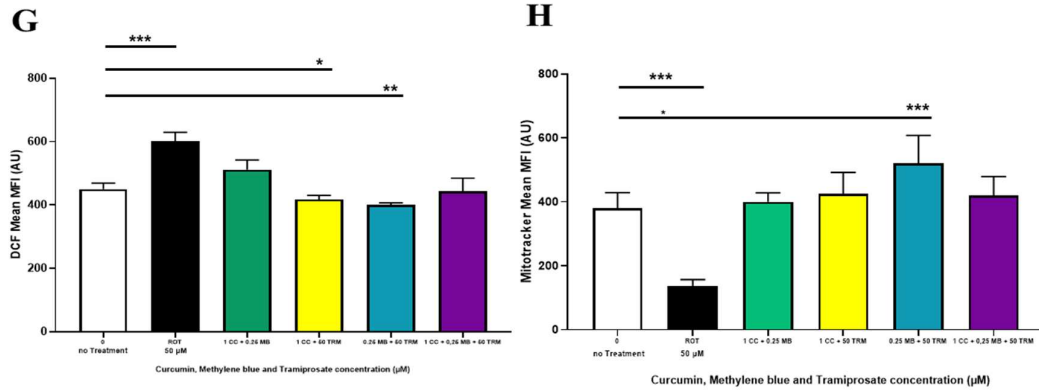


Figura 4. Los tratamientos con curcumina 1 μ M + tramiprosato 50 μ M y MB 0,25 μ M + tramiprosato 50 μ M disminuyeron la producción de EROS, mientras que el MB 0,25 μ M + tramiprosato 50 μ M aumentó el $\Delta\Psi_m$. Las CME-CU fueron cultivadas en Ch- N- Rm como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos combinados de curcumina+ MB (C), curcumina + tramiprosato (D), tramiprosato + MB (E) y curcumina+ MB + tramiprosato (F) durante 4 días. (A-F) el tratamiento con rotenona se incubó por 6 horas al final de las 96 horas. (B) las células se tiñeron con la sonda Mitotracker para analizar el $\Delta\Psi_m$. La sonda DCF-DA se utiliza para cuantificar la formación de H_2O_2 . Los núcleos se tiñen con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por análisis de inmunofluorescencia. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia DCF. (J) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoTracker. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (* $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$).

11.5 La rotenona aumenta la oxidación de DJ1 y la fosforilación de c-Jun. mientras que disminuye la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC.

Otra forma de medir la producción de EROs de forma indirecta es por medio de Chaperonas sensoras del estrés oxidativo como PARK7 o DJ1, esta proteína tienen residuos de cisteína antioxidantes en sus aminoácidos 46, 53 y 106, los cuales pueden captar radicales libres, propiciando la oxidación de los grupos sulfuro, principalmente de la cisteína 106 hasta ácido sulfónico, siendo el DJ1 oxidado en su cisteína 106 un indicador del aumento de EROs y ERNs (248), por lo cual se estimó por inmunofluorescencia la alteración de la expresión del marcador DJ1 oxidado en su residuo de cisteína 106 en CSNC expuestas al citotóxico rotenona durante 4 días. Como se observa en la figura 5 la ROT (fig 6H, 6J) aumentó significativamente la oxidación de DJ1 en su residuo Cys-106, indicando un aumento de EROs y un proceso de EO celular.

Los mecanismos patológicos del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial producen la activación de quinasas activadas por mitógenos o MAPK, en la EA una de las vías mediadas de quinasas más implicadas en la EA es la vía de quinasas c-Jun N-terminal (JNK) que al ser fosforiladas van a fosforilar a la proteína Tau y a la quinasa c-Jun en los residuos Ser63 y Ser73. (250) p-c-Jun es un factor de transcripción que al fosforilarse activa vías proapoptóticas que inducen la apoptosis neuronal (81, 97), por lo que se determinó el efecto de ROT en la fosforilación de c-Jun, hallándose que la que la rotenona (fig 6H, 6I) regula positivamente la fosforilación de c-Jun de forma estadísticamente significativa, debido probablemente a que la disfunción mitocondrial inducida por el citotóxico causa una activación de vías quinasas relacionadas con EO.

La disfunción colinérgica es uno de los mecanismos neuropatológicos más relevantes en la EAE. al ser las neuronas colinérgicas el primer grupo neuronal afectado en la EA (50,54), principalmente las neuronas de la corteza entorrinal y neuronas las piramidales del hipocampo, así como las del núcleo basal de Meynert (11,43). Estos grupos neuronales son importantes en procesos de aprendizaje y memoria a largo plazo y para su comunicación dependen de la señalización mediante ACh, sin embargo se ha encontrado que los oligómeros de AB se unen a los receptores nicotínicos y muscarínicos, bloqueando el ingreso intracelular de calcio mediado por ACh, inhibiendo la respuesta funcional al neurotransmisor, por ende se analizó el efecto de la rotenona en la respuesta colinérgica mediante IF la sonda fluo3-AM, hallándose que la rotenona causó una disfunción mitocondrial al disminuir la entrada intracelular de Ca^{2+} dependiente de este neurotransmisor (fig 7H), lo que fue evidenciado por la disminución del cambio entre los niveles basales de Ca intracelular y los niveles inducidos por la estimulación de ACh (fig 11G, 11H).

11.6 Los tratamientos con curcumina, MB y tramiprosato no afectan la oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun ni la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC.

Al estimar por inmunofluorescencia la alteración de la expresión del marcador DJ1 oxidado en su residuo cisteína 106 en CSNC expuestas a los tratamientos con curcumina, tramiprosato y azul de metileno, se encontró que tanto las CSNC sin tratar (5A) como las tratadas con curcumina (5B, 5C), azul de metileno (5D, 5E) y el tramiprosato (5F, 5G) mostraron niveles bajos de DJ-1 oxidado. (Fig 6J) sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.05$), debido probablemente a una baja producción basal de EROs.

De la misma forma al analizar la expresión de p-c-Jun en CSNC expuestas a los tratamientos con curcumina, tramiprosato y MB durante 4 días. Los resultados indican que las CSNC sin tratar (5A)

como las tratadas con curcumina (5B, 5C), azul de metileno (4D, 4E) y el tramiprosato (5F, 5G) mostraron niveles casi indetectables de p-c-Jun con valores similares entre sí ($p < 0.05$) (fig 5J), debido probablemente a que no había un ambiente oxidativo que activara las MAPK quinasas,

Al no hallar diferencias significativas entre las CSNC sin tratamiento y las células tratadas con los tratamientos individuales se buscó determinar si las terapias combinadas podrían tener un efecto en la regulación del estrés oxidativo y la activación de vías quinasas proapoptóticas, evidenciadas por la oxidación del marcador de estrés oxidativo DJ1-Ox en su residuo cisteína 106 y la fosforilación del marcador proapoptótico P-C-Jun respectivamente. En la figura 6 se evidenció que los tratamientos combinados (1 μM de Curcumina + 0,25 μM de MB (fig 6C), 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato (fig 6D), 0,25 μM de MB + 50 μM de tramiprosato (fig 6E) y 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB (fig 6F)) tampoco modificaron estos marcadores patológicos en CSNC WT.

la disfunción colinérgica es una característica importante de la EA (29,44), por lo que se decidió verificar la respuesta funcional a la ACh (1mM) por el ingreso intracelular de Ca^{2+} de las CSNC mediante inmunofluorescencia con la sonda fluo3-AM. Los resultados de la figura 7 evidencian que el ingreso de calcio mediado por receptores colinérgicos no varió significativamente ($p < 0.05$) entre las células sin tratar y las CSNC incubadas con las terapias individuales de curcumina (fig 7B, 7C). MB (fig 7D, 7E) y tramiprosato (fig 7F, 7G) presentando un cambio de fluorescencia promedio ($\Delta\text{F}/\text{F}$) de $2,04 \pm 1,00$, $0,80 \pm 0,37$, $0,87 \pm 0,41$, $0,86 \pm 0,43$, $0,72 \pm 0,43$, $1,29 \pm 0,63$, $1,094 \pm 0,54$ y $-0,18 \pm 0,08$ respectivamente, con una duración media de 40 ± 10 s (fig 7I, 7J).

Al no encontrar diferencias significativas en la respuesta funcional a ACh entre las ChLN sin tratamiento y las células incubadas con los tratamientos individuales se buscó determinar si las terapias combinadas podrían tener un efecto en la entrada intracelular de calcio mediada por la activación de receptores ionotrópicos dependientes de acetilcolina, como los receptores nicotínicos y muscarínicos. En la figura 8 se halló que los tratamientos combinados (1 μM de Curcumina + 0,25 μM de MB (fig 8C), 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato (fig 8D), 0,25 μM de MB + 50 μM de tramiprosato (fig 8E) y 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB (fig 8F)) tampoco modificaron el flujo intracelular de Ca^{2+} en respuesta a la ACh en las ChLN (fig 8G y 8H), presentando un cambio de fluorescencia promedio ($\Delta\text{F}/\text{F}$) de $1,98 \pm 1,00$, $0,18 \pm 0,08$, $0,58 \pm 0,32$, $0,56 \pm 0,33$, $0,51 \pm 0,29$ y $0,33 \pm 0,26$ respectivamente, con una duración media de 40 ± 10 s (fig 8A-F).. Esto se explica por la falta de disfunción colinérgica en

las CSNC en su estado basal, demostrando que los tratamientos evaluados no afectaron la transmisión mediada por ACh en neuronas sanas.

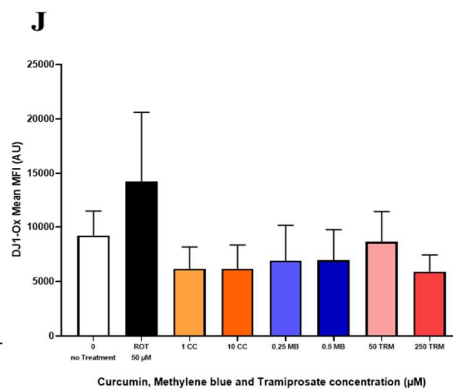
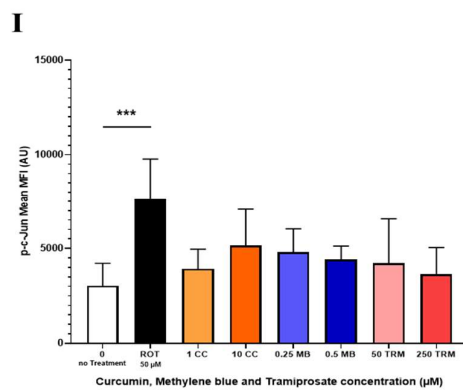
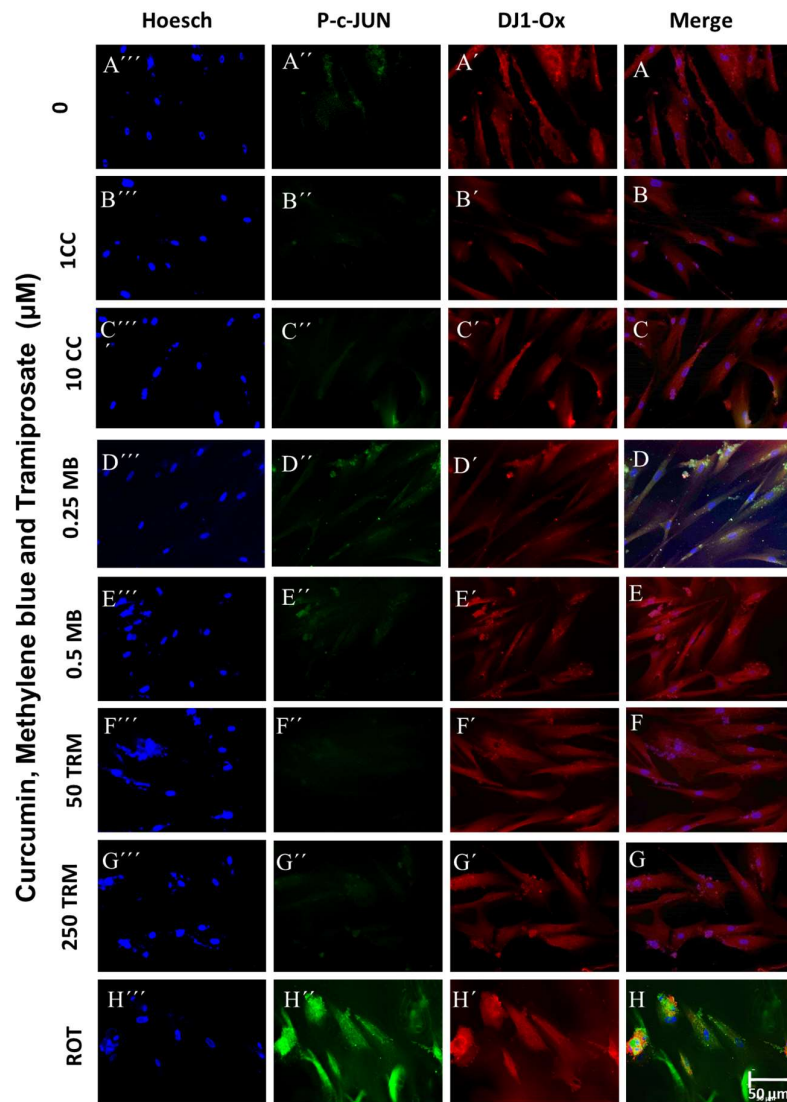
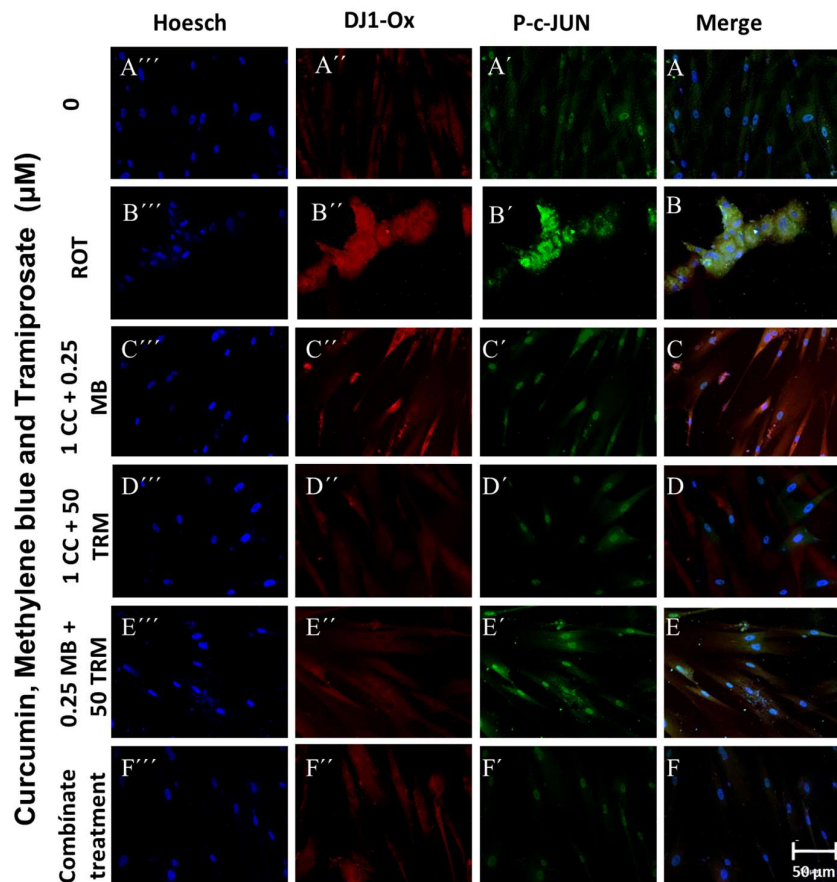


Figura 5. Los tratamientos individuales con curcumina, MB y tramiprosato no afectan la oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en las CSNC. Las CME-CU fueron cultivadas con el medio Ch- N-Rm para su transdiferenciación a CSNC tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos de curcumina (B-C), azul de metileno (D-E) o tramiprosato (F-G) durante 4 días. (A-G). Las células se tiñeron con el anticuerpo para P-C JUN (') para analizar la expresión de los mercados proapoptóticos. El anticuerpo para DJ1-Ox-Cys 106 (''') se utilizó para evaluar el estrés oxidativo. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. Se realizó una cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por el análisis de inmunofluorescencia. (H) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de P-CJUN. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DJ1-Ox-Cys 106. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm DE (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).



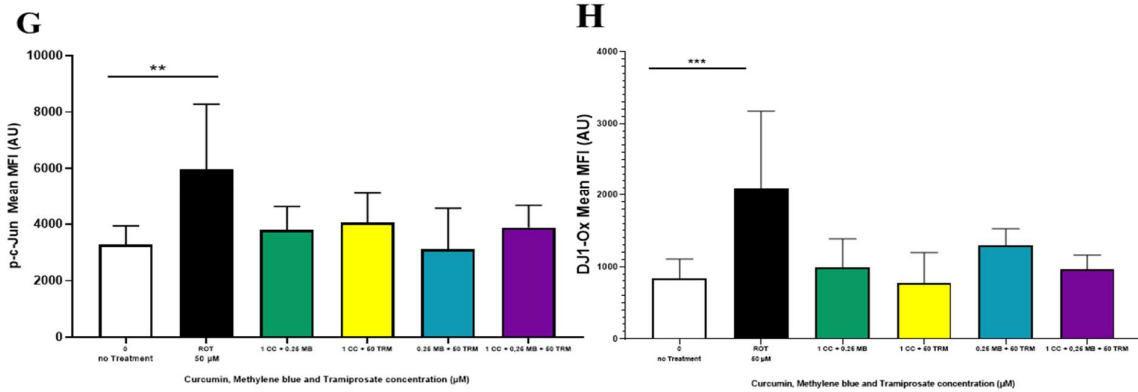
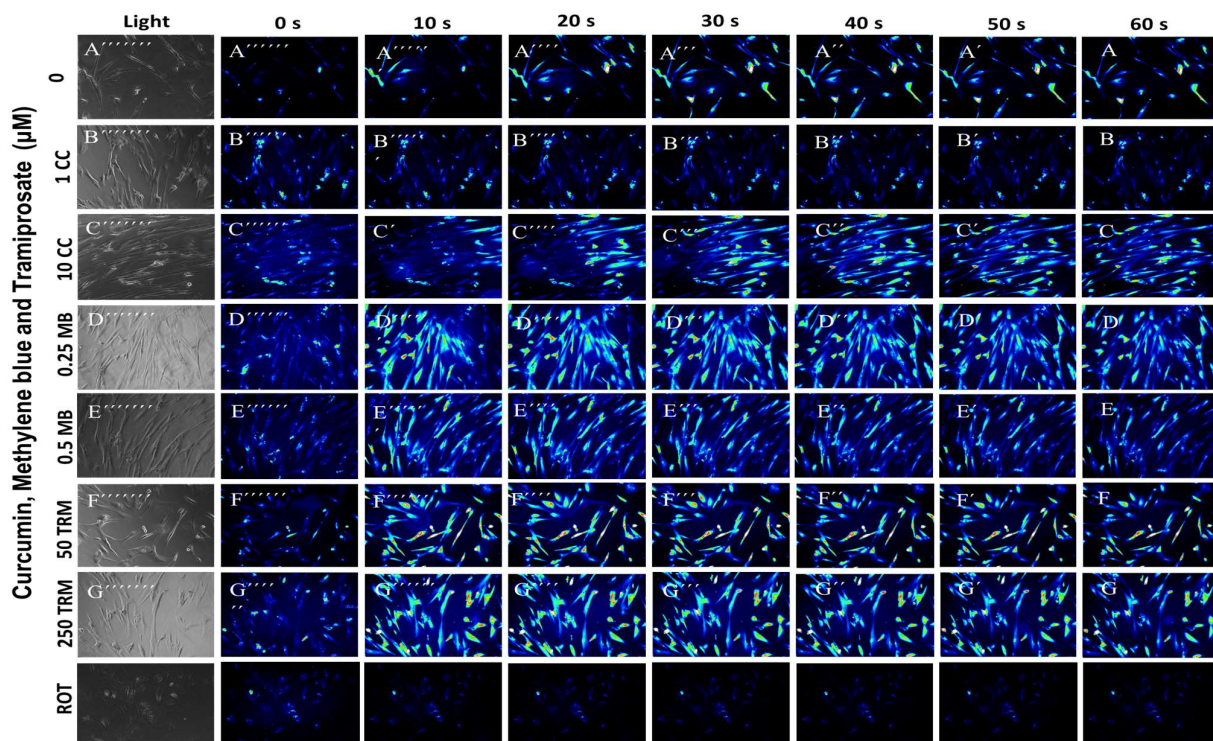


Figura 6. Los tratamientos combinados con curcumina, MB y tramiprosato no afectan la oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en las CSNC. Las CME-CU fueron cultivadas con el medio Ch- N-Rm para su transdiferenciación a CSNC tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos combinados de curcumina+ MB (C), curcumina + tramiprosato (D), tramiprosato + MB (E), curcumina+ MB + tramiprosato (F) y rotenona (H).. Las células se tiñeron con el anticuerpo para P-C JUN (') para analizar la expresión de los mercados proapoptóticos. El anticuerpo para DJ1-Ox-Cys 106 (""") se utilizó para evaluar el estrés oxidativo. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. Se realizó una cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por el análisis de inmunofluorescencia. (H) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de P-c-Jun. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DJ1-Ox-Cys 106. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm DE (*p > 0,05; **p > 0,01; ***p > 0,001)



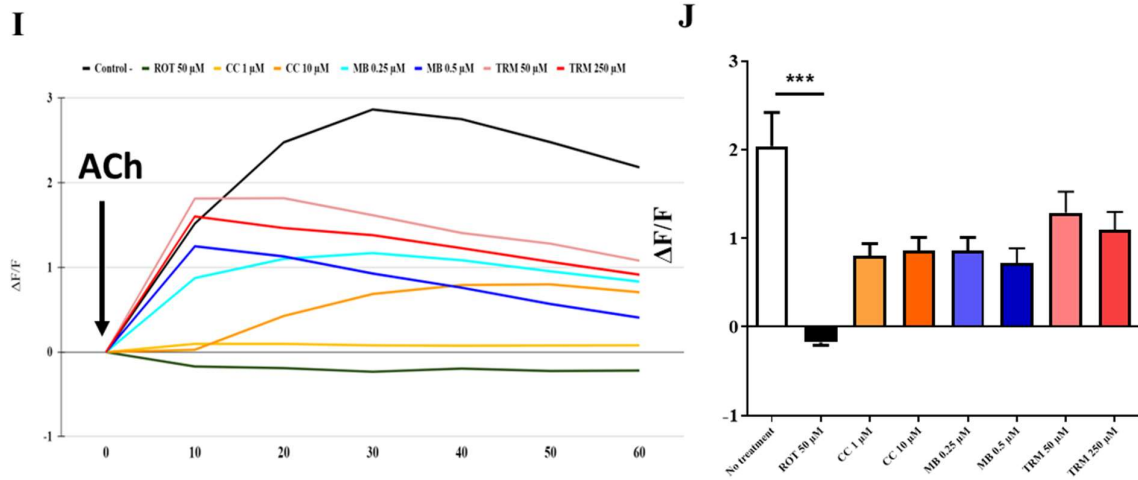
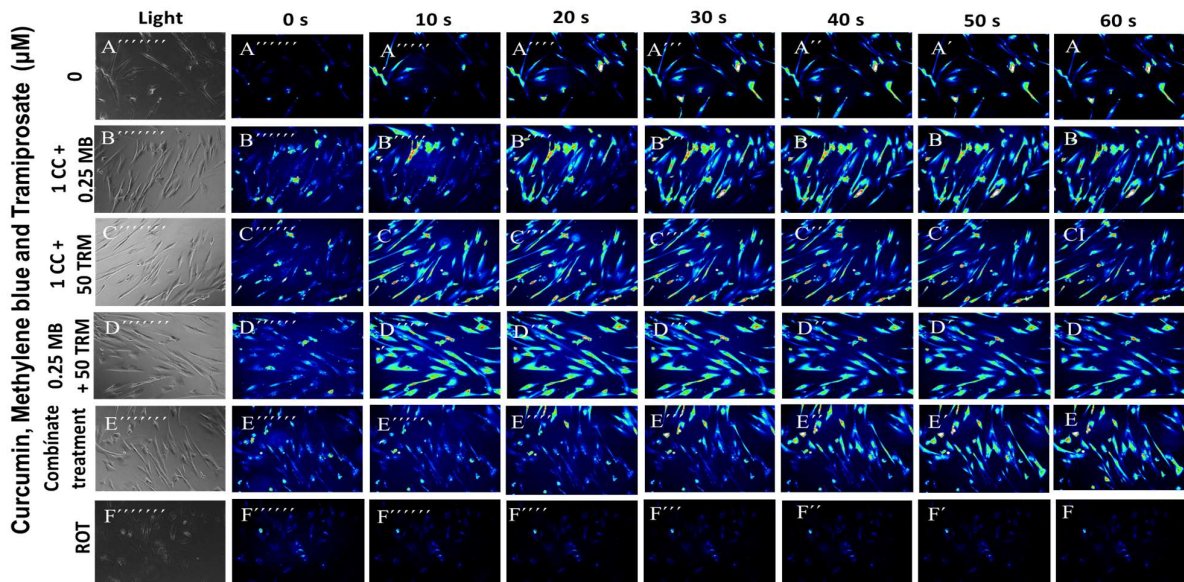


Figura 7. Los tratamientos individuales de curcumina, MB y tramiprosato no afectan la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC. Las CME-CU se cultivaron en Ch- N-Rm para su transdiferenciación a CSNC como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio se cambió por medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos de curcumina (B-C), azul de metileno (D-E), tramiprosato (F-G) durante 4 días. (B-G), así como de rotenona durante 6 horas (H) Después de 4 días de tratamiento medimos las imágenes de lapso de tiempo (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 s) de la fluorescencia de Ca²⁺ en respuesta al tratamiento con ACh. Se inyectó ACh en el cultivo a los 0 s (flecha). A continuación, se monitoreó la fluorescencia de Ca²⁺ de las células en los tiempos indicados. El contraste de color indica la intensidad de la fluorescencia: azul oscuro < azul claro < verde < amarillo < rojo. (E, F). (I) Señal de fluorescencia media normalizada ($\Delta F/F$) a lo largo del tiempo de las células que indica la elevación temporal del Ca²⁺ citoplasmático en respuesta al tratamiento con ACh. (J) Comparación de la cuantificación del cambio de fluorescencia a lo largo del tiempo entre tratamientos. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (*p > 0,05; **p > 0,01; ***p > 0,001)



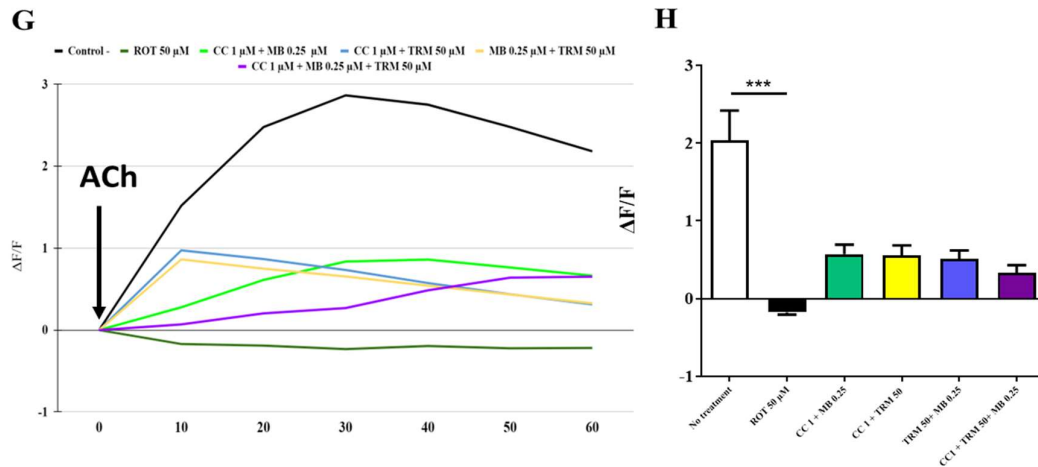


Figura 8. Los tratamientos combinados de curcumina, MB y tramiprosato no afectan la respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC. Las CME-CU se cultivaron en Ch- N-Rm para su transdiferenciación a CSNC como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio se cambió por medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos combinados de curcumina + MB (C), curcumina + tramiprosato (D), tramiprosato + MB (E), curcumina + MB + tramiprosato (F) durante 4 días. (B-G), así como con Rotenona (H) durante 6 horas. Después de 4 días de tratamiento medimos las imágenes de lapso de tiempo (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 s) de la fluorescencia de Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con ACh. Se inyectó ACh en el cultivo a los 0 s (flecha). A continuación, se monitoreó la fluorescencia de Ca^{2+} de las células en los tiempos indicados. El contraste de color indica la intensidad de la fluorescencia: azul oscuro < azul claro < verde < amarillo < rojo. (E, F). (I) Señal de fluorescencia media normalizada ($\Delta F/F$) a lo largo del tiempo de las células que indica la elevación temporal del Ca^{2+} citoplasmático en respuesta al tratamiento con ACh. (J) Comparación de la cuantificación del cambio de fluorescencia a lo largo del tiempo entre tratamientos. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (* $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$)

11.7 La rotenona induce la fosforilación de Tau y la activación de Caspasa 3 en las CSNC.

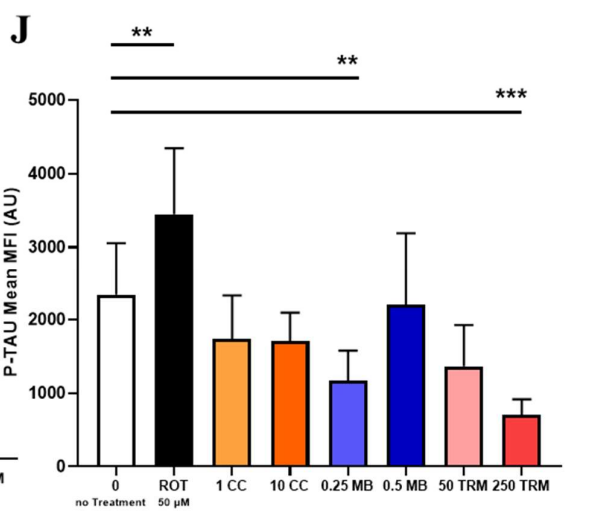
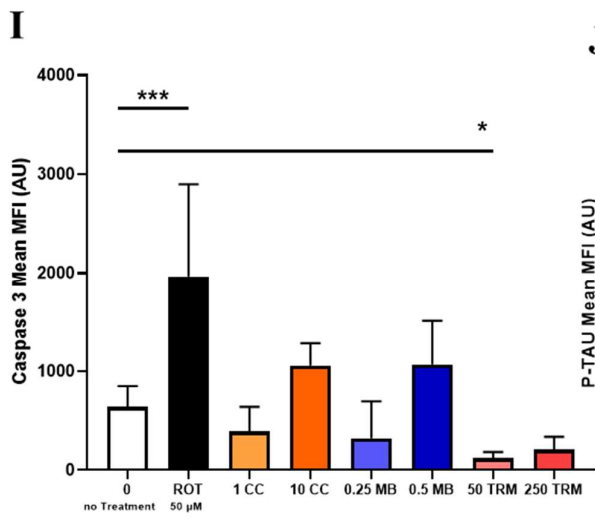
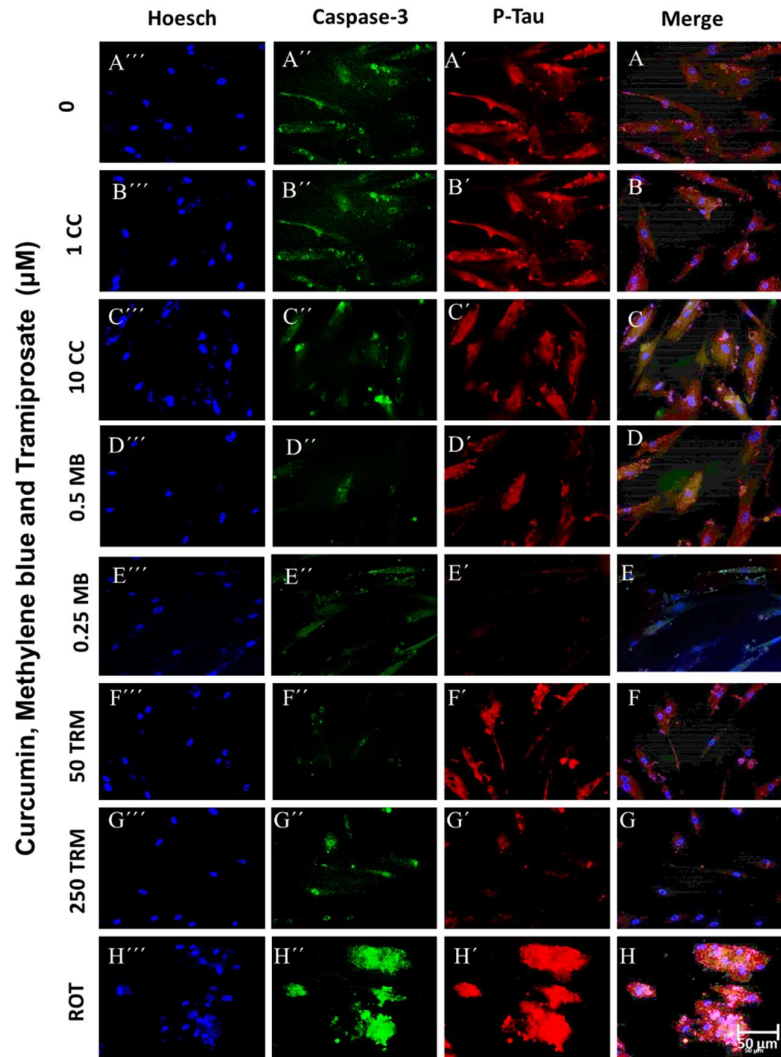
Existen múltiples mecanismos patológicos en la EA que inducen expresión y la activación de las caspasas ejecutoras como Caspasa 3 que desencadena la apoptosis en las neuronas colinérgicas (81, 97, 250). Asimismo, la fosforilación de tau a P-Tau en sus residuos Ser202/Thr205 es un biomarcador temprano de la EA(35,251) y la hiperfosforilación de tau causa la disociación de este de los microtúbulos y además genera la formación de agregados de P-Tau (NFT) un marcador neuropatológico característico de EA, por lo que se evaluó el efecto de la ROT en ambos marcadores Para determinar si la neurotoxina aumentaba el marcador proapoptótico caspasa 3 y el marcador de agregación proteica p-Tau Ser202/Thr205, esto se realizó mediante un análisis de inmunofluorescencia. En la figura 9B se halló que la rotenona aumentó significativamente los 2 marcadores, probablemente al inducir disfunción mitocondrial y EO que activan vías de quinasas

proapoptóticas que hiperfosforilan Tau y que inducen la activación de la vía intrínseca de la apoptosis mediada por caspasa 3 (148,261).

11.8 El tratamiento con tramiprosato a 50 μ M disminuye la expresión del marcador proapoptótico caspasa 3, mientras que las concentraciones de 250 μ M de tramiprosato y 0.25 μ M de MB redujeron fosforilación de Tau.

Al investigar el efecto de los tratamientos con curcumina, tramiprosato y azul de metileno sobre la expresión del marcador de agregación proteica P-tau y el marcador proapoptótico Caspasa 3 en las CSNCs por medio de inmunofluorescencia luego de 4 días de incubación con los compuestos se visualizó que los tratamientos de curcumina (fig 9B, 9C) , MB (fig 9D, 9E) y tramiprosato (fig 8G) no alteraron la expresión de este marcador de apoptosis ($p < 0.05$) (fig 9I) . El tramiprosato a 50 μ M (fig 9F, 9I) redujo de forma estadísticamente significativa la expresión de caspasa 3. Este compuesto se caracteriza por inhibir vías apoptóticas al inhibir quinasas proapoptóticas de forma dependiente a receptores gabaérgicos (183). Los demás tratamientos evaluados no modificaron la activación de caspasa (fig 9I).

Al analizar el efecto de los tratamientos en la hiperfosforilación de Tau se halló que las concentraciones de 250 μ M de tramiprosato (fig 8G) y 0.25 μ M de MB (fig 9E) disminuyeron la expresión de P-Tau en sus residuos Ser202/Thr205. Se ha reportado que ambos compuestos inhiben la hiperfosforilación de Tau por inhibición de quinasas como GSK-3B y CDK5. Así mismo el MB se une a residuos de cisteína de Tau inhibiendo su oligomerización. Los demás tratamientos individuales (fig 9B-G y 9J) no modificaron la fosforilación de de Tau (fig 9J). De igual forma ninguno de los tratamientos combinados (1 μ M de Curcumina + 0,25 μ M de MB (fig 9C), 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato (fig 10D), 0,25 μ M de MB + 50 μ M de tramiprosato (fig 10E) y 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB (fig 10F)) alteró la expresión de caspasa 3 ni de p-Tau.(fig 10G, 10H)



Curcumin, Methylene blue and Tramiprosate concentration (μM) Curcumin, Methylene blue and Tramiprosate concentration (μM)

Figura 9. El tratamiento con tramiprosato a 50 μM disminuye la expresión del marcador proapoptótico caspasa 3, mientras que las concentraciones de 250 μM de tramiprosato y 0.25 μM de MB redujeron fosforilación de Tau. Las MCE-CU fueron cultivadas en Ch- N-Rm para su transdiferenciación a CSNC tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos de curcumina (B-C), azul de metileno (D-E) o tramiprosato (F-G) durante 4 días. (B-G) Las células se tiñen con el anticuerpo para la Caspasa 3 (') para analizar la expresión de los marcadores proapoptóticos. El anticuerpo para P-Tau Ser202/Thr205 (''') se utiliza para evaluar la formación de NFT. Los núcleos se tiñen con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por el análisis de inmunofluorescencia. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la Caspasa-3. (J) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de P-Tau. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

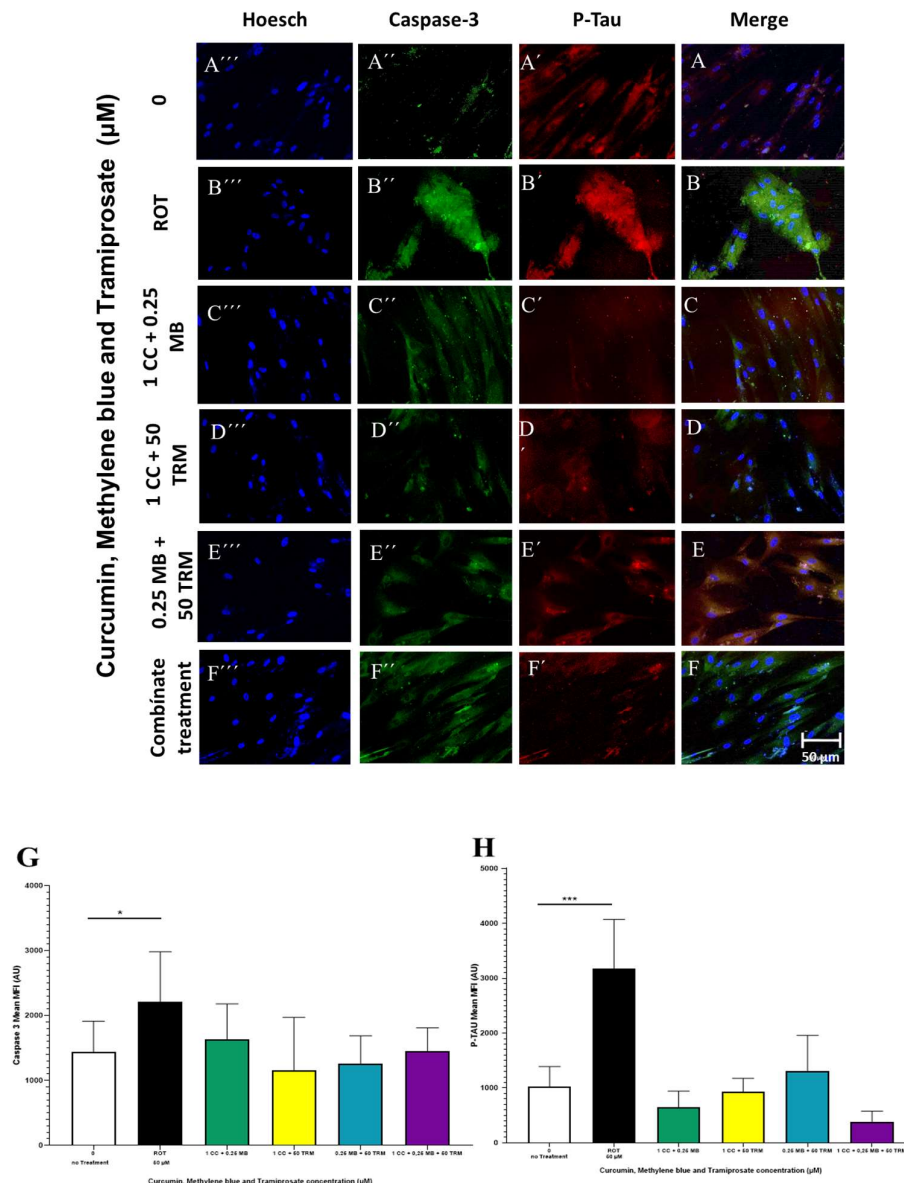


Figura 10. La rotenona induce la fosforilación de Tau y la activación de Caspasa 3 en las CSNC. Las CME-CU se cultivaron en Ch- N-Rm para su transdiferenciación a CSNC como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio se cambió por medio de cultivo regular (RCm) con los tratamientos de curcumina+ MB (C), curcumina + tramiprosato (D), tramiprosato + MB (E), curcumina+ MB + tramiprosato (F) durante 4 días, así como de rotenona durante 6 horas (H) Después de 4 días de tratamiento medimos las imágenes de lapso de tiempo (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 s) de la fluorescencia de Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con ACh. Se inyectó ACh en el cultivo a los 0 s (flecha). A continuación, se monitoreó la fluorescencia de Ca^{2+} de las células en los tiempos indicados. El contraste de color indica la intensidad de la fluorescencia: azul oscuro < azul claro < verde < amarillo < rojo. (E, F). (I) Señal de fluorescencia media normalizada ($\Delta F/F$) a lo largo del tiempo de las células que indica la elevación temporal del Ca^{2+} citoplasmático en respuesta al tratamiento con ACh. (J) Comparación de la cuantificación del cambio de fluorescencia a lo largo del tiempo entre tratamientos. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (*p > 0,05; **p > 0,01; ***p > 0,001).

11.9. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato no logró revertir la pérdida del $\Delta\Psi_m$ ni el incremento de oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en CSNC expuestas a rotenona.

Al haber validado el uso de la rotenona como método químico para la simulación de los mecanismos neuropatológicos presentes en la EA, al emular la disfunción mitocondrial, el EO, La activación de vías proapoptóticas, la hiperfosforilación de Tau, la disfunción colinérgica y la muerte neuronal en las CSNC se decidió evaluar el efecto de la terapia combinada de la 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB incubada con rotenona 50 μ M en CSNC durante 6 horas para determinar si este tratamiento podría revertir los efectos degenerativos de este inhibidor del complejo 1 mitocondrial. Para ello se verificó el mantenimiento del $\Delta\Psi_m$ por inmunofluorescencia usando la sonda mitotracker. En la figura 11 se visualizó que el $\Delta\Psi_m$ de las CSNC incubadas con el tratamiento combinado y la rotenona simultáneamente (fig 11D) no varió de forma significativa (p <0.05) en comparación a las células incubadas únicamente con rotenona (fig 11B), por lo que se puede concluir que el tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato no logró revertir la pérdida del $\Delta\Psi_m$ inducida por la rotenona, probablemente por el poco tiempo expuesto al tratamiento o por la baja concentración de las moléculas usadas.

Debido a que el estrés oxidativo y la apoptosis son mecanismos neuropatológicos clave en la EA se decidió evaluar el efecto de la terapia combinada de 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB en la inhibición de estos mecanismos inducidos por rotenona 50 μ M en las CSNC, por lo que los compuestos fueron dejados durante 6 horas para determinar

por inmunofluorescencia si este tratamiento podría revertir la oxidación de DJ1 Cys106 o la fosforilación del factor de transcripción c-Jun. La figura 12 muestra que la expresión de ambos marcadores patológicos en las CSNC incubadas con el tratamiento combinado y la rotenona simultáneamente (fig 12D) no fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los hallados en las células incubadas con rotenona (fig 12B). Sin embargo ambas condiciones variaron significativamente de las CSNC sin tratamiento (fig 12A, 12E). lo que indica que la rotenona aumenta la producción de H_2O_2 que oxida DJ1-Cys-106 y activa la vía JNK y que el tratamiento combinado no logró revertir estas alteraciones.

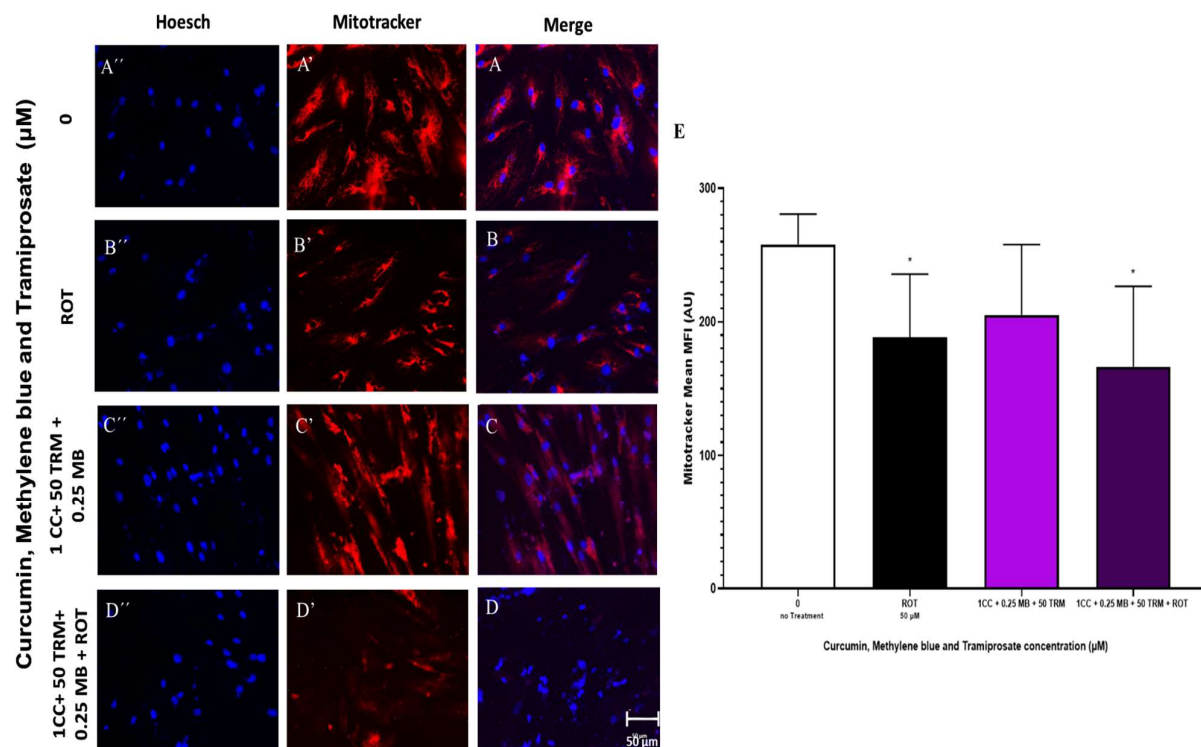


Figura 11. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato no logró revertir la pérdida del $\Delta\Psi_m$ en CSNC expuestas a rotenona. Las CME-CU fueron cultivadas en Ch- N- Rm como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) sin tratamiento (A), con rotenona 50 μM (B). con los tratamientos combinados de 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB (C), y con los tratamientos combinados de 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB incubados simultáneamente con 50 μM de rotenona (D), durante 6 horas. (A-D) las células se tiñeron con la sonda Mitotracker para analizar el $\Delta\Psi_m$. Los núcleos se tiñen con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. (E) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por análisis de inmunofluorescencia. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia DCF. (J) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoTracker. Los blots y las figuras representan 1 de 3

experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (*p > 0,05; **p > 0,01; ***p > 0,001).

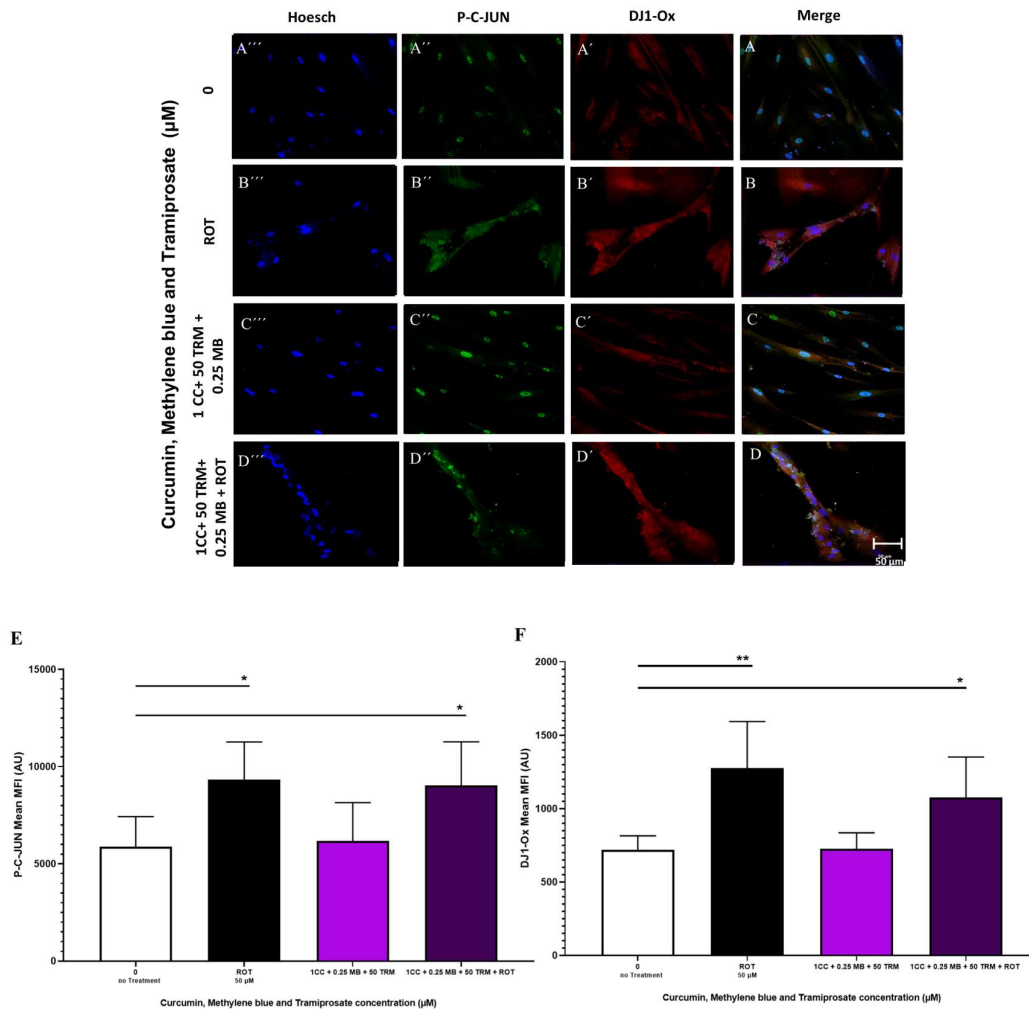


Figura 12. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato no logró revertir el incremento de oxidación de DJ1, ni la fosforilación de c-Jun en CSNC expuestas a rotenona. Las CME-CU fueron cultivadas en Ch- N- Rm como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) sin tratamiento (A), con rotenona 50 μ M (B). Con los tratamientos combinados de 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB (C), y con los tratamientos combinados de 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB incubados simultáneamente con 50 μ M (D), durante 6 horas. (A-D). Las células se tiñeron con el anticuerpo para P-C JUN (') para analizar la expresión de los marcadores proapoptóticos. El anticuerpo para DJ1-Ox-Cys 106 (""") se utilizó para evaluar el estrés oxidativo. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. Se realizó una cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por el análisis de inmunofluorescencia. (E) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de P-C-JUN. (F) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DJ1-Ox-Cys 106. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos

independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm DE (*p > 0,05; **p > 0,01; ***p > 0,001).

11.10 El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato disminuyó la hiperfosforilación de Tau, mejoró la respuesta funcional a acetilcolina y restableció parcialmente expresión de caspasa 3 en las CSNC expuestas a rotenona.

La Taupatía y la activación de caspasas son 2 de los mecanismos patológicos más importantes en el desarrollo de EA al provocar daño en el transporte axonal y apoptosis respectivamente, por lo que se decidió evaluar si la terapia combinada (1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB) podía revertir la hiperfosforilación de Tau y la expresión de Caspasa 3 inducida por ROT en un modelo de alzheimer de CSNC, para determinar esto se realizó una IF para ambos marcadores en 4 condiciones. 1- sin tratamiento (fig 13A) , 2-incubadas con rotenona 50 μ M durante 6 horas (fig 14B). 3-tratamientos combinados de 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB durante 6 horas (fig 13C), y 4-con los tratamientos combinados de 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB incubados simultáneamente con rotenona a 50 μ M (fig 13D). La figura 14 evidencia que el tratamiento combinado disminuye la fosforilación de Tau inducida por rotenona en sus residuos Ser202/Thr205 a niveles similares a las células sin el compuesto neurotóxico (fig 13F). La terapia combinada también disminuye la expresión de caspasa 3 en cultivos con rotenona, en comparación al cultivo expuesto exclusivamente al citotóxico. Sin embargo, aún presentaba una diferencia significativa en comparación a las células sin tratamiento o solo con el tratamiento combinado, por lo que la terapia combinada de los 3 compuestos aunque disminuye los niveles celulares de CASP3 no reduce su expresión hasta niveles basales.

Otro mecanismo patogénico relevante en EA es la disfunción colinérgica. Los neurotransmisores permiten la comunicación neuronal al inducir potenciales de acción por activación de receptores ionotrópicos, que permiten la entrada y salida de iones. o que permite la transmisión de información entre neuronas. Existen grupos neuronales especializados en la producción de ciertos neurotransmisores, como las neuronas colinérgicas que pueden producir ACh. Sin embargo, en la EA la inducción del ingreso intracelular de calcio por ACh está disminuida. En la figura 10 se evidenció que la rotenona disminuye la respuesta funcional de las CSNC a la ACh, por lo que se evaluó si el tratamiento combinado lograba revertir esa disfunción colinérgica. En la figura 15 se evidenció que en comparación con el tratamiento con rotenona que la respuesta a ACh (fig 14B),

el tratamiento combinado incubado con el citotóxico (fig 15D) logró restaurar el flujo de calcio inducido por ACh en las CSNC, no habiendo diferencias significativas (fig 14E, 14F) en comparación con el control negativo ($p < 0.05$) (fig 14A, 14E).

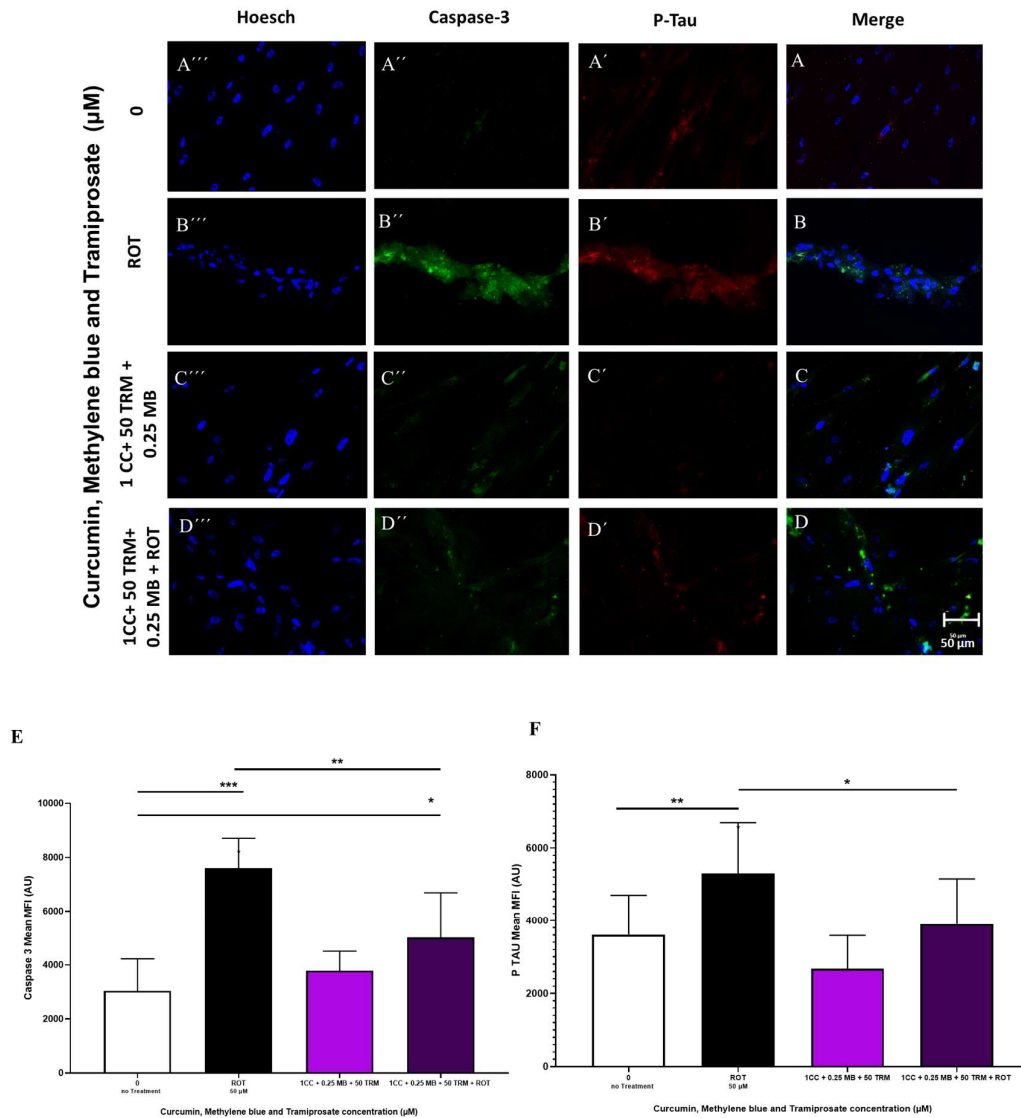


Figura 13. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato disminuyó la hiperfosforilación de Tau y restableció parcialmente expresión de caspasa 3 en las CSNC expuestas a rotenona. Las CME-CU fueron cultivadas en Ch- N- Rm como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) sin tratamiento (A), con rotenona 50 μM (B). Con los tratamientos combinados de 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB (C), y con los tratamientos combinados de 1 μM de Curcumina + 50 μM de tramiprosato + 0,25 μM de MB incubados simultáneamente con 50 μM (D), durante 6 horas. (A-D). Las células se tiñeron con el anticuerpo para la Caspasa 3 (') para analizar la expresión de los mercados proapoptóticos. El anticuerpo para P-Tau Ser202/Thr205 se utiliza

para evaluar la formación de NFT. Los núcleos se tiñen con Hoechst. El merge permite la visualización de todas las sondas en 1 campo. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las imágenes obtenidas por el análisis de inmunofluorescencia. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la Caspasa-3. (J) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de P-Tau. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (* $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$).

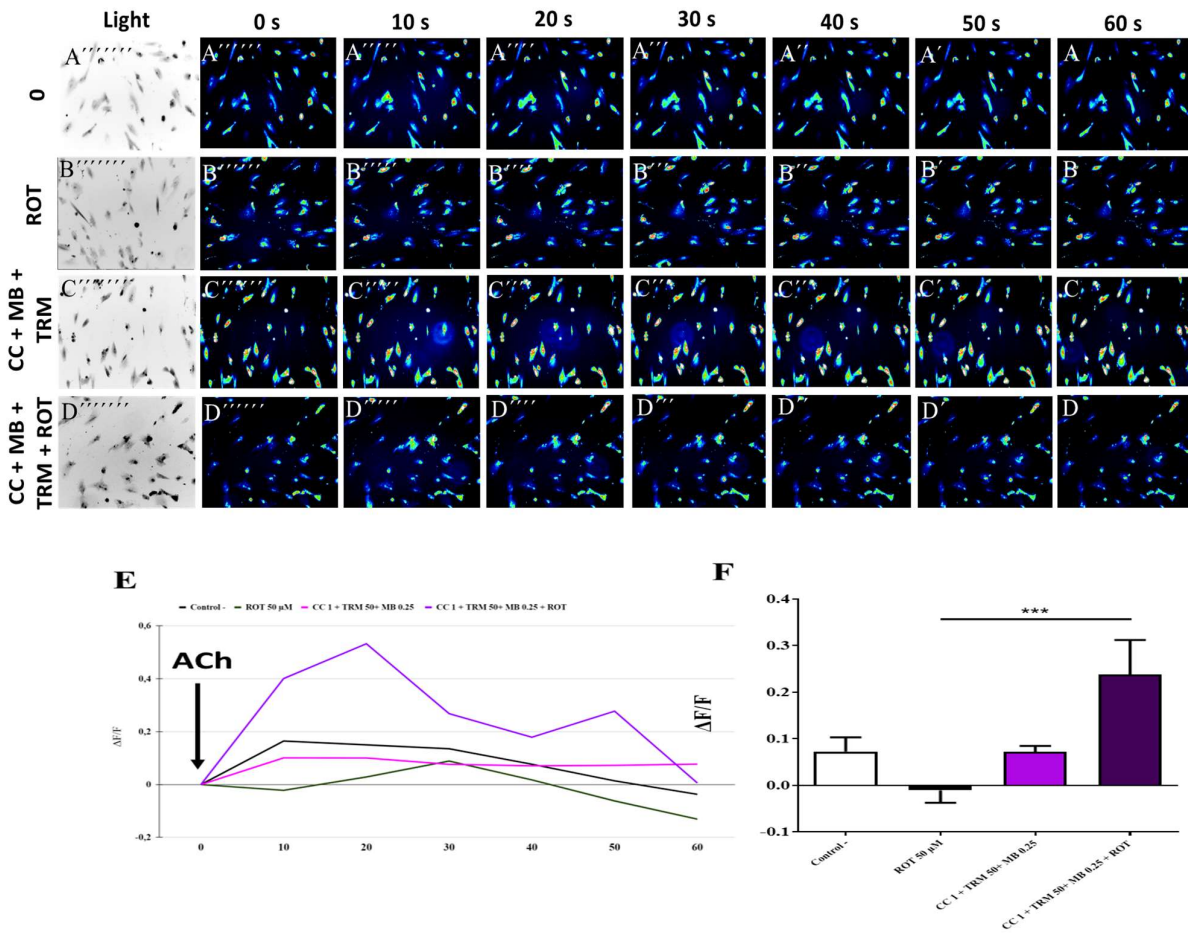


Figura 14. El tratamiento combinado de curcumina, MB y tramiprosato mejoró significativamente la respuesta funcional a acetilcolina en las CSNC expuestas a rotenona. Las CME-CU fueron cultivadas en Ch- N- Rm como se describe en la sección de Materiales y Métodos durante 7 días. Después de este tiempo, el medio fue cambiado por el medio de cultivo regular (RCm) sin tratamiento (A) con rotenona 50 μ M (B) con los tratamientos combinados de 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB (C), y con los tratamientos combinados de 1 μ M de Curcumina + 50 μ M de tramiprosato + 0,25 μ M de MB incubados simultáneamente con 50 μ M (D), durante 6 horas. (A-D). Después de 6 horas de tratamiento medimos las imágenes de lapso de tiempo (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 s) de la fluorescencia de Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con ACh. Se inyectó ACh en el cultivo a los 0 s (flecha). A continuación, se monitoreó la fluorescencia de Ca^{2+} de las células en los tiempos indicados. El contraste de color indica la intensidad de la fluorescencia: azul oscuro < azul claro < verde < amarillo < rojo. (E, F). (E) Señal de fluorescencia media normalizada ($\Delta F/F$) a lo largo del tiempo de las células que indica la elevación temporal del Ca^{2+}

citoplasmático en respuesta al tratamiento con ACh. (F) comparación de la cuantificación del cambio de fluorescencia a lo largo del tiempo entre tratamientos. Los blots y las figuras representan 1 de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. Los datos se presentan como media \pm SD (*p > 0,05; **p > 0,01; ***p > 0,001).

CAPITULO XII. DISCUSIÓN

La EA es un trastorno neurodegenerativo derivado de la muerte de las neuronas colinérgicas en las zonas subcorticales y corticales del cerebro, principalmente a nivel hipocampal (44). Aunque en investigaciones iniciales se teorizaba que esta entidad clínica era causada principalmente por el aumento en la formación intra y extracelular de oligómeros, fibrillas y placas seniles compactas del péptido A β (44), (25), estudios recientes sugieren que la amiloidosis no es el único mecanismo causal de la EAE, al no encontrarse una correlación entre la cuantificación de PS y el desarrollo de EA en los pacientes (253).

Recientemente se han dilucidado otros mecanismos patogénicos involucrados en esta enfermedad, uno de ellos es la hiperfosforilación de Tau, inducida por EO o condiciones celulares adversas que provocan la activación de quinasas inducidas por mitógenos como CDK5 o GSK-3 β (46, 251). El exceso de grupos fosfatos genera que Tau se disocie de los microtúbulos, alterando el transporte de neurotransmisores y el mantenimiento y la formación de sinapsis. Así mismo, p-Tau tiende a oligomerizarse entre sí, formando NFT, los cuales son citotóxicos al causar disfunción autofágica, formar lesiones mecánicas en las membranas celulares e inducir neuroinflamación (47).

Otro mecanismo presente en EA es la disfunción mitocondrial, que se da por un aumento crónico del Ca²⁺ intracelular inducido por la unión del A β a los receptores ionotrópicos AMPAR y NMDA, lo que deriva en la activación de las calpaínas y de la ciclofilina D, formando esta última poros en la membrana mitocondrial. El A β también tiene la capacidad de unirse e inhibir los complejos I, III y IV de la CTE (69), disminuyendo la OXPHOS y el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (72), al inhibirse el paso de los electrones por el complejo IV que los une a átomos de Hidrógeno y Oxígeno para formar H₂O, estos electrones quedan desacoplados, por lo que se unen al Oxígeno libre para formar EROs como el anión superóxido y H₂O₂ (65). Así mismo el A β se une a metales pesados como Fe y Cu, aumentando la formación de H₂O₂ (91,100). Este fenómeno de aumento de EROs se conoce como EO. Para paliar esto la célula activa vías de respuesta antioxidante como NRF2/ARE (62), o induce la producción de chaperonas antioxidantes sensoras de EO como DJ1 (248). Sin embargo cuando el EO es crónico y hay un ambiente prooxidante a nivel celular se induce la activación de vías MAPK proapoptóticas como JNK y P53; c-jun es un factor de transcripción que es fosforilado por la quinasa JNK (248) e induce la expresión de la proteína PUMA, que secuestra las proteínas BCL-XL y BCL-2, impidiendo su unión e inhibición con las proteínas proapoptóticas BAX y BAD, las cuales al estar libres forman

poros mitocondriales, provocando la salida del citocromo c (61), lo que inicia la vía intrínseca o de la apoptosis, permitiendo la formación por CAPS9 y APAF del apoptosoma, este escinde y activa la CASP3 que ejecuta el proceso de apoptosis o necrosis, culminando en la muerte neuronal (80).

Sin embargo, aún no se conoce completamente el funcionamiento de muchas de estas vías patológicas en EA, por lo que se requieren modelos de estudio que simulen el desarrollo de la EA en las neuronas colinérgicas para entender la fisiología de esta afección (129). Sin embargo muchos de los modelos de estudio aún se enfocan exclusivamente en la amiloidosis, usando modelos *in vitro* e *in vivo* con un incremento de la producción del A β , lo que deja de lado los otros mecanismos neuropatológicos implicados en EAE como el desarrollo de taupatías, EO, disfunción mitocondrial, disfunción colinérgica, disfunción sináptica y muerte neuronal (32), lo cual hace necesario el desarrollo de modelos de estudio de EA que induzca todas estas vías patológicas para un entendimiento integral de la fisiopatología de la enfermedad, así como para el ensayo de posibles tratamientos farmacológicos, lo que permitiría replicar mejor los posibles efectos de los compuestos en los pacientes.

En este estudio se validó la transdiferenciación de CME-CU a CSNC mediante el medio cholinergic neuron run. Logramos observar el aumento de la expresión de los marcadores neuronales colinérgicos ChAT y VACHT, fundamentales en la síntesis y transporte de acetilcolina (6), haciendo de este modelo una plataforma excelente para el estudio de enfermedades neurodegenerativas en neuronas colinérgicas.

En este trabajo también se logró validar el uso de ROT como una posible neurotoxina citotóxica inductora de EO, evaluándola a concentraciones de 50 μ M durante 6 horas como modelo de inducción de EAE en CSNC. Es importante resaltar que aunque anteriormente se ha usado la rotenona *in vivo* e *in vitro* como modelo de inducción de enfermedad de parkinson y aunque se han realizado algunas investigaciones sobre la inducción de la fosforilación de Tau y la agregación de AB en neuronas colinérgicas de ratón (148,261), este es el primer abordaje del uso de la rotenona como modelo químico para el modelamiento de los mecanismos neuropatológicos de EA en un modelo *in vitro* de neuronas colinérgicas de origen humano. En este trabajo la rotenona causó una disminución significativa del $\Delta\Psi_m$ medido por una disminución de la oxidación de la sonda mitocondrial Mitotracker, que fluoresce en estado oxidado, esto se explica por la inhibición de este compuesto del complejo I de la CTE (143), lo que impide la respiración celular y la producción de ATP, lo que provoca el desacoplamiento los electrones a

moléculas de Oxígeno y Nitrógeno formando EROs y ERNs e induciendo disfunción mitocondrial por fuga de electrones al citoplasma o por falla del acoplamiento electrónico de aceptor NADPH en la CTE (64), disminuyendo la diferencia de voltaje entre la mitocondria y el citoplasma.

Esto también explica el resultado del aumento significativo en la formación de H_2O_2 y la inducción de estrés oxidativo medido por el aumento de fluorescencia de DCF-DA y un mayor marcaje de la chaperona sensora de EO DJ1-Ox Cys 106 respectivamente, porque la disfunción mitocondrial aumenta la producción de EROs y en especial de H_2O_2 . El DCF desacetilado en el citoplasma por esterasas (H_2DCF) se oxida con el peróxido de hidrógeno a DCF que es fluorescente (254). Así mismo los radicales libres oxidan los residuos antioxidantes de cisteína de DJ1, en especial el residuo 106 a SOH, SO₂H y SO₃H, los primeros 2 estados son enzimáticamente reversibles, pero su oxidación a ácido sulfónico es un cambio oxidativo irreversible que inactiva las funciones de la proteína e indica un ambiente prooxidante en las neuronas. (243)

El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial inducido por la rotenona podría activar vías de las MAPK quinasas como JNK por el aumento de EROs y la depleción de ATP (81). La quinasa JNK fosforila el factor de transcripción c-Jun (250), lo que explicaría el incremento de p-c-Jun en nuestros resultados. este FT activa la expresión de proteínas proapoptóticas como PUMA, que disocia BCL-2 de BAX y BAD permitiendo a estas últimas formar poros e inducir la salida de citocromo c, lo que activa la vía intrínseca de la apoptosis derivando en la escisión de la caspasa ejecutora de la apoptosis CASP3 (80), lo cual confirmamos experimentalmente al hallar un aumento en la expresión de esta caspasa, lo que causa muerte neuronal por necrosis o apoptosis., explicando la disminución de la viabilidad neuronal hallada en el ensayo de MTT.

Anteriormente se mencionó que el EO activa las quinasas dependientes de mitógenos como CDK5, JNK o GSK-3 β y que fosforilan los residuos serina/treonina de diversas moléculas, entre ellas Tau. Nuestros resultados arrojan que la rotenona incrementa la hiperfosforilación de esta proteína en sus residuos Ser202/Thr205, esta conformación está asociada con disociación microtubular y formación de NTF (251), lo que indica un daño a nivel citoestructural en las CSNC así como posibles alteraciones en la formación y estabilización sináptica, el transporte de neurotransmisores, y la autofagia, por el exceso de oligómeros de p-Tau (32).

En estudios previos con neuronas dopaminérgicas y colinérgicas de neuronas murinas se ha reportado que la rotenona inhibe la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), aumentando la expresión y señalización de ACh. (255) . Contrariamente en este estudio hallamos

una disminución intracelular de calcio mediada por ACh, esto se deba probablemente a que las EROs producida por rotenona activan los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R) y receptores de rianodina (RyR) de los compartimientos de calcio del retículo endoplásmico (256) permitiendo su salida constante. lo que causa un incremento crónico de calcio y, con ello una disminución entre la proporción intracelular de Ca^{2+} a nivel basal y mediado por la activación de los receptores muscarínicos y nicotínicos dependientes de ACh (n7 nAChRs) (44), indicando una disfunción colinérgica en estas CSNC. Estos hallazgos permiten determinar que el uso de la rotenona en CSNC es un excelente modelo de estudio al activar múltiples mecanismos patológicos hallados en EA.

En cuanto a los abordajes farmacológicos de la EA, sólo hay 6 medicamentos aprobados, los cuales sólo son sintomáticos y ninguno revierte la neurodegeneración, evidenciando la carencia de tratamientos efectivos para los pacientes con EA (169). Debido a lo anterior es indispensable investigar nuevas moléculas que puedan disminuir los efectos patológicos en múltiples vías de daño simultáneamente, Algunos de los compuestos más prometedores como posibles medicamentos para el control de este trastorno son la curcumina, el tramiprosato y el azul de metileno. (186-189)

En el caso de la curcumina y el MB sus estructura químicas fenólicas le permite servir como aceptores/receptores de electrones, trasladándose desde el complejo I hasta el complejo IV, disminuyendo el EO (200,237), así mismo, estos compuestos se unen a motivos de oligomerización de $A\beta$ y Tau respectivamente (182,238,176,175), lo que impide su oligomerización. también inhiben vías quinasas inducidas por estrés celular como, CDK5 y GSK-3B, que están implicadas en la hiperfosforilación de Tau (197,139), y que tienden a inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, igualmente estos compuestos pueden interactuar con receptores ionotrópicos y canales iónicos mejorando la disfunción colinérgica y reduciendo la concentración intracelular de calcio (198,201,233). mientras que en estudios en modelos *in vivo* han disminuyendo la pérdida de memoria y la neurodegeneración (182,237). Por otro lado, el tramiprosato ha demostrado mejoría en la memoria y disminución de la atrofia, aunque sólo en pacientes homocigotos para APOE4 (216-217), también se ha hallado que debido a su capacidad agonista del receptor GABA-A ayuda a paliar la disfunción de las neuronas GABAérgicas (52), igualmente bloquea la vía de activación de caspasas de forma dependiente e independiente de GABA, y disminuye la activación de quinasas de respuesta al estrés como ERK1/2 (183,223), lo que regula a la baja vías de señalización proinflamatorias y proapoptóticas como la vía MAPK, y reduce la expresión de Caspasa 3 (183), además el compuesto es anti amiloidogénico (262).

A pesar de estos hallazgos prometedores, ninguno de estos compuestos ha sido probado en CSNC o en neuronas humanas sanas, o en neuronas expuestas a Rotenona, por lo que en este trabajo se analizaron los efectos de estas 3 moléculas individuales o en combinación en la formación de H_2O_2 , el mantenimiento de $\Delta\psi_M$, la expresión de marcadores de estrés oxidativo, apoptóticos y de agregación proteica, así como la respuesta funcional a la acetilcolina en CSNC sanas, para determinar el potencial de estas moléculas como terapia preventiva que permita prevenir el desarrollo de las vías patológicas antes descritas.

Nuestros resultados indican que los tratamientos individuales o combinados con curcumina y tramiprosato durante 4 días no afectaron significativamente la viabilidad celular en las concentraciones evaluadas, estos hallazgos son similares a otros reportados en la literatura que reportan que estas concentraciones son inocuas en otras líneas celulares neuronales. En contraste el MB disminuyó la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis a partir de 0,5 μM , previamente se ha reportado la citotoxicidad del MB (257-258). aunque la concentración tóxica depende de la línea celular evaluada. Basado en los hallazgos obtenidos evaluamos terapias combinadas de concentraciones bajas de cada molécula, y descubrimos que estas terapias combinadas no afectaron la viabilidad medida por MTT.

Así mismo en las concentraciones evaluadas los tratamientos individuales o combinados durante 4 días de estas moléculas no alteraron el $\Delta\psi_M$ a excepción del MB 0,25 μM + tramiprosato 50 μM que aumentó el $\Delta\psi_M$. Esto fue causado probablemente porque las mitocondrias no presentaban alteraciones fisiológicas y su CTE estaba funcionando adecuadamente. En el caso de la terapia con MB y tramiprosato el primer compuesto por su capacidad de aceptor/receptor de electrones (237) que aumenta la eficacia de la CTE, mientras el tramiprosato por estimulación de receptores gabaérgicos inhibe la excitotoxicidad y disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} , previniendo la disfunción mitocondrial (52). Por lo que estos 2 compuestos combinados estabilizan el microambiente mitocondrial y aumentan el $\Delta\psi_M$.

En cuanto a la producción de H_2O_2 la incubación con los tratamientos curcumina 1 μM , MB 0,5 μM , curcumina 1 μM + tramiprosato 50 μM y MB 0.25 μM + tramiprosato 50 μM durante 4 días disminuyeron la formación de H_2O_2 . La curcumina y el MB son compuestos que por sus anillos fenólicos y grupos hidroxilo tienen capacidad redox, secuestrando los electrones desapareados, asimismo ambas moléculas pueden inducir la activación de la vía de producción de elementos de respuesta antioxidante ARE/NRF2 (200,237,176,155) que produce aumentos de la expresión del antioxidante GSH y las enzimas SOD y catalasas que degradan el H_2O_2 a compuestos inocuos,

la falta de efecto entre combinaciones que contuviesen simultáneamente curcumina 1 μM y MB 0,25 μM probablemente se deba a la similitud de sus mecanismos de acción, lo que podría hacer que el ambas moléculas formen enlaces y se inhiben entre sí. En cuanto a la sinergia del tramiprosato con la curcumina y el MB, algunos estudios revelaron que este compuesto puede activar la enzima Sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT1), la cual modula la expresión génica de NRF2, aumentando la producción de elementos antioxidantes celular. lo que favorece la producción de antioxidantes endógenos como GSH.. lo que explicaría nuestros resultados (259). Sin embargo la producción de EROs y ERNs en estas CSNC no fue suficiente para oxidar visiblemente DJ1 en su residuo 106 de forma irreversible, ni en células sin tratamiento ni en las terapias individuales o combinadas. El bajo grado de EO en las CSNC tampoco activó de forma apreciable la fosforilación de c-Jun por lo que no hubo diferencias significativas entre las células sin tratamiento y los tratamientos individuales o combinados. al no haber un mecanismo de estrés ambiental que provoque su activación.

En nuestra investigación también hallamos que concentraciones de 250 μM de tramiprosato y 0.25 μM de MB redujeron la expresión del marcador de agregación proteica p-Tau Ser202/Thr205. Se ha reportado que ambos compuestos inhiben vías MAPK quinasas, en el caso del MB es un potente inhibidor de CDK5 y GSK-3B (197) inhibiendo la fosforilación de estas a Tau. Así mismo esta molécula se une a los motivos VQIVYK de Tau (176,155), impidiendo que se oligomerize, mientras que el tramiprosato por activación de receptores GABAaR (52) inhibe la activación de vías quinasas activadas por mitógenos como ERK. disminuyendo la fosforilación de esta proteína (240.243). En la medición de la expresión de CASP3 solo el tratamiento con tramiprosato a 50 μM redujo este marcador de apoptosis. Este compuesto provoca por su similitud estructural al aminoácido GABA la activación de vías gabaérgicas como GABAaR en neuronas colinérgicas, activando vías de señalización asociadas a una regulación negativa de la expresión de caspasa 3 (206), así como de una inhibición de su actividad, lo que aumenta la supervivencia neuronal a largo plazo, aunque el mecanismo por el cual el tramiprosato inhibe la activación de CASP3 aun es desconocido.. Aún no se ha reportado que la curcumina y el MB reduzcan la expresión de CASP3 en neuronas colinérgicas wt, y en este modelo tampoco causaron una disminución en su expresión

Los resultados anteriores nos indican que las CSNC no presentan una disfunción celular, teniendo un metabolismo celular adecuado. Estos resultados fueron ratificados con el ensayo de respuesta funcional a la acetilcolina de las CSNC. Los tratamientos individuales y combinados con curcumina, MB y tramiprosato no afectaron el ingreso intracelular de Ca^{2+} a la acetilcolina de las

CSNC en contraste con el control sin tratar. La disfunción colinérgica ocurre en presencia de otros mecanismos patológicos como el aumento de ROS, excitotoxicidad, regulación negativa de ChAT y VACHT así como por hiperfosforilación de Tau (32), por lo que en células sin un reto citotóxico la activación de los receptores ionotrópicos mediados por ACh no se vería afectada significativamente.

Para determinar si estas moléculas también podrían tener una acción terapéutica en neuronas que presentan activamente la expresión de las vías patológicas presentes en la EAE derivadas de un microambiente celular inflamatorio y prooxidante, para simular el ambiente celular inducido por múltiples factores de riesgo relacionadas con el desarrollo de EAE, como el consumo de dietas altas en glucosa, alcoholismo, insomnio, tabaquismo, polución ambiental e intoxicación por metales pesados (84). Quisimos evaluar el efecto de la terapia combinada curcumina.1 μ M + MB.0.25 μ M + tramiprosato.50 μ M en CSNC incubada simultáneamente con Rotenona 50. μ M durante 6 horas con el fin de evaluar el efecto neuroprotector de este tratamiento en la prevención de la disfunción mitocondrial, EO, taupatía, muerte neuronal apoptótica y disfunción colinérgica (200,237,176,204,52).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre el $\Delta\psi_M$, medido por inmunofluorescencia con la sonda mitotracker de las células incubadas con la terapia combinada incubada con rotenona y las CSNC incubadas exclusivamente con rotenona, teniendo ambas un $\Delta\psi_M$ menor al del control sin tratamiento. Lo que indica que el tratamiento no logró revertir la disfunción mitocondrial inducida por el bloqueo de la rotenona del intercambio de electrones entre el grupo Fe-S N2 y el grupo PSST de la NADH ubiquinona -deshidrogenasa. La curcumina y el MB pueden unirse a los electrones disociados desde el final del complejo I hasta el 4 (186-190) mejorando la eficiencia de la CTE. Sin embargo, al bloquear la CTE desde el primer complejo estas moléculas no pueden captar estos electrones desapareados en los cluster Fe-S.

Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre las células incubadas con la terapia combinada incubada con rotenona y las CSNC incubadas exclusivamente con rotenona en el desarrollo de EO, medido por la oxidación de la chaperona DJ1-Ox Cys 106 con inmunofluorescencia, teniendo una expresión mayor que el control sin tratamiento. La disfunción mitocondrial mediada por el citotóxico induce la salida de electrones desacoplados (78), estos se unen al oxígeno libre que sería el aceptor de los electrones en el complejo IV permitiendo la neutralización de estos radicales por formación de H₂O₂. Esto produce grandes cantidades de EROs. Aunque estos compuestos son antioxidantes e inducen la vía de

respuesta antioxidante NRF2/ARE que produce antioxidantes endógenos y enzimas que neutralizan estas especies reactivas, probablemente las concentraciones usadas en la terapia combinada no fueron suficientes para disminuir significativamente la formación de EROs. Este mecanismo podría explicar la falta de efecto de la terapia combinada en la fosforilación de c-Jun en CSNC cultivada con Rotenona, ya que el ambiente prooxidante activaría vía de las quinasas JNK que fosforilan c-Jun que como factor de transcripción inducirá la expresión de proteínas proapoptóticas.

En comparación, los resultados experimentales nos muestran que el tratamiento combinado disminuyó significativamente la fosforilación de Tau Ser202/Thr205, a los niveles observados en las CSNC sin tratar ($P > 0.05$). Esto se explica por un efecto sinergia en el que MB es un potente inhibidor de CDK5 y GSK-3B (183) inhibiendo la fosforilación de éstas a Tau, la curcumina disminuye la actividad de las quinasas GSK-3 β y p38 (221), mientras que el tramiprosato por activación de receptores GABAaR inhibe la activación de la vía ERK $\frac{1}{2}$ (227). La expresión de caspasas también fue reducida por el tratamiento combinado, al compararlo con las CSNC tratadas únicamente con rotenona, aunque sea mayor a la expresión de las células sin tratamiento, disminuyendo parcialmente la expresión de caspasa 3, un marcador de apoptosis de las células expuestas a la rotenona, probablemente por la inhibición parcial del tramiprosato de la caspasa 3 por activación de receptores GABAaR (226). Aunque este mecanismo aún no se comprende completamente. Probablemente se requiere una dosis más alta de este compuesto para restablecer el nivel de caspasas ejecutoras de muerte celular como CASP3 a los niveles de las CSNC sin tratar.

Así mismo al comparar el ingreso intracelular de Ca^{2+} mediado por acetilcolina entre las CSNC tratadas con ROT, sin tratamientos y tratadas simultáneamente con la terapia combinada y la ROT durante 6 horas hallamos que estas 2 últimas no presentan diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$), siendo en estas el $\Delta F/F$ o el contraste entre el Ca^{2+} intracelular sin estímulo de ACh y el flujo de calcio inducido por acetilcolina mucho mayor en los 2 últimos grupos en comparación con las CSNC incubadas con rotenona, por lo que el tratamiento combinado restauró la respuesta funcional a la ACh y la disfunción colinérgica inducida por ROT. La curcumina y el MB reducen la expresión de las enzimas AChE y BChE degradadoras de ACh (213,235). Así mismo el tramiprosato promueve una regulación iónica y una repolarización de la membrana celular mediada por receptores GABAaR (52), lo que disminuye la disfunción mitocondrial inducida por Rotenona.

En conclusión, estos resultados sugieren que la rotenona es un excelente modelo de estudio para la investigación de la EAE, al estimular la inducción de muchas de las vías patológicas presentes en esta patología como la producción excesiva de EROs y H_2O_2 , la pérdida de $\Delta\psi_M$, la activación de vías MAPK quinasas, la fosforilación de factores de transcripción de genes proapoptóticos como c-Jun. La hiperfosforilación de Tau, el aumento de la expresión de caspasas ejecutoras como Caspasa 3 que conduce a una muerte neuronal necrótica o apoptótica y la pérdida del flujo de Ca^{2+} en la respuesta funcional a ACh, siendo un modelo fácil de usar y rápido para el modelamiento de la patología. Las CME-CU transdiferenciadas a CSNC resultan ser un buen modelo *in vitro* para el estudio de patologías colinérgicas, al expresar marcadores de linaje colinérgico, y presentar un metabolismo similar a las neuronas colinérgicas, con la ventaja de ser fáciles de obtener y ser un protocolo de ejecución rápida (7 días). Las moléculas curcumina, tramiprosato y MB de forma individual o conjunta disminuyeron la expresión de EROs y H_2O_2 , aumentan el $\Delta\psi_M$ la fosforilación de Tau y la expresión de caspasas en CSNC sanas, indicando que tienen efectos neuroprotectores antes de que las células desarrollen mecanismos patológicos. Finalmente se determinó que la terapia combinada de los 3 compuestos disminuye la fosforilación de Tau, la expresión de caspasa 3 y la respuesta funcional a ACh en CSNC incubadas simultáneamente con rotenona, por lo que esta terapia podría revertir estos mecanismos patológicos en neuronas colinérgicas en procesos neurodegenerativos, siendo un tratamiento con posibilidades terapéuticas para su uso en EA, pero se requieren más estudios en modelos *in vivo* para validar estos resultados.

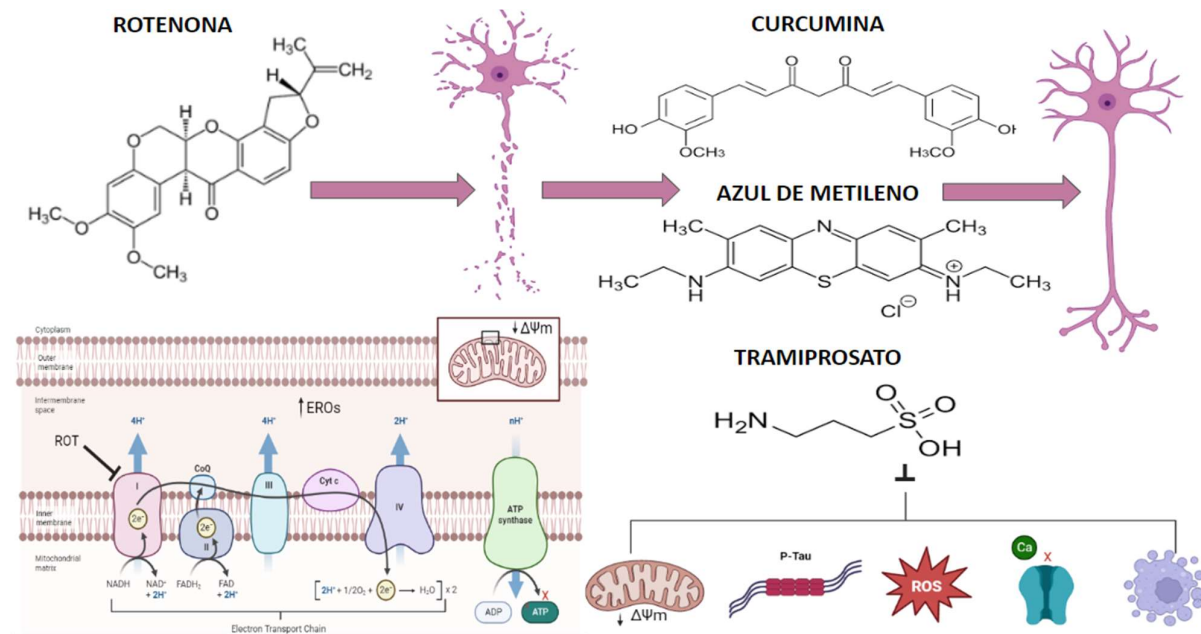


Figura 15. Resumen grafico de los resultados del trabajo de investigación.

CAPITULO XIII. CONCLUSIONES

Por primera vez se presenta un modelo de estudio de EAE mediante la incubación por 6 horas del inhibidor del complejo I mitocondrial rotenona en CME obtenidas a partir de cordón umbilical transdiferenciadas a células similares a neuronas colinérgicas durante 7 días. El citotóxico replicó múltiples vías patológicas relacionadas con el desarrollo del trastorno como el aumento en la formación del H_2O_2 , la oxidación de la chaperona sensora de EO DJ1 en sus residuos Cys106, la fosforilación de c-Jun, la expresión y activación de Caspasa 3, y la hiperfosforilación de Tau en sus residuos Ser202/Thr205. Este citotóxico también provocó la disminución del $\Delta\psi_M$ y el flujo intracelular de calcio mediado por ACh lo que la hace un método idóneo para el estudio de EAE por su fácil obtención y poco tiempo de incubación.

También se caracterizó de nuevo el efecto de las terapias individuales o combinadas de la curcumina, el tramiprosato y el MB en CSNC por medio de ensayos de viabilidad celular, análisis de funcionalidad mediada por ACh y ensayos de medición de marcadores de EO, de disfunción mitocondrial, de Taupatía, y proapoptóticos. Teniendo estas moléculas un efecto neuroprotector al reducir la formación del H_2O_2 , la expresión y activación de Caspasa 3, y la hiperfosforilación de Tau en sus residuos Ser202/Thr205. Así como aumentar el $\Delta\psi_M$, estableciéndose su potencial para prevenir el desarrollo de vías patológicas alzheimerogénicas tempranas en células neuronales sanas.

Al probar el efecto de la terapia combinada nunca antes ensayada en modelos neuronales curcumina.1 μ M + MB.0.25 μ M + tramiprosato.50 μ M en nuestro modelo de EAE de CSNC incubadas simultáneamente con Rotenona 50. μ M durante 6 horas, se observó que el tratamiento disminuye la fosforilación de Tau Ser202/Thr205, y la disfunción colinérgica inducida por el citotóxico, no habiendo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) con las CSNC sin tratamiento con rotenona. La expresión de caspasas fue reducida por el tratamiento combinado, al compararlo con las CSNC tratadas únicamente con rotenona, aunque sea mayor a la expresión de las células sin tratamiento. La administración del tratamiento combinado revirtió totalmente la hiperfosforilación de Tau y la disfunción colinérgica y disminuyó parcialmente la expresión de caspasa 3, un marcador de apoptosis de las células expuestas a la rotenona, mostrando el efecto protector de estas 3 moléculas en la disminución de procesos patológicos de apoptosis, taupatías, y disfunción colinérgica.

Por lo que la terapia combinada de CC+MB+TRM puede revertir el desarrollo de mecanismos moleculares implicados en EA en neuronas que poseen procesos degenerativos.

CAPITULO XIV. PERSPECTIVAS

La EA es la entidad clínica causante de demencia más prevalente a nivel mundial (13). Las neuronas colinérgicas son el grupo neuronal más afectado en este trastorno y en su desarrollo están implicados múltiples vías neuropatológicas entre las que se encuentran la amiloidosis, la taupatía, la disrupción sináptica, la neuroinflamación, la neurodegeneración, la desregulación de la homeostasis del calcio, la disfunción colinérgica, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la apoptosis, las cuales derivan en muerte neuronal y atrofia cortical (32).

Aunque se han realizado numerosos ensayos clínicos para buscar tratamientos efectivos para la EAE, sus resultados han sido desalentadores (174) al no hallarse aún un fármaco capaz de detener la neurodegeneración. Esto se debe en gran parte a la falta de modelos de estudio idóneos de la EA al enfocarse la mayoría de los modelos *in vitro* e *in vivo* en la sobreproducción de A β (253), por lo que se propuso un modelo de estudio de EA en CSNC 2D cultivadas con rotenona.

Una perspectiva interesante sería el análisis de cómo la rotenona modela la EA en un modelo de organoides 3D que permitirá replicar mejor la complejidad de la interacción neuronal observada en estos pacientes (128,129), siendo un modelo más robusto para la investigación de la fisiopatología, el desarrollo de nuevos compuestos farmacológicos y la evaluación de medicina de precisión personalizada.

Otra perspectiva sería realizar cocultivos con astrocitos, microglia y pericitos para simular la interacción entre las células gliales y las neuronas presentes en los cerebros de los pacientes, esto permitirá estudiar la neuroinflamación, producción de citoquinas, la activación glial, y la expresión de factores de muerte neuronal en el modelo de rotenona (163). Asimismo, permitirá estudiar si la interacción de las CSNC con las células gliales modula los factores patológicos estudiados y alteran los resultados de los estudios farmacológicos. Por lo que los cocultivos serían un

modelo más fidedigno de los mecanismos de EA en las zonas corticales y subcorticales, y arrojaron información adicional útil en el estudio de moléculas inmunomoduladoras como posibles terapias de la EA.

En cuanto a los tratamientos de curcumina, tramiprosato y MB evaluados una propuesta es el estudio de sus efectos individualmente o en combinación con 2 moléculas en modelos 2D y 3D de CSNC cultivadas con rotenona, así como su ensayo en modelos murinos *in vivo* para determinar el efecto de estas moléculas en células que presenten un reto oxidativo. así mismo se recomienda la medición de A β 40/ 42 y ensayos modificando el tiempo de exposición de estos tratamientos.

Finalmente otro análisis a considerar con el fin de establecer los mecanismos de neurotoxicidad en el caso de la rotenona, y de neuroprotección en el caso de los tratamientos sería la incubación de las moléculas con inhibidores del receptor GABA α R, inhibidores de JNK, CDK5, GSK-3 β inhibidores de la vía Nrf2 / ARE (260) para determinar si sus efectos son dependientes de estas vías.

BIBLIOGRAFIA

1. Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5. Arlington; 2015 Mar.
2. López OL, DeKosky ST. Clinical symptoms in Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. 2008;89:207–16.
3. Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD. History of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocognitive Disorder*. 2016;15(4):115.
4. Bloom GS. Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014 Apr 1;71(4):505–8.
5. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):32.
6. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010 Jan;77(1):32–42.
7. Garre-Olmo J. Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias. *Rev Neurol*. 2018 Jun 1;66(11):377–86.
8. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Aug 1;2(8):623–9.
9. Ruiz De Sánchez C, Nariño D, Fernando J, Cerón M. Epidemiología y carga de la EA
Epidemiology and Burden of Alzheimer Disease. *Acta Neurol Colomb*. 2010;26(3):1–8
10. Martin Prince A, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire Ali M, Wu Y-T, Prina M, et al. World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An Analysis of prevalence, Incidence, cost And Trends. 2015; 9.(3).

-
- 11.** Dementia [Internet]. [cited 2022 Jul 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- 12.** Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, Fukutaki K, Chalek J, Abd-Allah F, et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Heal.* 2022 Feb 1;7(2):e105–25.
- 13.** Li X, Feng X, Sun X, Hou N, Han F, Liu Y. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. *Front Aging Neurosci.* 2022 Oct 10;14:1120. no-37. World Alzheimer Report 2015 launched | NCD Alliance [Internet]. [cited 2022 Oct 21]. Available from: <https://ncdalliance.org/es/node/8013>
- 14.** Datos y cifras | Español | Alzheimer 's Association [Internet]. [cited 2022 Oct 20]. Available from: <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/datos-y-cifras>
- 15.** Nichols E, Szeoke C, Vollset S. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(1):88-106.
- 16.** 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2020 Mar 1;16(3):391–460.
- 17.** International D. Policy Brief: The Global Impact of Dementia 2013–2050; Policy Brief: The Global Impact of Dementia 2013–2050.
- 18.** Parra MA, Baez S, Sedeño L, Gonzalez Campo C, Santamaría-García H, Aprahamian I, et al. Dementia in Latin America: Paving the way toward a regional action plan. *Alzheimer's Dement.* 2021 Feb 1;17(2):295–313.
- 19.** Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim* 2015 11. 2015 Oct 15;1(1):1–18.

-
- 20.** Vargas EA, Ríos Gallardo ÁM, Manrique GG, Murcia-Paredes LM, Angarita Riaño MC. Prevalência de demência em populações colombianas. *Dement e Neuropsychol.* 2014 Oct 1;8(4):323–9.
- 21.** Díaz R, Ruano Mi, Chacón Ja, Vera A. Perfil neuroepidemiológico en la zona centro del departamento de Caldas (Colombia), años 2004-2005. *Rev Neurol.* 2006; 43: 646-52.
- 22.** Rosselli D. The mini-mental state examination as a diagnostic selection test for dementia: A Colombian population study. *Rev Neurol.* 2000 Mar 1;30(5):428–32.
- 23.** Gustavo Pradilla A, Boris A, León-Sarmiento FE, Roselli DA, Bautista LE, Morillo L, et al. National Neuroepidemiological Study in Colombia (EPINEURO). *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.* 2003 Aug 1;14(2):104–11.
- 24.** Shea YF, Chu LW, Chan AOK, Ha J, Li Y, Song YQ. A systematic review of familial Alzheimer's disease: Differences in presentation of clinical features among three mutated genes and potential ethnic differences. Vol. 115, *Journal of the Formosan Medical Association.* Elsevier B.V.; 2016. p. 67–75.
- 25.** Ramos C, Aguilon D, Cordano C, Lopera F. Genetics of dementia insights from Latin America. *Dement e Neuropsychol.* 2020 Jul 1;14(3):223–36.
- 26.** PSEN1 E280A (Paisa) | ALZFORUM [Internet]. [cited 2023 Sep 14]. Available from: <https://www.alzforum.org/mutations/psen1-e280a-paisa>
- 27.** Sims R, Hill M, Williams J. The multiplex model of the genetics of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2020 233. 2020 Feb 28;23(3):311–22.
- 28.** Janeiro M, Ardanaz C, Sola-Sevilla N, Dong J, Cortés M, Solas M, et al. Biomarkers in Alzheimer's disease. *Adv Lab Med / Av en Med Lab.* 2021 Mar 10;2(1):27–37.

-
- 29.** Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2020;15(1):1–38.
- 30.** Gu C, Yang X, Huang L. Cistanches Herba: A neuropharmacology review. *Front Pharmacol.* 2016;7(9):1–10.
- 31.** Murphy M, Levine H. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. Vol. 19, *Journal of Alzheimer's Disease.* IOS Press; 2010. p. 311–23.
- 32.** Wippold F, Cairns N, Vo K, Holtzman D, Morris J. Neuropathology for the neuroradiologist: Plaques and tangles. *Am J Neuroradiol.* 2008 Jan 1;29(1):18–22.
- 33.** Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2010;19(R1): R12-20.
- 34.** Fouad G. Stem cells as a promising therapeutic approach for Alzheimer's disease: a review. *Bull Natl Res Cent* 2019 431. 2019 Mar 29;43(1):1–20.
- 35.** Cano A, Turowski P, Ettcheto M, Duskey JT, Tosi G, Sánchez-López E, et al. Nanomedicine-based technologies and novel biomarkers for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease: from current to future challenges. *J Nanobiotechnology.* 2021 Dec 1;19(1):122.
- 36.** Martorana A, Di Lorenzo F, Manenti G, Semprini R, Koch G. 'Homotaurine induces measurable changes of short latency afferent inhibition in a group of mild cognitive impairment individuals'. *Front Aging Neurosci.* 2014;6
- 37.** Müller U, Deller T, Korte M. Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. Vol. 18, *Nature Reviews Neuroscience.* N

-
- 38.** Coronel R, Palmer C, Bernabeu-Zornoza A, Monteagudo M, Rosca A, Zambrano A, et al. Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural Regen Res.* 2019;14(10):1661.
- 39.** Sgourakis NG, Yan Y, McCallum SA, Wang C, Garcia AE. The Alzheimer's Peptides A β 40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD / NMR Study. *J Mol Biol.* 2007 May 18;368(5):1448–57.
- 40.** Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J. Alzheimer's disease and inflammation: A review of cellular and therapeutic mechanisms. Vol. 27, *Clinical an*
- 41.** Kumar Thakur A, Kamboj P, Goswami K, Ahuja K. Pathophysiology and management of alzheimer's disease: an overview. *J Anal Pharm Res.* 2018 Apr 26;Volume 7(Issue 2).
- 42.** Maccioni C, Arzola ME, Mujica L, Maccioni R. Nuevos paradigmas en el estudio de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuropsiquiatr.* 2003 Nov;41(2):33–46.
- 43.** Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J. Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease. Vol. 24, *Medical Principles and Practice.* S. Karger AG; 2015. Sep; 24(1):1–10.
- 44.** Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016 Jan 26;14(1):101.
- 45.** 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 Apr 1;14:450–64.

-
- 46.** Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z. Advances in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Focusing on Tau-Mediated Neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2012 Dec 15;1(1):1–7.
- 47.** García Teresa, Jay David. Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer. *Gac. Méd. Méx.* 2004 Jun; 140(3): 329-333.
- 48.** Iqbal K, Del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2005;1739(2):198–210.
- 49.** Orr ME, Sullivan AC, Frost B. A Brief Overview of Tauopathy: Causes, Consequences, and Therapeutic Strategies. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 Jul 1;38(7):637–48.
- 50.** Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sápiens MA, Minjarez B, Gómez-Pinedo U, Sánchez-González VJ, Márquez-Aguirre AL, et al. Dendritic Spine and Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease: A Focus on MicroRNA. *Front Cell Dev Biol.* 2020 May 5;8:255.
- 51.** Pimienta Jiménez Hernán J, Medina Marín Adriana M, Betancourth Martha I. Sistema glutamatérgico II: alteraciones en isquemia, alzheimer y esquizofrenia. *rev.colomb.psiquiatria.* 2003 Mar; 32(1): 51-76.
- 52.** Calvo-Flores Guzmán B, Vinnakota C, Govindpani K, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. The GABAergic system as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2018 Sep 1;146(6):649–69.
- 53.** Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol.* 2021;17(3):157–72.

-
- 54.** Guzman-Martinez L, Maccioni RB, Andrade V, Navarrete LP, Pastor MG, Ramos-Escobar N. Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol.* 2019;10(09):1008.
- 55.** Rapaka D, Bitra VR, Medapati JR, Akula A. Calcium regulation and Alzheimer's disease. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2014 Sep 1;4(S2):S513–8.
- 56.** Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca²⁺ sensing: role in calcium homeostasis and signaling. *Mol Cell.* 2017 Jun 6;66(6):780.
- 57.** Arboleda-Velasquez JF, Lopera F, O'Hare M, Delgado-Tirado S, Marino C, Chmielewska N, et al. Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report. *Nat Med* 2019 2511. 2019 Nov 4;25(11):1680–3.
- 58.** Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049.
- 59.** Xavier, J.M., C.M. Rodrigues, and S. Sola, *Mitochondria: Major Regulators of Neural Development.* Neuroscientist, 2015.
- 60.** Tramutola, A., et al., Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res Bull*, 2017. 133: p. 88-96.
- 61.** Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018 Jan 1;25(1): 59–70.
- 62.** Vasconcelos AR, Dos Santos NB, Scavone C, Munhoz CD. Nrf2/ARE Pathway Modulation by Dietary Energy Regulation in Neurological Disorders. *Front Pharmacol.* 2019 Feb 4;10:33

-
- 63.** Hopkins BL, Neumann CA. Redoxins as gatekeepers of the transcriptional oxidative stress response. *Redox Biol.* 2019 Feb;21:101104. doi: 10.1016/j.redox.2019.101104. Epub 2019 Jan 14.
- 64.** Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(1):134–47.
- 65.** Nunomura, A., et al., Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. 65(7): p. 631-41.
- 66.** Hyder, F., Rothman, D. L., and Bennett, M. R. (2013). Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 3549–3554
- 67.** Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu Z Bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3–15.
- 68.** Ahmadinejad, F., et al., Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, 2017. 6(3).
- 69.** Readnower, R.D., A.D. Sauerbeck, and P.G. Sullivan, Mitochondria, Amyloid beta, and Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2011. 2011: p. 104545.
- 70.** Pinho CM, Teixeira PF, Glaser E. Mitochondrial import and degradation of amyloid- β peptide. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2014 Jul 1;1837(7):1069–74.
- 71.** Hansson Petersen, C.A., et al., The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(35): p. 13145-50.

-
- 72.** Turrens, J.F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003. 552(Pt 2): p. 335-44.
- 73.** Murakami, Y., et al., Cytoprotective role of mitochondrial amyloid beta peptide-binding alcohol dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde. *Neurobiol Aging*, 2009. 30(2): p. 325-9.
- 74.** Tillement, L., et al., 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(8): p. 725-35.
- 75.** Du H, Yan SS Du. Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: Cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010 Jan 1;1802(1):198–204.
- 76.** Muñoz-Carvajal F, Sanhueza M. The Mitochondrial Unfolded Protein Response: A Hinge Between Healthy and Pathological Aging. *Front Aging Neurosci*. 2020 Sep 11;12:300.
- 77.** Oliver DMA, Reddy PH. Small Molecules as Therapeutic Drugs for Alzheimer's Disease. *Mol Cell Neurosci*. 2019 Apr 1;96:47.
- 78.** Eckert A, Schmitt K, Götz J. Mitochondrial dysfunction - The beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid-toxicity. *Alzheimer's Res Ther*. 2011 May 6;3(3):1–11.
- 79.** García M, Vecino E. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2003;78(7):351–64.
- 80.** Sharma VK, Singh TG, Singh S, Garg N, Dhiman S. Apoptotic Pathways and Alzheimer's Disease: Probing Therapeutic Potential. *Neurochem Res* 2021 4612. 2021 Aug 12;46(12):3103–22.

- 81.** Velez-Pardo, C., G.G. Ospina, and M. Jimenez del Rio, 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(3): p. 351-65.
- 82.** Tucker D, Lu Y, Zhang Q. From Mitochondrial Function to Neuroprotection – An Emerging Role for Methylene Blue. *Mol Neurobiol* 2018;55(6):5137-53.
- 83.** Luchsinger JA, Reitz C, Honig LS, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Aggregation of vascular risk factors and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology*. 2005 Aug 23;65(4):545–51.
- 84.** Xu W, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Dec 1;86(12):1299–306.
- 85.** Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. Vol. 396, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2020. p. 413–46.
- 86.** Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2021 Jul 1;8(3):313–21. .
- 87.** Wersching H, Gardener H, Sacco RL. Sugar-Sweetened and Artificially Sweetened Beverages in Relation to Stroke and Dementia: Are Soft Drinks Hard on the Brain? *Stroke*. 2017 May 1;48(5):1129–32.
- 88.** Sochocka M, Zwolińska K, Leszek J. The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2017 Mar 15;15(7):996.

-
- 89.** Armstrong RA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019;57(2):87–105.
- 90.** Rahman MA, Rahman MS, Uddin MJ, Mamum-Or-Rashid ANM, Pang MG, Rhim H. Emerging risk of environmental factors: insight mechanisms of Alzheimer's diseases. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27(36):44659–72.
- 91.** Ryan NS, Nicholas JM, Weston PSJ, Liang Y, Lashley T, Guerreiro R, et al. Clinical phenotype and genetic associations in autosomal dominant familial Alzheimer's disease: a case series. *Lancet Neurol.* 2016 Dec 1;15(13):1326–35.
- 92.** Pihlstrøm L, Wiethoff S, Houlden H. Genetics of neurodegenerative diseases: an overview. In: Gabor G. Kovacs IA, editor. *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2018. p. 309–23.
- 93.** Jurisch-Yaksi N, Sannerud R, Annaert W. A fast growing spectrum of biological functions of γ -secretase in development and disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2013;1828(12):2815–27.
- 94.** Kumar-Singh S, Theuns J, Van Broeck B, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, et al. Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. *Hum Mutat.* 2006 Jul;27(7):686–95.
- 95.** Fuller JT, Cronin-Golomb A, Gatchel JR, Norton DJ, Guzmán-Vélez E, Jacobs HIL, et al. Biological and Cognitive Markers of Presenilin1 E280A Autosomal Dominant Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review of the Colombian Kindred. *TJ Prev Alzheimers Dis.* 2019;6(2):112–20.
- 96.** Reiman EM, Quiroz YT, Fleisher AS, Chen K, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M, 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 Dec;11(12):1048–56.

97. 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 May 1;15(5):1–12.

98. Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Kosik KS, 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(1):111–9.

99. Lane-Donovan C, Philips GT, Herz J. More than Cholesterol Transporters: Lipoprotein Receptors in CNS Function and Neurodegeneration. *Neuron.* 2014 Aug 20;83(4):771–87.

100. Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, et al. APOE and Alzheimer disease: A major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry.* 2011 Sep;16(9):903–7.

101. Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2021 Jan 1;20(1):68–80.

102. Ramos C, Aguillon D, Cordano C, Lopera F. Genetics of dementia: insights from Latin America. *Dement Neuropsychol.* 2020 Jul 1;14(3):223.

103. Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W. Genomics of Alzheimer's disease: A review. *JAMA Neurol.* 2016;73(7):867–74

-
- 104.** Tanzi RE. TREM2 and Risk of Alzheimer's Disease — Friend or Foe? *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2564–5.
- 105.** Hou J, Chen Y, Grajales-Reyes G, Colonna M. TREM2 dependent and independent functions of microglia in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2022 171. 2022 Dec 23;17(1):1–19.
- 106.** Wißfeld J, Nozaki I, Mathews M, Raschka T, Ebeling C, Hornung V, et al. Deletion of Alzheimer's disease-associated CD33 results in an inflammatory human microglia phenotype. *Glia*. 2021 Jun 1;69(6):1393–412.
- 107.** Nackenoff AG, Hohman TJ, Neuner SM, Akers CS, Weitzel NC, Shostak A, et al. PLD3 is a neuronal lysosomal phospholipase D associated with β -amyloid plaques and cognitive function in Alzheimer's disease. *PLoS Genet*. 2021 Apr 8;17(4).
- 108.** Lancet T. The three stages of Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377(9776):1465–86.
- 109.** Petrella JR, Coleman RE, Doraiswamy PM. Neuroimaging and early diagnosis of alzheimer's disease: A look to the future. *Radiology*. 2003 Feb 1;226(2):315–36.
- 110.** Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2021 Jul 1;8(3):371–86.
- 111.** Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim* 2015 11. 2015 Oct 15;1(1):1–18.
- 112.** Chun KA. Beta-amyloid imaging in dementia. *Yeungnam Univ J Med*. 2018 Jun 30;35(1):1.

-
- 113.** Gale SA, Acar D, Daffner KR. Dementia. *American Journal of Medicine*. 2018 Oct 1;131(10):1161–9.
- 114.** Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic cri
- 115.** Zanetti O, Solerte SB, Cantoni F. Life expectancy in Alzheimer's disease (AD). *Arch Gerontol Geriatr*. 2009;49(1):237–43. .
- 116.** Larner AJ. Cognitive screening instruments: A practical approach. 2nd ed. Larner AJ, editor. *Cognitive Screening Instruments: A Practical Approach*. Spri
- 117.** Chun KA. Beta-amyloid imaging in dementia. *Yeungnam Univ J Med*. 2018 Jun 30;35(1):1.
- 118.** Camacho V, Gómez-Grande A, Sopena P, García-Solís D, Gómez Río M, Lorenzo C, et al. Amyloid PET in neurodegenerative diseases with dementia. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2018 Nov 1;37(6):397–406.
- 119.** Leuzy A, Heurling K, Ashton NJ, Schöll M, Zimmer ER. In vivo detection of alzheimer's disease. *Yale J Biol Med*. 2018;91(3):291–301.
- 120.** Gerakis Y, Hetz C. Brain organoids: a next step for humanized Alzheimer's disease models? *Mol Psychiatry*. 2019;24(4):474–9.
- 121.** Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(1):328–45.
- 122.** Götz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L, et al. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: Histopathology, behavior and therapy. Vol. 9, *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2004. p. 664–83.

-
- 123.** Golriz Khatami S, Mubeen S, Hofmann-Apitius M. Data science in neurodegenerative disease: its capabilities, limitations, and perspectives. *Curr Opin Neurol.* 2020;33(2):249–54.
- 124.** 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 Jan 15;312(1):126–38.
- 125.** Ortiz-Virumbrales M, Moreno CL, Kruglikov I, Marazuela P, Sproul A, Jacob S, et al. CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2N141I neurons. *Acta Neuropathol Commun.* 2017 Jan 10;5(1):1–20.
- 126.** Ho DT, Shayan H, Murphy TH. Okadaic acid induces hyperphosphorylation of τ independently of mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem.* 1997;68(1):106–12.
- 127.** Fernando CD, Soysa P. Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging activity of plant extracts. *MethodsX.* 2015 Jun 4;2:283–91.
- 128.** Gerakis Y, Hetz C. Brain organoids: a next step for humanized Alzheimer's disease models? *Mol Psychiatry.* 2019;24(4):474–9.
- 129.** Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020 2110. 2020 Jul 7;21(10):571–84.
- 130.** Lee CT, Bendriem RM, Wu WW, Shen RF. 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: Promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders

-
- 131.** Bergmann S, Lawler SE, Qu Y, Fadzen CM, Wolfe JM, Regan MS, et al. Blood–brain-barrier organoids for investigating the permeability of CNS therapeutics. *Nat Protoc.* 2018 Dec 1;13(12):2827–43. Julie Y.H. Chan. *J Biomed Sci.* 2017 Aug 20;24(1):1–12.
- 132.** Zhang J, Yang H, Wu J, Zhang D, Wang Y, Zhai J. Recent progresses in novel in vitro models of primary neurons: A biomaterial perspective. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Aug 17;10:1471.
- 133.** Götz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L, et al. Transgenic animal models of Alzheimer’s disease and related disorders: Histopathology, behavior and therapy. Vol. 9, *Molecular Psychiatry.* Nature Publishing Group; 2004. p. 664–83.
- 134.** Alexander AG, Marfil V, Li C. Use of *C. elegans* as a model to study Alzheimer’s disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet.* 2014;5(07):1–15.
- 135.** Prüßing K, Voigt A, Schulz JB. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer’s disease. *Mol Neurodegener.* 2013 Nov 22;8(1):1–36.
- 136.** Myers A, McGonigle P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer’s Disease. *Curr Protoc Neurosci.* 2019 Sep 1;89(1):81–96.
- 137.** APPPS1 | ALZFORUM [Internet]. [cited 2022 Nov 1]. Available from: <https://www.alzforum.org/research-models/appps1>
- 138.** Ochiishi T, Kaku M, Kiyosue K, Doi M, Urabe T, Hattori N, et al. New Alzheimer’s disease model mouse specialized for analyzing the function and toxicity of intraneuronal Amyloid β oligomers. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1):1–15.
- 139.** Kiss R, Csizmadia G, Solti K, Keresztes A, Zhu M, Pickhardt M, et al. Structural Basis of Small Molecule Targetability of Monomeric Tau Protein. *ACS Chem Neurosci.* 2018 Dec 19;9(12):2997–3006.

140. Tunku Abdul Rahman U, Aris Mohd Moklas M, Mahdi O, Taufik Hidayat Baharuldin M, Huda Mohd Nor N, Musa Chiroma S, et al. Chemicals used for the induction of Alzheimer's disease-like cognitive dysfunctions in rodents. *Biomed Res Ther.* 2019 Nov 27;6(11):3460–84.

141. rotenona | C₂₃H₂₂O₆ - PubChem [Internet]. [cited 2022 Dec 12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6758>

142. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology - Google Libros [Internet]. [cited 2022 Dec 12]. Available from: https://books.google.com.co/books?id=sUrLT9z9i3lC&q=rotenone+millettia&pg=PA135&redir_esc=y#v=snippet&q=rotenone+millettia&f=false

143. Schuler F, Yano T, Di Bernardo S, Yagi T, Yankovskaya V, Singer TP, et al. NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):4149–53.

144. Betarbet R, Sherer TB, Timothy Greenamyre J. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays.* 2002;24(4):308–18.

145. Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, et al. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2009 May 1;1787(5):384–92.

146. Tanner CM, Kame F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 2011 Jun;119(6):866–72.

147. Innos J, Hickey MA. Using Rotenone to Model Parkinson's Disease in Mice: A Review of the Role of Pharmacokinetics. *Chem Res Toxicol.* 2021 May 17;34(5):1223–39.

-
- 148.** Chaves RS, Kazi AI, Silva CM, Almeida MF, Lima RS, Carrettiero DC, et al. Presence of insoluble Tau following rotenone exposure ameliorates basic pathways associated with neurodegeneration. *IBRO Reports*. 2016 Dec 1;1:32–45.
- 149.** Bhurtel S, Katila N, Srivastav S, Neupane S, Choi DY. Mechanistic comparison between MPTP and rotenone neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology*. 2019 Mar 1;71:113–21.
- 150.** Ullrich C, Humpel C. Rotenone Induces Cell Death of Cholinergic Neurons in an Organotypic Co-Culture Brain Slice Model. *Neurochem Res*. 2009 Dec;34(12):2147.
- 151.** Verma DK, Singh DK, Gupta S, Gupta P, Singh A, Biswas J, et al. Minocycline diminishes the rotenone induced neurotoxicity and glial activation via suppression of apoptosis, nitrite levels and oxidative stress. *Neurotoxicology*. 2018 Mar 1;65:9–21.
- 152.** Leite C, Silva NT, Mendes S, Ribeiro A, De Faria JP, Lourenço T, et al. Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage. *PLoS One*. 2014 Oct 30;9(10).
- 153.** Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Aug;8(4):315–7.
- 154.** Jiménez-Acosta MA, Hernández LJR, Cristerna MLP, Tapia-Ramírez J, Meraz-Ríos MA, Jiménez-Acosta MA, et al. Review: Neuronal Differentiation Protocols of Mesenchymal Stem Cells. *Adv Biosci Biotechnol*. 2022 Jan 28;13(1):15–71.
- 155.** Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C, et al. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells*. 2019;12(2):218.

-
- 156.** Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells, Stem Cells, Benefits, Bone-Marrow Stem Cells, Adipose Tissue, Costa Rica [Internet]. [cited 2022 Dec 12]. Available from: <https://stemcellstransplantinstitute.com/2019/08/16/benefits-of-whartons-jelly-mesenchymal-stem-cells-mscs-when-compared-to-adipose-or-bone-marrow-derived-mscs/>
- 157.** Li M, Jiang Y, Hou Q, Zhao Y, Zhong L, Fu X. Potential pre-activation strategies for improving therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells: current status and future prospects. *Stem Cell Res Ther* 2022 131. 2022 Apr 4;13(1):1–21.
- 158.** Fang Y, Gao T, Zhang B, Pu J. Recent advances: Decoding Alzheimer's disease with stem cells. *Front Aging Neurosci*. 2018 Mar 22;10(MAR):77.
- 159.** Rendra E, Scaccia E, Biebac K. Recent advances in understanding mesenchymal stromal cells. *F1000Research*. 2020;9.
- 160.** Najj A, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Eitoku M, Suganuma N. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Feb 13;10(1).
- 161.** Liu X, Huang J, Chen T, Wang Y, Xin S, Li J, et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res* 2008 1812. 2008 Nov 25;18(12):1177–89.
- 162.** Engel M, Do-Ha D, Muñoz SS, Ooi L. Common pitfalls of stem cell differentiation: a guide to improving protocols for neurodegenerative disease models and research. *Cell Mol Life Sci* 2016 7319. 2016 May 6;73(19):3693–709.
- 163.** 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 5810. 2021 Jul 16;58(10):5194–209.

-
- 164.** Kuca K, Soukup O, Maresova P, Korabecny J, Nepovimova E, Klimova B, et al. Current approaches against Alzheimer's disease in clinical trials. *J Braz Chem Soc.* 2016;27(4):641–9.
- 165.** Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol Med Rep.* 2019;20(2):1479–87.
- 166.** Herrmann N, Li A, Lanctôt K. Memantine in dementia: A review of the current evidence. *Expert Opin Pharmacother.* 2011 Apr;12(5):787–800.
- 167.** Tampi RR, Forester BP, Agronin M. Aducanumab: evidence from clinical trial data and controversies. *Drugs Context.* 2021;10.
- 168.** van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2023 Jan 5;388(1):9-21.
- 169.** Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimer's Dis.* 2019 Jan 1;67(3):779–94.
- 170.** Hamaguchi T, Ono K, Yamada M. Anti-amyloidogenic therapies: Strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Jul 22;63(13):1538–53.
- 171.** Sugaya K, Vaidya M. Stem cell therapies for neurodegenerative diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1056(1):61–84.
- 172.** Martier R, Konstantinova P. Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Slowing Down the Ticking Clock. *Front Neurosci.* 2020 Sep 18;14(1):1–12.

-
- 173.** Blaikie L, Kay G, Kong Thoo Lin P. Current and emerging therapeutic targets of alzheimer's disease for the design of multi-target directed ligands. *Medchemcomm*. 2019 Dec 12;10(12):2052–72.
- 174.** Cummings J, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Taghva K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's Dement (New York, N Y)*. 2021;7(1).
- 175.** Medina DX, Caccamo A, Oddo S. Methylene blue reduces A β levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity. *Brain Pathol*. 2011 Mar;21(2):140–9.
- 176.** Soeda Y, Saito M, Maeda S, Ishida K, Nakamura A, Kojima S, et al. Methylene blue inhibits formation of tau fibrils but not of granular tau oligomers: A plausible key to understanding failure of a clinical trial for Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2019;68(4):1677–86.
- 177.** Abrahams S, Haylett WL, Johnson G, Carr JA, Bardien S. Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. *Neuroscience*. 2019;406(1):1–21.
- 188.** Blaikie L, Kay G, Kong Thoo Lin P. Current and emerging therapeutic targets of alzheimer's disease for the design of multi-target directed ligands. *Medchemcomm*. 2019 Dec 12;10(12):2052–72.
- 179.** Kocis P, Tolar M, Yu J, Sinko W, Ray S, Blennow K, et al. Elucidating the A β 42 Anti-Aggregation Mechanism of Action of Tramiprosate in Alzheimer's Disease: Integrating Molecular Analytical Methods, Pharmacokinetic and Clinical Data. *CNS Drugs*. 2017 Jun 1;31(6):495–509.
- 180.** Kakkar V, Kumari P, Adlakha S, Kaur IP. Curcumin and its nanoformulations as therapeutic for Alzheimer's disease. In: *Nanobiotechnology in Neurodegenerative Diseases*. Springer International Publishing; 2019. p. 343–67.

181. Emery VOB. Alzheimer disease: are we intervening too late? *Pro. J Neural Transm.* 2011 Sep;118(9):1361–78.

182. Maiti P, Dunbar GL. Use of curcumin, a natural polyphenol for targeting molecular pathways in treating age-related neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 1;19(6).

183. Galarneau A, Lacoste M-C, Morissette S, Delorme D, Greenberg BD. P-190: GABA-dependent pathways in the neuroprotective effect of tramiprosate against amyloid- β toxicity. *Alzheimer's Dement.* 2007 Jul 1;3(3S_Part_2):S158–9.

184. Ghasemi F, Bagheri H, Barreto GE, Read MI, Sahebkar A. Effects of Curcumin on Microglial Cells. *Neurotox Res.* 2019 Jul 15;36(1):12–26.

185. Venigalla M, Gyengesi E, Münch G. Curcumin and apigenin – Novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.* 2015 Aug 26;10(8):1181–5.

186. Boroumand N, Samarghandian S, Hashemy SI. Immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant effects of curcumin. *J Herbmед Pharmacol* 2018;7(4):211-219.

187. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, et al. Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(7):5892-901.

188. Bossù P, Salani F, Ciaramella A, Sacchinelli E, Mosca A, Banaj N, et al. Anti-inflammatory Effects of Homotaurine in Patients With Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci* ;10.

-
- 189.** Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, et al. Targeting soluble A β Peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging*. 2007;28(4):537-47.
- 190.** González-Albadalejo J, Sanz D, Claramunt RM, Lavandera JL, Alkorta I, Elguero J. Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. *An Real Acad Farm*. 2015;81(1):278–310.
- 191.** Curcumin | C₂₁H₂₀O₆ - PubChem [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>
- 192.** Zhang DW, Fu M, Gao SH, Liu JL. Curcumin and diabetes: A systematic review. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013(1):16.
- 193.** Tello-Franco V, Lozada-Garcia M, Soriano-Garcia M. Experimental and Computational Studies on the Inhibition of Acetylcholinesterase by Curcumin and Some of its Derivatives. *Curr Comput Aided-Drug Des*. 2013 Jun 26;9(2):289–98.
- 194.** Shi X, Zheng Z, Li J, Xiao Z, Qi W, Zhang A, et al. Curcumin inhibits A β -induced microglial inflammatory responses in vitro: Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Neurosci Lett*. 2015 May 6;594:105–10.
- 195.** Mishra S, Palanivelu K. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*. 2008 Jan 1;11(1):13–20.
- 196.** Reddy PH, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Kandimalla R, et al. Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid β induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. *J Investig Med*. 2016 Dec 1;64(8):1220–34.

-
- 197.** Di Martino RMC, De Simone A, Andrisano V, Bisignano P, Bisi A, Gobbi S, et al. Versatility of the Curcumin Scaffold: Discovery of Potent and Balanced Dual BACE-1 and GSK-3 β Inhibitors. *J Med Chem.* 2016 Jan 28;59(2):531–44.
- 198.** Picciano AL, Vaden TD. Complexation between Cu(II) and curcumin in the presence of two different segments of amyloid β . *Biophys Chem.* 2013;184(1):62–7.
- 199.** Kalaycıoğlu Z, Gazioğlu I, Erim FB. Comparison of antioxidant, anticholinesterase, and antidiabetic activities of three curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. *Nat Prod Res.* 2017 Dec 17;31(24):2914–7.
- 200.** Uğuz AC, Öz A, Naziroğlu M. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells. *J Recept Signal Transduct.* 2016 Jul 3;36(4):395–401.
- 201.** Shin DH, Seo EY, Pang B, Nam JH, Kim HS, Kim WK, et al. Inhibition of Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ channel (CRAC) and K⁺ channels by curcumin in Jurkat-T cells. *J Pharmacol Sci.* 2011 Jan 1;115(2):144–54.
- 202.** Spalletta G, Cravello L, Gianni W, Piras F, Iorio M, Cacciari C, et al. Homotaurine Effects on Hippocampal Volume Loss and Episodic Memory in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimer's Dis.* 2016 Feb 2;50(3):807–16.
- 203.** Manzano S, Agüera L, Aguilar M, Olazarán J. A Review on Tramiprosate (Homotaurine) in Alzheimer's Disease and Other Neurocognitive Disorders. *Front Neurol.* 2020;11(1):614.
- 204.** Chen M, Du ZY, Zheng X, Li DL, Zhou RP, Zhang K. Use of curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.* 2018 Apr 1;13(4):742–52.

-
- 205.** Bachetti T, Di Zanni E, Balbi P, Ravazzolo R, Sechi G Pietro, Ceccherini I. Beneficial effects of curcumin on GFAP filament organization and down-regulation of GFAP expression in an in vitro model of Alexander disease. *Exp Cell Res.* 2012 Sep 10;318(15):1844–54.
- 206.** Jakubowski JM, Orr AA, Le DA, Tamamis P. Interactions between Curcumin Derivatives and Amyloid- β Fibrils: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model.* 2020 Jan 27;60(1):289–305.
- 207.** Yanagisawa D, Taguchi H, Morikawa S, Kato T, Hirao K, Shirai N, et al. Novel curcumin derivatives as potent inhibitors of amyloid β aggregation. *Biochem Biophys Reports.* 2015 Dec 1;4(1):357–68.
- 208.** Villaflores OB, Chen YJ, Chen CP, Yeh JM, Wu TY. Effects of curcumin and demethoxycurcumin on amyloid- β precursor and tau proteins through the internal ribosome entry sites: A potential therapeutic for Alzheimer's disease. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2012 Dec 1;51(4):554–64.
- 209.** Rane JS, Bhaumik P, Panda D. Curcumin Inhibits Tau Aggregation and Disintegrates Preformed Tau Filaments in vitro. *J Alzheimer's Dis.* 2017;60(3):999–1014.
- 210.** Villaflores OB, Chen YJ, Chen CP, Yeh JM, Wu TY. Effects of curcumin and demethoxycurcumin on amyloid- β precursor and tau proteins through the internal ribosome entry sites: A potential therapeutic for Alzheimer's disease. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2012 Dec;51(4):554–64.
- 211.** de Oliveira MR, Jardim FR, Setzer WN, Nabavi SM, Nabavi SF. Curcumin, mitochondrial biogenesis, and mitophagy: Exploring recent data and indicating future needs. *Biotechnol Adv.* 2016 Sep 1;34(5):813–26.
- 212.** Jabir NR, Khan FR, Tabrez S. Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther.* 2018;24(9):753–61.

- 213.** Abbasi MA, Ilyas M, Aziz-Ur-Rehman, Sonia A, Shahwar D, Raza MA, et al. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. *Sci Iran*. 2012 Dec 1;19(6):1580–3.
- 214.** Ahmed T, Gilani AH. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Feb;91(4):554–9.
- 215.** Azzi M, Morissette S, Fallon L, Martin R, Galarneau A, Sebastiani G, et al. Involvement of both gaba-dependent and - independent pathways in tramiprosate neuroprotective effects against amyloid- β toxicity. *Neurodegener Dis*. (2007) 4(1):284–5.
- 216.** Kabir MT, Uddin MS, Jeandet P, Emran T Bin, Mitra S, Albadrani GM, et al. Anti-Alzheimer's Molecules Derived from Marine Life: Understanding Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Mar Drugs*. 2021 Apr 28;19(5):251.
- 217.** Marusina K. Neurodegenerative Treatments Build to a Tipping Point [Internet]. Yumanity Therapeutics. 2020 [cited 2021 May 14]. p. 12. Available from: <https://www.genengnews.com/insights/neurodegenerative-treatments-build-to-a-tipping-point/>
- 218.** Kong X, O'Dell LA, Terskikh V, Ye E, Wang R, Wu G. Variable-temperature ^{17}O NMR studies allow quantitative evaluation of molecular dynamics in organic solids. *J Am Chem Soc*. 2012 Sep 5;134(35):14609–17.
- 219.** Hey JA, Kocis P, Hort J, Abushakra S, Power A, Vyhnálek M, et al. Discovery and Identification of an Endogenous Metabolite of Tramiprosate and Its Prodrug ALZ-801 that Inhibits Beta Amyloid Oligomer Formation in the Human Brain. *CNS Drugs*. 2018 Sep 1;32(9):849–61.

220. Messina SA, Dawson R. Attenuation of oxidative damage to DNA by taurine and taurine analogs. *Adv Exp Med Biol.* 2000;483:355–67.

221. Abushakra S, Porsteinsson A, Scheltens P, Sadowsky C, Vellas B, Cummings J, et al. Clinical Effects of Tramiprosate in APOE4/4 Homozygous Patients with Mild Alzheimer's Disease Suggest Disease Modification Potential. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2017;4(3):149–56.

222. Ricciardi L, De Nigris F, Specchia A, Fasano A. Homotaurine in Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2015 Sep 1;36(9):1581–7.

223. HOMOTAURINE INVESTIGATIONAL SUMMARY.

224. Kocis P, Tolar M, Yu J, Sinko W, Ray S, Blennow K, et al. Elucidating the A β 42 Anti-Aggregation Mechanism of Action of Tramiprosate in Alzheimer's Disease: Integrating Molecular Analytical Methods, Pharmacokinetic and Clinical Data. *CNS Drugs.* 2017 Jun 1;31(6):495–509.

225. Aisen PS, Saumier D, Briand R, Laurin J, Gervais F, Tremblay P, et al. A Phase II study targeting amyloid- β with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease. *Neurology.* 2006 Nov;67(10):1757–63.

226. Azzi M, Morissette S, Fallon L, Martin R, Galarneau A, Sebastiani G, et al. Involvement of both gaba-dependent and - independent pathways in tramiprosate neuroprotective effects against amyloid- β toxicity. *Neurodegener Dis.* (2007) 4(1):284–5.

227. Greenberg BD, Fallon L, Lagacé C, Sebastiani G, Paquette J, Delorme D. P-192: tramiprosate decreases amyloid-beta; induced ERK1/2 activity in primary rat neurons by a GABA-independent pathway. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* (2007) (3):159-71

228. Manzano S, Agüera L, Aguilar M, Olazarán J. A Review on Tramiprosate (Homotaurine) in Alzheimer's Disease and Other Neurocognitive Disorders. *Front Neurol.* 2020;11(1):614.

-
- 229.** Methylene Blue cation | C₁₆H₁₈N₃S⁺ - PubChem [Internet]. [cited 2021 May 8]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3%2C7-bis%28dimethylamino%29phenothiazin-5-ium>
- 230.** Oz M, Lorke DE, Petroianu GA. Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(8):927–32.
- 231.** Ginimuge PR, Jyothi SD. Methylene blue: Revisited. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2010;26(4):517–20.
- 232.** Mori T, Koyama N, Segawa T, Maeda M, Maruyama N, Kinoshita N, et al. Methylene Blue Modulates β -Secretase, Reverses Cerebral Amyloidosis, and Improves Cognition in Transgenic Mice. *J Biol Chem.* 2014 Oct 31;289(44):30303–17.
10. Foidl B, Humpel C. Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease? *Neural Regen Res.* 2020 Mar 1;15(3):401.
- 233.** Gerson JE, Cascio FL, Kaye R. The Potential of Small Molecules in Preventing Tau Oligomer Formation and Toxicity. In: *Neuroprotection in Alzheimer's Disease.* Elsevier Inc.; 2017. p. 97–121. reemplazar por: la dem
- 234.** Gillman PK, Ng BKW, Cameron AJD, Liang RWY. Methylene blue is a potent monoamine oxidase inhibitor. *Can J Anesth.* 2008 May 1;55(5):311–2.
- 235.** Pfaffendorf M, Bruning TA, Batink HD, Van Zwieten PA. The interaction between methylene blue and the cholinergic system. *Br J Pharmacol.* 1997 Sep 1;122(1):95–8.
- 236.** Congdon EE, Wu JW, Myeku N, Figueroa YH, Herman M, Marinec PS, et al. Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy.* 2012;8(4):609–22.

-
- 237.**Tucker D, Lu Y, Zhang Q. From Mitochondrial Function to Neuroprotection—an Emerging Role for Methylene Blue. *Mol Neurobiol.* 2018;55(6):5137–54
- 238.**Henry M, Summa M, Patrick L, Schwartz L. A cohort of cancer patients with no reported cases of SARS-CoV-2 infection: the possible preventive role of Methylene Blue. *Substantia.* 2020 Mar 30;201-34
- 239.**Bhurtel S, Bok E, Katila N, Kim J, Choi DY. Activation of Nrf2 by methylene blue is associated with the neuroprotection against MPP+ induced toxicity via ameliorating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Biochem Pharmacol.* 2021 Oct 1;192
- 240.** Stack C, Jainuddin S, Elipenahli C, Gerges M, Starkova N, Starkov AA, et al. Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. *Hum Mol Genet.* 2014 Jul 15;23(14):3716–32.
- 241.**10. Foidl B, Humpel C. Can mouse models mimic sporadic Alzheimer’s disease? *Neural Regen Res.* 2020 Mar 1;15(3):401.
- 242.** Carter M, Shieh J. Cell Culture Techniques. *Guid to Res Tech Neurosci.* 2015 Jan 1;295–310.
- 243.** Ryan SL, Baird AM, Vaz G, Urquhart AJ, Senge M, Richard DJ, et al. Drug Discovery Approaches Utilizing Three-Dimensional Cell Culture. *Assay Drug Dev Technol.* 2016 Jan 1;14(1):19–28.
- 244.**Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:1240-9
- 245.** Pouchieu C, Piel C, Carles C, Gruber A, Helmer C, Tual S, et al. Pesticide use in agriculture and Parkinson’s disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol.* 2018 Feb 1;47(1):299–310.

-
- 246.** Villaflores OB, Chen YJ, Chen CP, Yeh JM, Wu TY. Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2012 Dec;51(4):515–25.
- 247.** Del Prado-Audelo ML, Caballero-Florán IH, Meza-Toledo JA, Mendoza-Muñoz N, González-Torres M, Florán B, et al. Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases. *Biomolecules.* 2019;9(2).
- 248.** Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SMM. Neuroprotective function of dj-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;
- 249.** Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2014;42 Suppl 3:S125-52.
- 250.** Li L, Feng Z, Porter AG. JNK-dependent Phosphorylation of c-Jun on Serine 63 Mediates Nitric Oxide-induced Apoptosis of Neuroblastoma Cells. *J Biol Chem.* 2004 Feb 6;279(6):4058–65.
- 251.** Neddens J, Temmel M, Flunkert S, Kerschbaumer B, Hoeller C, Loeffler T, et al. Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Jun 29;6(1):52.
- 252.** Hanna Al-Shaikh FS, Duara R, Crook JE, Lesser ER, Schaefferbeke J, Hinkle KM, et al. Selective Vulnerability of the Nucleus Basalis of Meynert Among Neuropathologic Subtypes of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 2020 Feb 1;77(2):225–33.
- 253.** Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:135. Published 2014 Sep 18.

-
- 254.** Wang X, Roper MG. Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal Methods*. 2014 May 7;6(9):3019-3024.
- 255.** Madiha S, Batool Z, Tabassum S, Liaquat L, Sadir S, Shahzad S, et al. Quercetin exhibits potent antioxidant activity, restores motor and non-motor deficits induced by rotenone toxicity. *PLoS One*. 2021 Nov 1;16(11).
- 256.** Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*. 2015 Dec 1;6:260–71.
- 257.** Chen Z wei, Liu A, Liu Q, Chen J, Li W ming, Chao X juan, et al. MEF2D Mediates the Neuroprotective Effect of Methylene Blue Against Glutamate-Induced Oxidative Damage in HT22 Hippocampal Cells. *Mol Neurobiol* 2016 543. 2016 Mar 3;54(3):2209–22.
- 258.** JM C-G, AP R, JK V. Development and Characterization of Methylene Blue Oleate Salt-Loaded Polymeric Nanoparticles and their Potential Application as a Treatment for Glioblastoma. *J Nanomed Nanotechnol*. 2017;8(4).
- 259.** Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, MacK NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Mar 3;28(8):643.
- 260.** Pouchieu C, Piel C, Carles C, Gruber A, Helmer C, Tual S, et al. Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol*. 2018 Feb 1;47(1):299–310.
- 261.** Chaves RS, Melo TQ, Martins SA, Ferrari MFR. Protein aggregation containing β -amyloid, α -synuclein and hyperphosphorylated τ in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. *BMC Neurosci*. 2010 Nov 10;11.

262. Kocis P, Tolar M, Yu J, Sinko W, Ray S, Blennow K, et al. Elucidating the A β 42 Anti-Aggregation Mechanism of Action of Tramiprosate in Alzheimer's Disease: Integrating Molecular Analytical Methods, Pharmacokinetic and Clinical Data. *CNS Drugs*. 2017 Jun 1;31(6):495–509.

263. Emery VO. Alzheimer disease: are we intervening too late? *Pro. J Neural Transm (Vienna)*. 2011 Sep;118(9):1361-78.