



**Universidad
Europea**

Máster en Bioinformática

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL
MECANISMO INMUNOMODULADOR DE
DASATINIB VS IMATINIB MEDIANTE
PROTEÓMICA Y FOSFOPROTEÓMICA**

Autor: Olivia de la Calle Jiménez

**Tutores: María Teresa Coiras López y Manuel Ángel
Remesal González**

AGRADECIMIENTOS

Lo primero de todo, me gustaría agradecer a la persona que me dio la oportunidad y confió en mí para unirme a su equipo. Gracias Mayte, por acompañarme todos estos años, y porque cuando siento que no puedo con todo, me inspiras y motivas para ir a por más. Te admiro y respeto. Manu, agradecerte la ayuda en este proyecto tan frustrante y bonito a partes iguales. Vicente, por ser un apoyo constante. Por supuesto, a todas las personas que forman parte del equipo. Laura y Montse, gracias por recibirme con una sonrisa cada vez que iba a vuestro despacho, frustrada o emocionada según cómo se diese la mañana. Por animarme y hacerme creer que podía, que solo faltaba un empujón. Ali, Clara y Mario, por acompañarme estos años y por todas las sonrisas que me habéis sacado. Espero que sigamos compartiendo dramas y alegrías juntos. Almu, Valentina, Peli, Yolanda, María y Juan, no pensaba que se podía tener tanta suerte a la hora de conocer gente nueva. Luis, te he cogido el suficiente cariño como para compartir el café. Ana Gavilán y Ana Donoso, sin vosotras habría estado más que perdida. Gracias a las dos por vuestro tiempo. Elena, eres de esas personas vitamina. ¡Qué bonito trabajar al lado de alguien que siempre le saca el lado bueno a la vida y disfruta de ella! Guiomar, ya te lo dije en su día, has sido un descubrimiento. Es una suerte compartir momentos a tu lado.

Por supuesto, a mi familia. Tía Misa, eres un regalo de la vida. Álvaro, siempre serás mi persona favorita. Espero de corazón, que la vida te ofrezca todo lo que te mereces, y tú sepas aceptarlo. Mamá, papá, me habéis enseñado que el mundo está lleno de oportunidades. Gracias papá, por enseñarme que te tomas la vida muy en serio y por eso siempre estás riendo. Mamá, por ser mi compañera y mi ejemplo a seguir. A ambos, por hacerme creer que puedo ser quien quiera, que puedo lograr lo que me proponga, que valgo. Os admiro. Supongo que la suerte llega de formas diferentes. Yo os tengo a vosotros.

He tenido la grandísima suerte de contar con amigos y familia que me quiere y me instan a seguir creciendo, a llegar a ser mi mejor versión. Desde padres, hermano, abuelos, tíos, primos y amigos. Gente que conozco de toda la vida y otra que conozco desde hace menos. El camino es mucho más fácil si lo haces con gente que te quiere y te apoya.

Índice

RESUMEN	3
1. Introducción.....	4
1.1. Propiedades principales de las tirosina quinasas.....	4
1.2. Inhibidores de tirosina quinasa	5
1.2.1. Mecanismo de acción	5
1.2.2. Imatinib y Dasatinib	7
1.3. Aplicaciones clínicas de los ITK.....	8
1.3.1. Terapia dirigida en cáncer	8
1.3.2. Inmunoterapia y papel de los ITK en la inmunomodulación	9
1.4. Nuevas aplicaciones terapéuticas	9
1.4.1. Persistencia del VIH.....	10
1.4.2. Dasatinib modula la actividad antiviral del factor SAMHD1 contra la replicación del VIH-1	11
1.4.3. Reducida actividad antiviral del imatinib en la infección por VIH-1	12
1.4.4. Dasatinib como inmunomodulador y citostático	12
1.5. Potencial senolítico del dasatinib	13
1.6. Proteómica y fosfoproteómica como herramientas de estudio.....	14
2. Hipótesis.....	15
3. Objetivos	15
4. Materiales y métodos	16
4.1. Selección de muestras	16
4.2. Extracción de sangre periférica y tratamiento de las células.....	16
4.3. Preparación y extracción de proteínas.....	16
4.4. Preparación de péptidos para LC-MS/MS: reducción, digestión y purificación	17
4.5. Análisis por LC-MS/MS	17
4.6. Análisis estadístico y representación de los resultados.....	17
4.7. Pre-procesamiento de datos para el análisis del fosfoproteoma	18
5. Resultados	19
5.1. Análisis de proteoma	19
5.1.1. Análisis de componentes principales (PCA) del proteoma.....	19
5.1.2. Análisis de expresión diferencial del proteoma	20
5.1.3. Gene Ontology (GO) y análisis de enriquecimiento KEGG de las proteínas diferenciales	21
5.1.4. Análisis de interacciones proteína-proteína.	25
5.2. Análisis de fosfoproteoma	26
5.2.1. Análisis de componentes principales (PCA) del fosfoproteoma	26
5.2.2. Análisis de expresión diferencial del fosfoproteoma	27
5.2.3. Gene Ontology (GO) y análisis de enriquecimiento KEGG de las fosfoproteínas diferenciales	29
5.2.4. Análisis de interacciones fosfoproteína-fosfoproteína.	32
6. Discusión	35
7. Conclusiones	38
Bibliografía.....	39
Anexo	50

RESUMEN

Los inhibidores de tirosina quinasas (ITK) son fármacos que bloquean la actividad de quinasas implicadas en la proliferación y señalización celular, con aplicaciones clínicas en oncología. Estudios recientes han descrito su papel inmunomodulador y antiviral.

El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar el efecto inmunomodulador de los ITK imatinib y dasatinib en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas mediante análisis proteómico y fosfoproteómico. Se buscó identificar proteínas, fosfoproteínas y rutas diferencialmente reguladas por ambos fármacos, con el fin de estudiar sus mecanismos de acción y su implicación en la modulación de procesos inmunitarios y virales.

Las PBMCs de once donantes sanos fueron estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) e interleucina-2 (IL-2), y tratadas con imatinib (10 μ M) o dasatinib (75 nM) durante 72 h. Tras la extracción proteica y digestión enzimática, se analizaron las muestras mediante LC-MS/MS. Los datos se procesaron en R para el análisis diferencial y funcional, y la base de datos STRING para generar redes de interacción proteína-proteína (PPI).

El análisis del proteoma y fosfoproteoma mostró una clara separación entre las condiciones control, imatinib y dasatinib, con perfiles moleculares diferentes. Dasatinib reguló un número significativamente mayor de proteínas y fosfoproteínas con respecto a las condiciones control, afectando rutas relacionadas con la biogénesis ribosomal, el procesamiento de ARN, la remodelación de la cromatina y la adhesión celular. Imatinib, en cambio, moduló principalmente proteínas implicadas en funciones nucleares y estructurales. Las redes PPI reflejaron una mayor conectividad y diversidad funcional en las muestras tratadas con dasatinib.

Estos resultados indican que dasatinib ejerce un efecto inmunomodulador off-target más amplio que imatinib, que es más específico de su diana terapéutica, modulando múltiples rutas de señalización y fosforilación asociadas a la función inmune, el control de la proliferación celular y la dinámica nuclear, reforzando su papel como regulador de la respuesta inmune y posible candidato para futuras aplicaciones terapéuticas en infecciones virales persistentes.

Palabras clave: proteómica, fosfoproteómica, tirosina quinasas, imatinib, dasatinib, señalización celular, inmunomodulación.

1. Introducción

1.1. Propiedades principales de las tirosina quinasas

La comunicación celular es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, la coordinación de funciones fisiológicas y la respuesta a estímulos externos. A través de una compleja red de señales químicas, las células pueden adaptarse a su entorno, diferenciarse, proliferar o inducir la muerte celular.

Uno de los principales mecanismos de comunicación intracelular es la transducción de señales a través de la activación de receptores celulares especializados (Ebrahimi et al., 2023). Este proceso implica la participación de proteínas tirosina quinasas, que catalizan la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas diana. Estas quinasas se clasifican en tirosina quinasas receptoras (RTK) y no receptoras o citoplasmáticas (NRTK) (Paul & Mukhopadhyay, 2004). Los RTK son receptores transmembrana que poseen un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa y se expresan en tejidos del organismo. Por otro lado, las NTKR carecen de dominio transmembrana y actúan asociadas a otros receptores o proteínas adaptadoras. Tanto los RTK como NTKR, desempeñan un papel importante en numerosos procesos biológicos como proliferación, diferenciación, metabolismo, regeneración, supervivencia y vías de muerte celular, y su desregulación se asocia con diversas patologías, incluyendo el cáncer (Wintheiser & Silberstein, 2025).

El proceso de transducción de señales consiste en una red de vías de unión, activación y señalización. Los ligandos específicos, formados por moléculas de señal extracelular, se unen al dominio extracelular del RTK. Esto implica la unión de monómeros en dímeros u oligómeros activos, la activación de dominios quinasa y la fosforilación de residuos de tirosina que permiten que el bucle de activación del dominio catalítico adopte una conformación que facilita la unión de ATP. El sitio de unión a ATP funciona a su vez como punto de unión de proteínas de señalización citoplasmáticas que contienen dominios de homología Src-2 (SH2) y de unión a la proteína tirosina (PTB). Estas reclutan moléculas efectoras que resultan en el ensamblaje de complejos de señalización, y la subsiguiente activación de múltiples cascadas de señalización que definen respuestas biológicas (Figura 1) (Paul & Mukhopadhyay, 2004).

La actividad de las tirosinas quinasas está fuertemente regulada. Sin embargo, su participación en los diferentes procesos biológicos puede sufrir alteraciones, desregulando

dichos procesos por mutaciones, sobreexpresión o estimulación, generando procesos patológicos. Esto ha derivado en el desarrollo de fármacos basados en la inhibición de tirosinas quinasas que bloquean la actividad de RTK o NRTK (Hartmann et al., 2009).

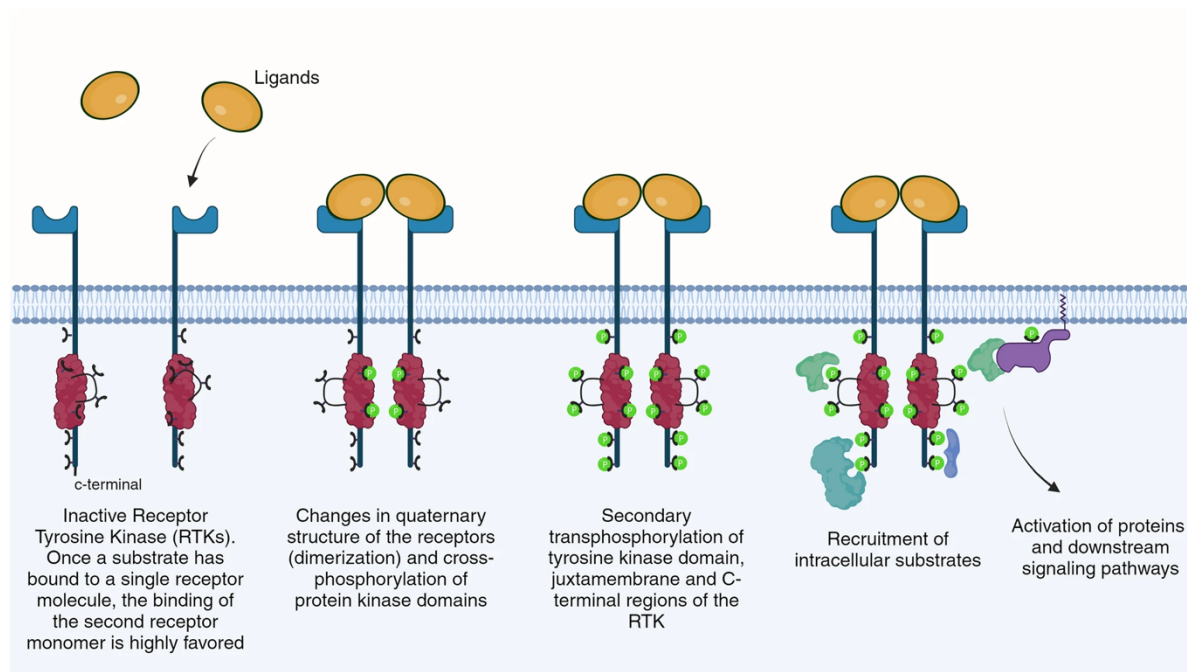


Figura 1. Mecanismo de activación y señalización intracelular de los RTK. Unión de los ligandos a los receptores transmembrana que deriva en la unión de ATP y fosforilación de residuos. Reclutamiento de sustratos que activan proteínas que participan a su vez en la activando la cascada de señalización. Imagen tomada de (Tomuleasa et al., 2024).

1.2. Inhibidores de tirosina quinasa

Las quinasas participan en una amplia red de transducción de señales cruciales para la regulación de procesos biológicos como división, proliferación y metabolismo celular. La desregulación de estas vías deriva en patologías, por lo que se consideran dianas potenciales para el desarrollo de fármacos (Norman et al., 2012). Los inhibidores de tirosina quinasa (ITK) son un grupo de fármacos que alteran las vías de transducción de señales donde están implicadas proteínas tirosina quinasas, mediante su inhibición a través de diversos mecanismos. Actualmente, hay varios ITK aprobados por diferentes agencias reguladoras, con diversas aplicaciones terapéuticas (P. Wu et al., 2015).

1.2.1. Mecanismo de acción

Los ITK pueden ser reversibles o irreversibles, formando enlaces covalentes que bloquean el sitio de unión al ATP. Los ITK se clasifican en cuatro subtipos dependiendo del

punto de unión y de la secuencia inicial de aminoácidos del bucle que controla el acceso al sitio de activación (motivo DFG) (Thomson et al., 2025):

- Inhibidores de tipo I: unión competitiva al sitio de ATP de quinasas transmembrana activas y a residuos de aspartato en el motivo DFG, con orientación hacia el sitio catalítico de la proteína quinasa.
- Inhibidores de tipo II: el motivo DFG se encuentra rotado hacia afuera, sobresaliendo del sitio de unión de ATP. Las quinasas se unen a dicho sitio de unión.
- Inhibidores de tipo III: la unión se produce en regiones alostéricas adyacentes al sitio de unión del ATP.
- Inhibidores de tipo IV: unión a sitios alostéricos alejados de la región de unión del ATP.
- Inhibidores de tipo V: aquellos que presentan múltiples modos de unión.

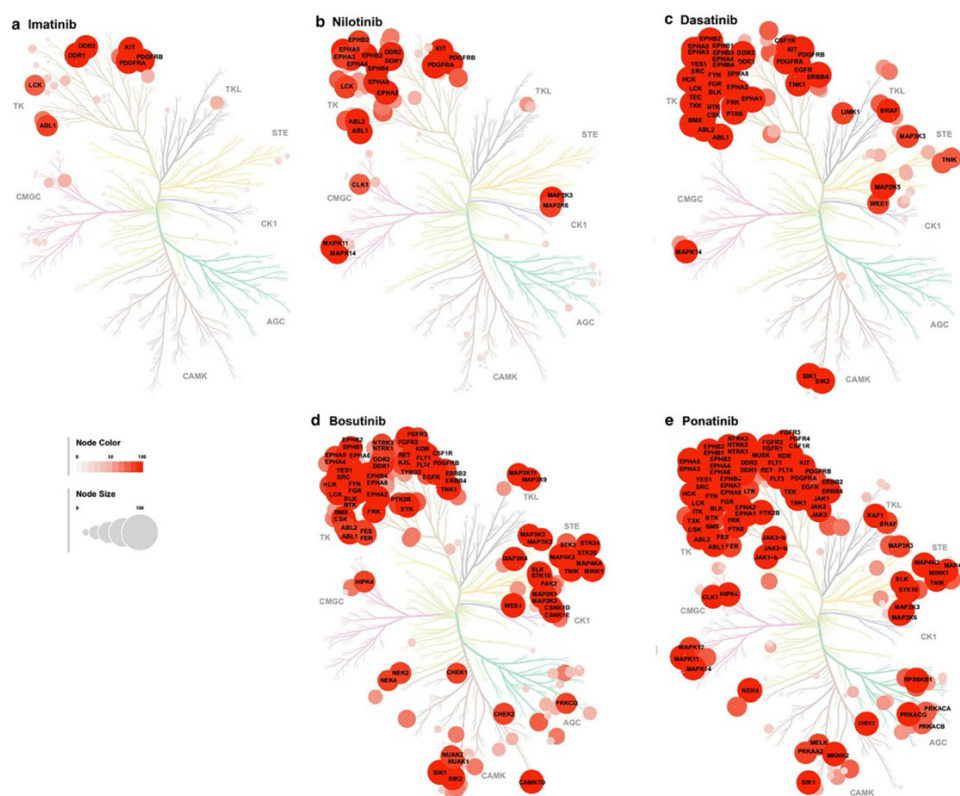


Figura 2. Inhibición diferencial y selectiva de distintos tipos de quinasas por los principales ITK utilizados en clínica. El tamaño y la intensidad de los nodos representan el grado de inhibición de las quinasas sobre las dianas. Imagen tomada de (Lee et al., 2021).

1.2.2. Imatinib y Dasatinib

Imatinib (Glivec®, Novartis) es una molécula pequeña, perteneciente al grupo de fármacos antineoplásicos, que inhibe la actividad de la tirosina quinasa BCR-ABL (conformación inactiva) y a otros RTKs como c-kit, mediante una inhibición de tipo II (se une al sitio de ATP y el bolsillo adyacente). Es un ITK de primera generación que se desarrolló siguiendo una estrategia tradicional de cribado de compuestos químicos. Actúa sobre la tirosina-quinasa aberrante BCR-ABL, característica de la leucemia mieloide crónica (LMC), uniéndose a la conformación estructural inactiva mediante una inhibición selectiva de tipo II (Lee et al., 2021). Inhibe selectivamente los procesos celulares de proliferación y apoptosis celulares en líneas BCR-ABL positivo. Además, inhibe procesos celulares mediados por la participación y activación de estos receptores. Este fármaco demostró en un estudio una mejora en la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en pacientes con LMC, asociado a una mejor respuesta en comparación con el grupo control. Imatinib presenta efectos off-target moderados e inhibe otras proteínas o RTK como c-kit o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR).

Tras la aprobación de imatinib para el tratamiento de LMC, se desarrollaron resistencias debido a mutaciones, lo que derivó en el desarrollo de ITK de segunda generación como dasatinib y nilotinib, ambos más potentes frente a BCR-ABL (Cortes et al., 2016).

Dasatinib (Sprycel®, BMS) bloquea la conformación activa y abierta de BCR-ABL (inhibición de tipo I), pero presenta múltiples efectos off-target, interfiriendo con la tirosina quinasa de receptor del gen KIT, quinasas de la familia SRC y otras proteínas (Fauziya et al., 2023). Es un inhibidor potente que se une tanto a la conformación activa como inactiva de la enzima BCR-ABL por lo que también se usa frente a LMC. Dasatinib tiene un espectro diana mayor que el imatinib (Lee et al., 2021) y es capaz de superar las barreras de resistencia a imatinib por sobreexpresión, mutaciones y activación de vías de señalización alternativas y actuar como inmunomodulador e inmunosupresor (Rivera-Torres & San José, 2019). El ensayo clínico de fase IIb DASCERN demostró una mayor respuesta molecular en pacientes con LCM tratados con dasatinib 12 meses en comparación con imatinib (Cortes et al., 2024).

1.3. Aplicaciones clínicas de los ITK

1.3.1. Terapia dirigida en cáncer

Se han identificado cambios y mutaciones en genes implicados en vías de transducción de señales que, a su vez, participan en procesos biológicos, como son los cambios en los RTK. Un aumento en la señalización de estas vías deriva en una proliferación celular incontrolada, activación oncogénica, angiogénesis y resistencia terapéutica (Ebrahimi et al., 2023).

Actualmente, los ITK se emplean como tratamientos clínicos para la LMC, leucemia linfoblástica aguda (LLA) y otras enfermedades oncohematológicas por su capacidad para inhibir la actividad desregulada de BCR-ABL, que genera una proliferación celular descontrolada principalmente en células mieloides y blastos linfoides (Rodríguez-Mora et al., 2019).

La proteína aberrante BCR-ABL deriva de una translocación entre el gen ABL1 en el cromosoma 9 y con el gen BCR en el cromosoma 22 originando el cromosoma Filadelfia (Ph). Esta oncoproteína con actividad de tirosina quinasa, promueve vías de señalización oncogénicas que impulsan la proliferación descontrolada y la resistencia a procesos apoptóticos. LMC y LLA Ph⁺ son dianas para el uso de ITK (Figura 3) (Shammas et al., 2025).

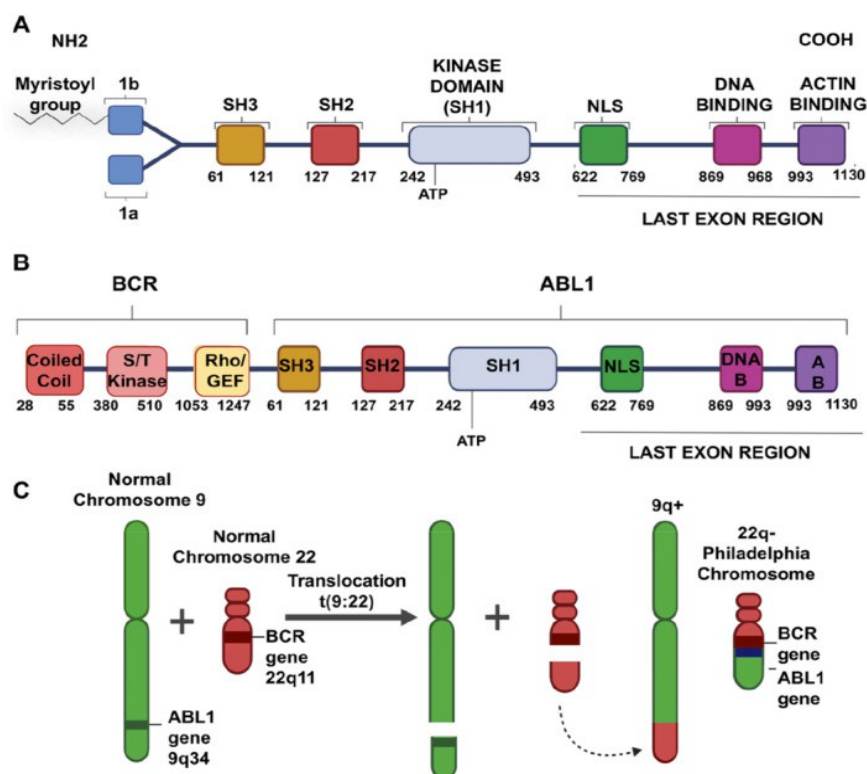


Figura 3. (A) Organización estructural de la proteína ABL1 y sus isoformas 1a y 1b. (B) Organización estructural de la proteína

de fusión BCR-ABL1 resultante de la translocación de los genes correspondientes a los cromosomas 9 y 22.

(C) Translocación de los cromosomas 9 y 22 y formación del cromosoma Filadelfia (Ph). Imagen tomada de (Shammas et al., 2025).

Los cuatro ITKs principales empleados como terapia para el tratamiento inicial de la LMC son: imatinib, dasatinib, nilotinib y osutinib. Asciminib es el primer ITK aprobado que actúa como inhibidor alostérico sobre una diana específica, uniéndose al bolsillo miristoilo de ABL1, en lugar del sitio de unión del ATP, limitando los efectos off-target (Irgit et al., 2025).

1.3.2. Inmunoterapia y papel de los ITK en la inmunomodulación

La inmunoterapia ha demostrado potenciar la respuesta inmunitaria frente a las células tumorales en el abordaje del cáncer. Se ha identificado que los ITK también ejercen efectos directos sobre células del sistema inmunitario (Blake et al., 2008; Rivera-Torres & San José, 2019) como linfocitos T, células NK, monocitos y otras subpoblaciones inmunes, afectando procesos como la activación, migración, citotoxicidad y producción de citoquinas (Blake et al., 2008; Schade et al., 2008). Este efecto inmunomodulador es relevante en el caso del dasatinib, que actúa sobre otras quinasas como SCR, Lck, Fyn y Zap70, claves en la señalización del receptor de células T (TCR) y de células NK (Rodríguez-Agustín et al., 2023; Schade et al., 2008).

Dasatinib puede tener un efecto dual: inmunosupresor en ciertos contextos, al bloquear la activación de linfocitos T, e inmunoestimulador en otros, promoviendo la expansión de subpoblaciones citotóxicas como NK y $T\gamma$ (Blake et al., 2008; Mustjoki et al., 2009).

Es por esto, que se ha dirigido la atención al uso de ITK en combinación con otras estrategias inmunoterapéuticas para modelar respuestas inmunes en infecciones virales persistente, enfermedades autoinmunes y procesos de senescencia (Rivera-Torres & San José, 2019; Rodríguez-Agustín et al., 2023).

1.4. Nuevas aplicaciones terapéuticas

Se han descrito casos de personas con el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) (PCV) que han desarrollado LMC y que han seguido un tratamiento simultáneo de terapia antirretroviral (TAR) e ITK (Vigón et al., 2021). Por ello, se ha propuesto el uso de ITK para el tratamiento de PCV con el objetivo de mejorar el perfil inflamatorio y actuar contra

la persistencia viral (Coiras et al., 2017).

1.4.1. Persistencia del VIH

El ciclo de infección y replicación del VIH-1 tiene varias fases. Los viriones expresan en su superficie glicoproteínas gp120 y gp41 que se unen al receptor CD4 de los linfocitos T CD4+, y a correceptores CCR5 o CXCR4. Esta interacción desencadena un cambio conformacional que permite la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula diana, favoreciendo la entrada de la cápside viral hasta el interior del núcleo. El ARN viral se retrotranscribe a ADN por la transcriptasa inversa viral y, posteriormente, el ADN viral se integra en el genoma celular mediante la integrasa. Una vez integrado, el provirus puede permanecer en estado latente o iniciar la expresión génica, dando lugar a nuevas copias de ARN viral, que serán traducidas a proteínas virales que se ensamblan junto con el ARN genómico para formar nuevos viriones (Figura 4) (Alcamí & Coiras, 2011).

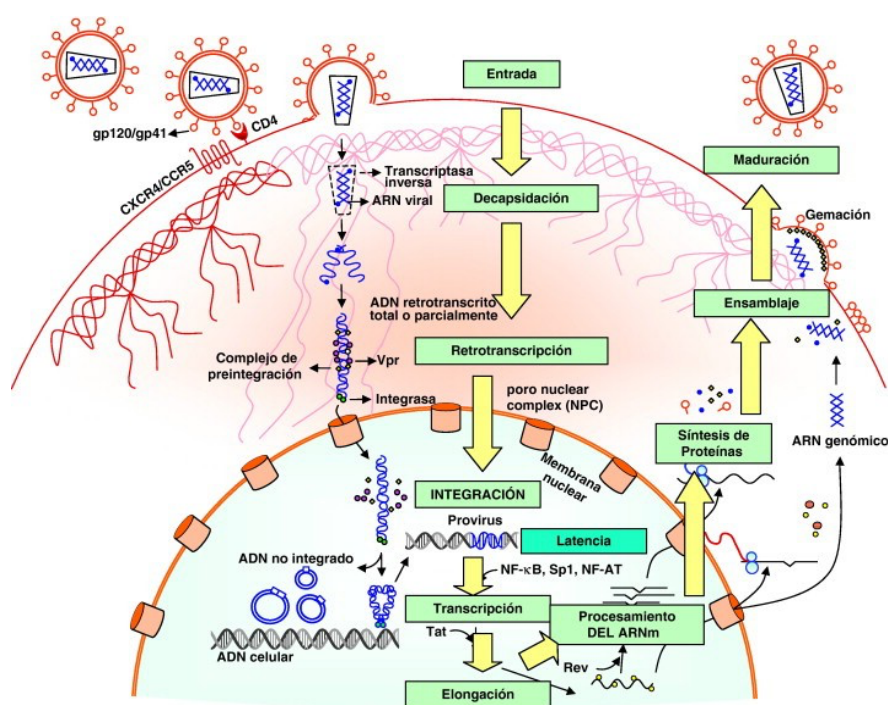


Figura 4. Ciclo viral de infección del virus del VIH. El virus se une a la superficie celular mediante la interacción de la glicoproteína gp120 con el receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4, permitiendo la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. Tras la entrada, el ARN del virus se retrotranscribe en ADNc gracias a la transcriptasa inversa, y el complejo resultante se transporta al núcleo. La integrasa viral incorpora el ADN proviral al genoma de la célula huésped, estableciendo una fase de latencia o expresión activa. Posteriormente, el ADN proviral se transcribe y traduce para generar nuevos componentes virales, que se ensamblan en la membrana plasmática y se liberan por gemación. Las partículas inmaduras sufren un proceso de maduración mediado por la proteasa viral, originando viriones funcionales capaces de iniciar nuevas infecciones. Imagen tomada de (Alcamí & Coiras, 2011).

La infección por VIH se caracteriza por una activación persistente del sistema inmunitario desencadena un estado de agotamiento inmune, caracterizado por disfunción de células efectoras, expresión de marcadores inhibidores y una respuesta antiviral ineficaz (Trautmann et al., 2006).

El mantenimiento del reservorio viral se realiza mediante mecanismos de proliferación homeostática mediados por IL-2 e IL- 7, mientras que la activación de receptores de células T (TCR) promueve la replicación activa del VIH mediante la transcripción del provirus integrado (Chomont et al., 2009; Coiras et al., 2016). Algunas de las quinasas implicadas en esta activación (Lck, Fyn, Zap70) son dianas de los ITK, por lo que su inhibición podría afectar al reservorio viral. El TAR es la principal estrategia para el tratamiento de la infección por VIH. Actúa suprimiendo la replicación, reduciendo la carga viral y deteniendo la progresión de la enfermedad. A pesar de ello, el TAR no actúa sobre las células del reservorio, por lo que su interrupción provoca invariablemente un repunte viral. Por ello, la búsqueda de nuevas estrategias contra la persistencia del reservorio del VIH-1 continúa, con el fin de encontrar una futura cura funcional.

1.4.2. Dasatinib modula la actividad antiviral del factor SAMHD1 contra la replicación del VIH-1

Para que el VIH-1 pueda infectar las células diana es necesario que primero se inactive SAMHD1, una enzima que restringe la infección por retrovirus como el VIH-1 al degradar los nucleótidos trifosfato (dNTPs) necesarios para la retrotranscripción del ARN viral a ADN. Esto sucede cuando SAMHD1 no está fosforilada, por lo que inhibición de su fosforilación puede potenciar su efecto antiviral (Rivera-Torres & San José, 2019). La inhibición de SAMHD1 la realiza el VIH-1 a través de su enzima accesoria Vpx (Descours et al., 2012).

Dasatinib inhibe la fosforilación de SAMHD1, factor antiviral innato. SAMHD1 disminuye los niveles de dNTP en su forma activa/desfosforilada, lo que constituye un factor antiviral frente a la infección por VIH-1 (Rivera-Torres & San José, 2019). La fosforilación e inactivación de SAMHD1 es inducida por el VIH-1. Los ITK pueden impedir la fosforilación de este factor, conservando así la actividad antiviral (Ambrosioni et al., 2017). La inducción de un estado citostático que mantenga a SAMHD1 en su estado desfosforilado o activo restringiendo la activación de factores de transcripción que participan en la replicación del virus puede evitar la replicación y el mantenimiento del reservorio, interfiriendo con las

células infectadas en estado latente y su proliferación homeostática (Figura 5) (Bermejo et al., 2016; Rodríguez-Mora et al., 2019).

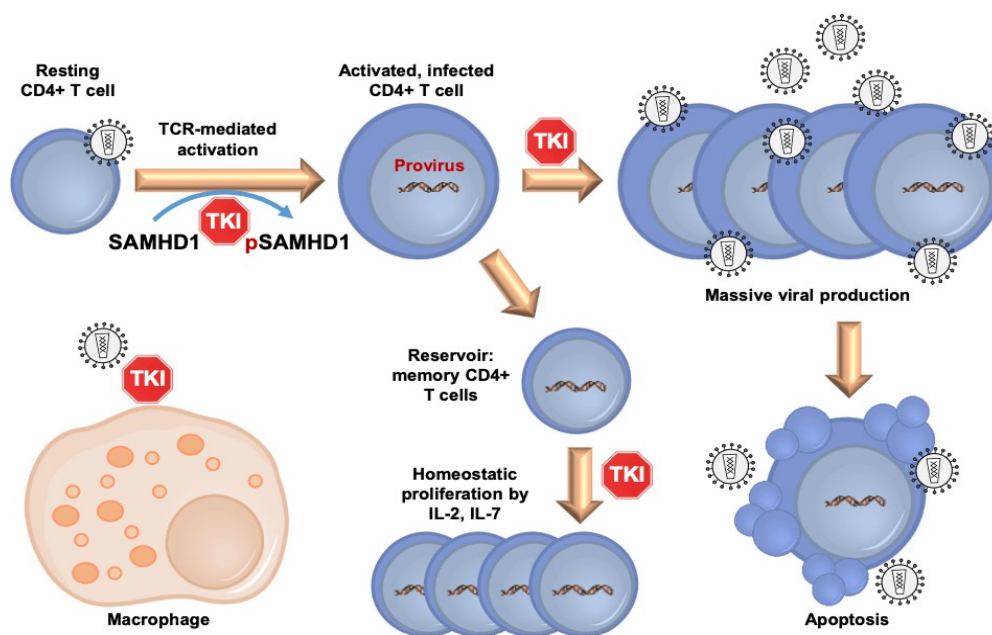


Figura 5. Mecanismos en los que intervienen los ITK y sus dianas para impedir la replicación, el mantenimiento y la infección del VIH-1. Imagen tomada de (Rodríguez-Mora et al., 2019).

1.4.3. Reducida actividad antiviral del imatinib en la infección por VIH-1

El uso de imatinib como tratamiento para la infección por VIH-1 no ha demostrado su actividad antiviral (Bermejo et al., 2018). Un ensayo clínico que analizó la capacidad de imatinib para inhibir la replicación del virus en linfocitos T CD4+, demostró que no redujo los niveles de p24, proteína estructural del VIH que forma parte de la cápside del virus, a concentraciones clínicamente seguras (Bozzi et al., 2024). Además, a diferencia del dasatinib, el imatinib no inhibe la fosforilación de SAMHD1 ni ha demostrado un impacto consistente en la replicación del VIH-1 (Bermejo et al., 2018).

1.4.4. Dasatinib como inmunomodulador y citostático

Se ha postulado el uso de ITK como antivirales al actuar a nivel del ciclo viral como inmunosupresores e inmunomoduladores (Rivera-Torres & San José, 2019). El efecto off-target del dasatinib, que se une a más de 30 quinasas diferentes, correlaciona con su intervención en la señalización del TCR, expresión de marcadores de activación, producción de citoquinas proinflamatorias y procesos de proliferación (Bantscheff et al., 2007; Rix et al., 2007).

Los linfocitos T se activan por la interacción de su receptor a proteínas NRTK, tras la unión de antígenos o ligandos. La quinasa específica de células linfocitarias (LCK) juega un papel importante en la activación de los linfocitos T y de quinasas en procesos descendentes, iniciando el proceso de transducción de señales del complejo TCR/CD3 tras el reconocimiento del antígeno (Kong et al., 2011; Palacios & Weiss, 2004). LCK, desfosforilado/inactivo cuando las células T están en reposo, se activa por la fosforilación de un residuo de tirosina situado en el dominio quinasa. La activación de LCK induce a su vez la fosforilación de SAMHD1 (Coiras et al., 2016) por lo que el uso de inhibidores selectivos de la actividad de LCK supone una estrategia inmunosupresora específica para el tratamiento de la infección por VIH-1 (Bermejo et al., 2015, 2016). El efecto inhibidor de dasatinib sobre la función de los linfocitos T, dada su capacidad para inhibir quinasas como Lck, produce una regulación negativa de la activación, proliferación y producción de citoquinas (Blake et al., 2008). Además, inhibe la fusión del VIH-1 con la célula diana sin afectar a la viabilidad celular (Harmon et al., 2010). Finalmente, pacientes tratados con dasatinib han presentado un mejor pronóstico debido a que produce una expansión transitoria de linfocitos T CD8⁺, Tγδ y células NK tras su administración, mejorando la función antiviral (Rivera-Torres & San José, 2019).

1.5. Potencial senolítico del dasatinib

La senescencia celular implica la detención del ciclo celular y genera cambios fenotípicos que impiden la apoptosis. Las células senescentes son responsables de la fragilidad provocada por la infección por VIH-1, además de co-morbididades relacionadas con el envejecimiento. Las células senescentes secretan diferentes citoquinas proinflamatorias y productos proapoptóticos y profibróticos, y favorecen una activación inmunitaria crónica (Rodríguez-Mora et al., 2019). Se están estudiando estrategias que permitan eliminar las células senescentes (compuestos senolíticos) o modificar su fenotipo (compuestos senomórficos). Dasatinib inhibe las funciones proinflamatorias de células del sistema inmune como neutrófilos, y la activación y proliferación crónica de linfocitos T (Blake et al., 2008; Futosi et al., 2012). Por lo tanto, evitaría estos sucesos crónicos derivados de la infección vírica y su papel en la senescencia celular.

1.6. Proteómica y fosfoproteómica como herramientas de estudio

La proteómica basada en espectrometría de masas es una herramienta empleada para identificar las interacciones entre fármacos y el perfil proteómico, además de las alteraciones en la fosforilación de las proteínas (Giansanti et al., 2014). En los últimos años, se ha utilizado dirigiendo su enfoque a la búsqueda de dianas efectivas para el tratamiento con ITK. Un estudio identificó posibles dianas terapéuticas para imatinib, diferentes a la quinasa BCR-ABL, en la línea celular A431 mediante el estudio del perfil proteómico y la cuantificación de la fosforilación de residuos tirosina inducido por el tratamiento (Giansanti et al., 2014). Otro estudio ha identificado el efecto de dasatinib en aproximadamente 1.000 fosfopéptidos y vías de señalización MAPK, implicadas en procesos celulares como el splicing del ARN (Pan et al., 2009). Además, se realizó un ensayo para estudiar el efecto sobre la fosforilación de residuos de tirosina tras el tratamiento e inhibición de células K562 con imatinib, y el análisis de motivos proteicos presentes en determinados péptidos (Preisinger et al., 2013).

La inmunoprecipitación combinada con espectrometría de masas ha permitido estudiar el perfil de residuos de tirosina fosforilados en las quinasas BCR-ABL de diferentes líneas celulares en individuos con LMC (Goss et al., 2006). Sin embargo, el impacto funcional de los ITK se extiende a múltiples rutas de señalización celular en distintos tipos celulares. El análisis comparativo del proteoma y fosfoproteoma se convierte en una herramienta clave para comprender de forma integral cómo estos fármacos modulan procesos celulares como la activación, proliferación o apoptosis. Por lo tanto, la caracterización global de los cambios en la expresión proteica y en la fosforilación de residuos de tirosina, permite identificar posibles mecanismos de acción y vías alteradas, y mejorar el diseño de terapias dirigidas y encontrar nuevas dianas terapéuticas.

2. Hipótesis

El tratamiento de PBMCs con los ITK imatinib y dasatinib induce cambios específicos en el perfil de fosforilación de proteínas, que se reflejan en alteraciones en el proteoma y fosfoproteoma. Estos cambios están asociados a rutas de señalización funcionalmente relevantes que pueden ayudar a la identificación de dianas terapéuticas relacionadas con el potencial antiviral, antiinflamatorio y senolítico de los ITK, y que pueden identificarse mediante análisis bioinformático y estadístico a nivel de péptido, proteína y categoría funcional. Dada la mayor selectividad de imatinib frente a BCR-ABL, se espera que ejerza un impacto más limitado sobre la fosforilación global de proteínas, mientras que dasatinib, por sus múltiples efectos off-target, debería inducir una desregulación más amplia del proteoma y del fosfoproteoma.

Mediante este estudio se pretende identificar rutas de señalización y posibles dianas terapéuticas que expliquen las diferencias funcionales entre ambos inhibidores, así como profundizar en la comprensión de sus mecanismos moleculares y valorar su potencial aplicación en patologías no oncológicas, como la persistencia viral.

3. Objetivos

Objetivo principal: evaluar el efecto inmunomodulador de los ITK imatinib y dasatinib sobre el proteoma y el fosfoproteoma de PBMCs, mediante un análisis comparativo con la condición control a nivel de péptido, proteína y categoría funcional.

Objetivos secundarios:

- Realizar un análisis cuantitativo y estadístico del proteoma y fosfoproteoma de PBMCs tratadas con ITKs.
- Identificar cambios estadísticamente significativos en las condiciones tratadas frente al control.
- Caracterizar el patrón de fosforilación y determinar las principales proteínas y rutas afectadas.
- Determinar las categorías funcionales más alteradas en términos de fosforilación, estableciendo relaciones biológicas relevantes.
- Realizar una interpretación biológica de los resultados mediante herramientas gráficas y estadísticas para obtener conclusiones funcionales relevantes.

4. Materiales y métodos

4.1. Selección de muestras

Once donantes sanos se reclutaron en el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid (CTM). El estudio fue elaborado bajo la aprobación del CTM.

4.2. Extracción de sangre periférica y tratamiento de las células

Se obtuvieron muestras de sangre de 10 ml en tubos EDTA y se extrajeron las PBMCs mediante una centrifugación a 2100 r.p.m. en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia Corporation, North Peapack, NJ) durante 35 minutos, a temperatura ambiente. Las PBMCs se lavaron con tampón fosfato salino (PBS al 1x) y se criopreservaron en nitrógeno líquido usando medio de congelación (suero bovino fetal con dimetilsulfóxido al 10%), para su posterior análisis.

4.3. Preparación y extracción de proteínas

Para cada una de las 11 muestras analizadas se descongelaron 50 millones de PBMCs que se cultivaron en las siguientes condiciones: todas las muestras fueron estimuladas durante 72 horas con el mitógeno fitohemaglutina (PHA) y con interleucina-2 (IL-2) para inducir la homeostasis de los linfocitos T; tres réplicas biológicas se mantuvieron como controles, cuatro réplicas biológicas fueron además tratadas con imatinib a 10 μ M y cuatro réplicas biológicas fueron además tratadas con dasatinib 75 nM.

La lisis celular para obtener las proteínas totales y fosforiladas se llevó a cabo empleando el tampón de extracción: Tris-HCl 50 mM pH 8,5 y SDS 2% (p/v) tras centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. La mezcla se incubó a temperatura ambiente con agitación continua a baja velocidad durante 15 minutos. A continuación, se realizó un breve spin y se calentó la muestra 10 min a 97 °C. Tras la incubación, se centrifugó la muestra a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se determinó la concentración de proteína total en 1 μ L del sobrenadante mediante un ensayo Bradford (Bio-Rad), generando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones de 0 a 2 mg/mL, midiendo cada muestra por triplicado. El volumen de cada muestra se ajustó a 200 μ g de proteína total. Tanto el sobrenadante como el pellet se almacenaron a -20°C y se enviaron para su análisis al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) en Madrid.

4.4. Preparación de péptidos para LC-MS/MS: reducción, digestión y purificación

Las muestras de proteínas totales se descongelaron y se trataron con ditioneitol (DTT) 10mM y se incubaron 30 minutos a 56°C con agitación. Tras enfriarse, se añadió iodoacetamida 20mM y se incubó en oscuridad 30 minutos. Se añadieron cuatro volúmenes de etanol (-20°C), se incubó una hora a -20°C para precipitar las proteínas y eliminar restos de detergente, recuperando el precipitado por centrifugación. El lisado proteico se diluyó cuatro veces con bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8) y se realizó la digestión con endopeptidasa LysC y tripsina en una proporción 1:100 (enzima:proteína en masa) 37°C 16 horas.

4.5. Análisis por LC-MS/MS

Se marcaron las muestras de péptidos con reactivos TMT-10, para que las muestras marcadas se separen mediante cromatografía líquida de fase reversa a pH alto y columnas con microesferas C18 de 15 cm (cromatografía líquida Easy Nano, Thermo Fisher Scientific). Tras la mezcla con TMT-10, se dividió el pool de muestras en dos alícuotas: 1) análisis global/proteómico y 2) análisis de péptidos fosforilados. Para este último, se pasó el extracto de péptidos TMT-marcados por una columna/resina Ti⁴⁺ a la cual se unieron los fosfopéptidos. Mediante competición con fosfato de amonio pH 7-8 se liberaron los fosfopéptidos de la resina. El análisis de péptidos de la fracción global y de la enriquecida, se realizó en un sistema nano-LC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (LC-MS, Thermo Fisher Scientific, modelo Orbitrap Fusion Lumos).

4.6. Análisis estadístico y representación de los resultados

Los análisis estadísticos y la representación gráfica de los resultados del proteoma y fosfoproteoma, se realizaron con el software R (v4.4.2). Las figuras de componentes principales (PCA) se generaron utilizando el paquete ggplot2. El análisis de expresión diferencial de proteínas y fosfoproteínas entre condiciones se realizó con el paquete limma, aplicando una corrección de p-valor y por valor de AvA. Para la visualización de proteínas y fosfoproteínas diferencialmente expresadas se utilizó el paquete pheatmap. El análisis de enriquecimiento funcional (Gene Ontology y KEGG) se llevó a cabo con el paquete clusterProfiler, empleando un ajuste por p-valor < 0,05 como umbral de significancia. Las

redes de interacciones proteína-proteína (PPI) se generaron a partir de las proteínas diferencialmente expresadas mediante la base de datos STRING (v12.0), aplicando un umbral de confianza de 0.7 y agrupando las proteínas mediante el algoritmo de clustering Markov. Los esquemas de flujos de trabajo experimental y el análisis bioinformático se encuentran en el Anexo (Figuras suplementarias 1 y 2).

4.7. Pre-procesamiento de datos para el análisis del fosfoproteoma

Los datos crudos se procesaron en RStudio 2024.12.0+467 con R 4.4.2 empleando los paquetes readxl, dplyr, writexl y limma. Se generó un data.frame en el que cada fila corresponde a una proteína o péptido identificado y cuantificado, del fichero Excel original. Se filtraron las filas correspondientes a secuencias de péptidos que contenían el carácter “\$”, para conservar únicamente los péptidos fosforilados. La tabla resultante se exportó en formato CSV para los posteriores análisis. Además, se realizó un filtrado por significación estadística, aceptando las celdas que presentaban p-valor < 0,05 y sobre este subconjunto, se aplicó un segundo filtro para excluir aquellos péptidos cuya media de variación promedio estuviera dentro del rango 1,2-1,3, quedando así sólo las señales con cambios de abundancia fuera de ese intervalo, más consistentes con efectos biológicos relevantes.

5. Resultados

5.1. Análisis de proteoma

5.1.1. Análisis de componentes principales (PCA) del proteoma

El análisis mostró una separación entre las diferentes condiciones experimentales a nivel de proteoma. Las réplicas correspondientes a las condiciones de control, imatinib y dasatinib del proteoma formaron agrupamientos bien definidos en el espacio (PC1 y PC2), con más del 75% de varianza, sugiriendo diferencias en los perfiles proteómicos entre las tres condiciones (Figura 1, gráfica izquierda). Al analizar de manera específica entre control e imatinib (Figura 1, gráfica arriba a la derecha), se observa igualmente una separación entre ambos grupos, estando las réplicas biológicas agrupadas por condición. Asimismo, la comparación del proteoma entre control y dasatinib (Figura 1, gráfica abajo a la derecha) muestra una separación entre ambas condiciones. Esto refleja el efecto diferencial que ejercen los inhibidores de tirosina quinasas sobre la regulación proteica, en este caso imatinib y dasatinib sobre el perfil proteómico de las PBMCs.

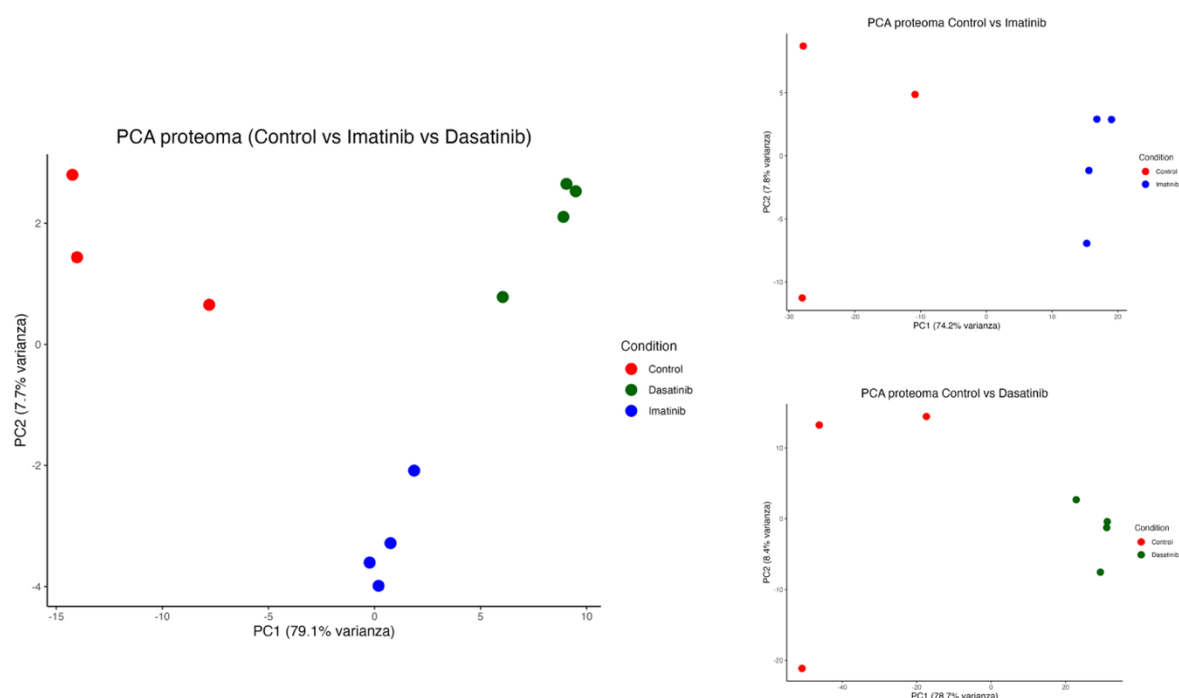


Figura 1. Análisis de componentes principales (PCA) del proteoma. Izquierda: PCA global que muestra la separación entre control (rojo), imatinib (azul) y dasatinib (verde). Derecha superior: comparación de control vs imatinib. Derecha inferior: comparación de control vs dasatinib.

5.1.2. Análisis de expresión diferencial del proteoma

El análisis de expresión diferencial del proteoma muestra que tanto imatinib como dasatinib inducen alteraciones significativas en la regulación y expresión de proteínas respecto al control. En el volcano plot correspondiente a imatinib (Figura 2A, izquierda), se identifican varias proteínas diferencialmente reguladas, con un conjunto de proteínas sobreexpresadas mostradas en color rojo y otras con una marcada disminución de su abundancia relativa (color azul). El tratamiento con dasatinib (Figura 2B, derecha) también muestra varias proteínas diferencialmente expresadas en comparación con el control.

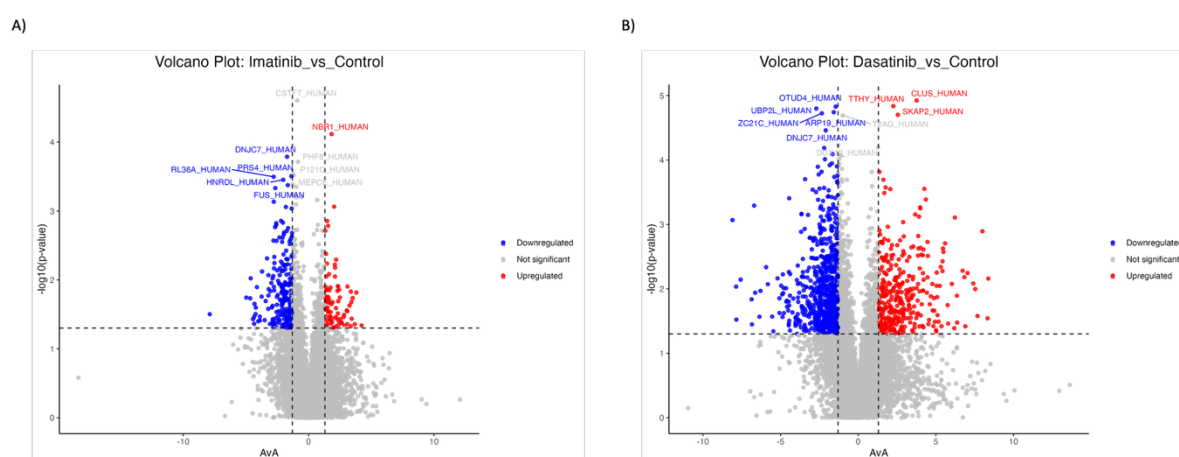


Figura 2. Análisis de volcano plot en el proteoma. Volcano plots de imatinib vs control (izquierda) y dasatinib vs control (derecha). Los puntos rojos indican proteínas sobreexpresadas, las azules proteínas infrarreguladas y las grises proteínas no significativas.

La representación de las proteínas diferencialmente expresadas entre imatinib frente a control y dasatinib frente a control permitió observar diferencias evidentes en el patrón de fosforilación afectado por cada uno de los ITK. La gráfica correspondiente a las 50 proteínas mejor clasificadas al comparar imatinib vs. control frente a dasatinib vs. control (Figura 3A), distingue claramente dos bloques de regulación. Se observa que la mayoría de las proteínas siguen la misma tendencia de regulación en ambos inhibidores, aunque con distinta magnitud: aquellas aumentadas en imatinib también presentan incremento con dasatinib y lo mismo con las proteínas disminuidas. Además, el análisis muestra un pequeño grupo de proteínas cuya desregulación es específica del tratamiento con imatinib, no siendo desreguladas por dasatinib. Sin embargo, el tratamiento con dasatinib desregula un grupo mayor de proteínas que no son desreguladas por imatinib (Figura 3B). Finalmente, el análisis

de las 50 proteínas comunes desreguladas por ambos inhibidores muestra que los cambios se producen en la misma dirección, ya sea aumento o disminución en la abundancia proteica, aunque con distinta intensidad (Figura 3C).

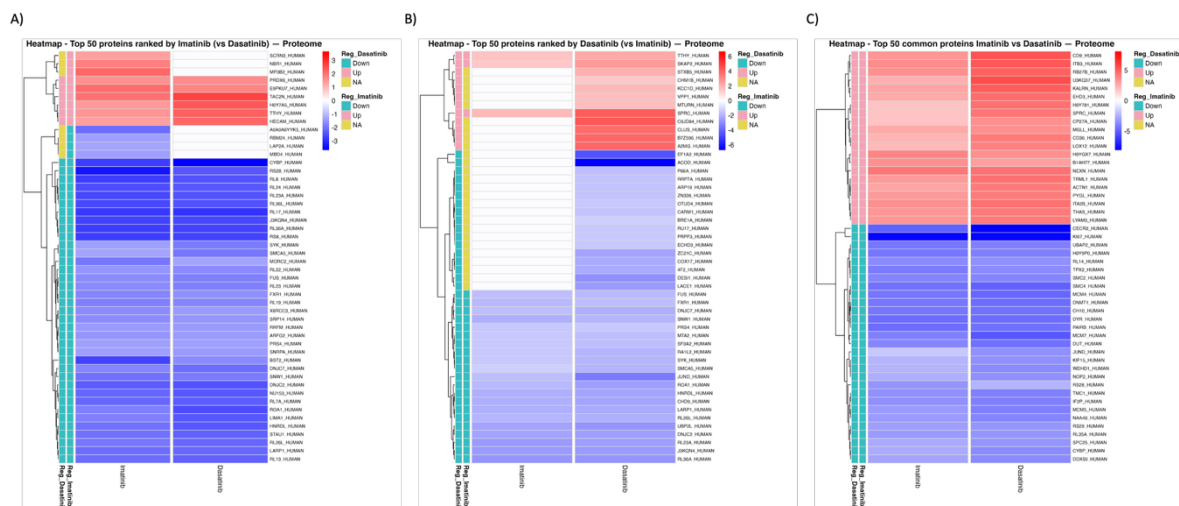


Figura 3. Análisis de heatmap de las 50 proteínas más diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib vs. control frente a dasatinib vs. control. Se muestran las proteínas clasificadas por cada inhibidor de manera independiente (gráfica izquierda-A y centro-B) y el conjunto de proteínas comunes entre ambos (gráfica derecha-C). Las intensidades de color reflejan los niveles relativos de abundancia proteica. Gráfica con imágenes separadas, con mejor enfoque y resolución en Anexos. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

Estos resultados confirman que los inhibidores imatinib y dasatinib generan efectos diferenciales sobre el proteoma de las PBMCs, con cambios específicos en proteínas clave y perfiles que permiten distinguir claramente ambos tratamientos.

5.1.3. Gene Ontology (GO) y análisis de enriquecimiento KEGG de las proteínas diferenciales

El análisis de procesos biológicos (BP) muestra que imatinib y dasatinib desregulan específicamente rutas relacionadas con la biogénesis y el metabolismo de los ribosomas, así como con la traducción y el procesamiento de ARN (Figura 4). Sin embargo, hay diferencias en la magnitud y diversidad de los cambios: imatinib incide en el ensamblaje de orgánulos no membranosos y de gránulos de estrés (Figura 4A), mientras que dasatinib tiene un efecto más amplio, incluyendo procesos de organización de complejos proteína-RNA y maduración de subunidades ribosomales (Figura 4B). Esto indica que, aunque ambos inhibidores impactan en la maquinaria de síntesis proteica, dasatinib ejerce un efecto más extendido sobre procesos asociados a la biogénesis y dinámica del ribosoma.

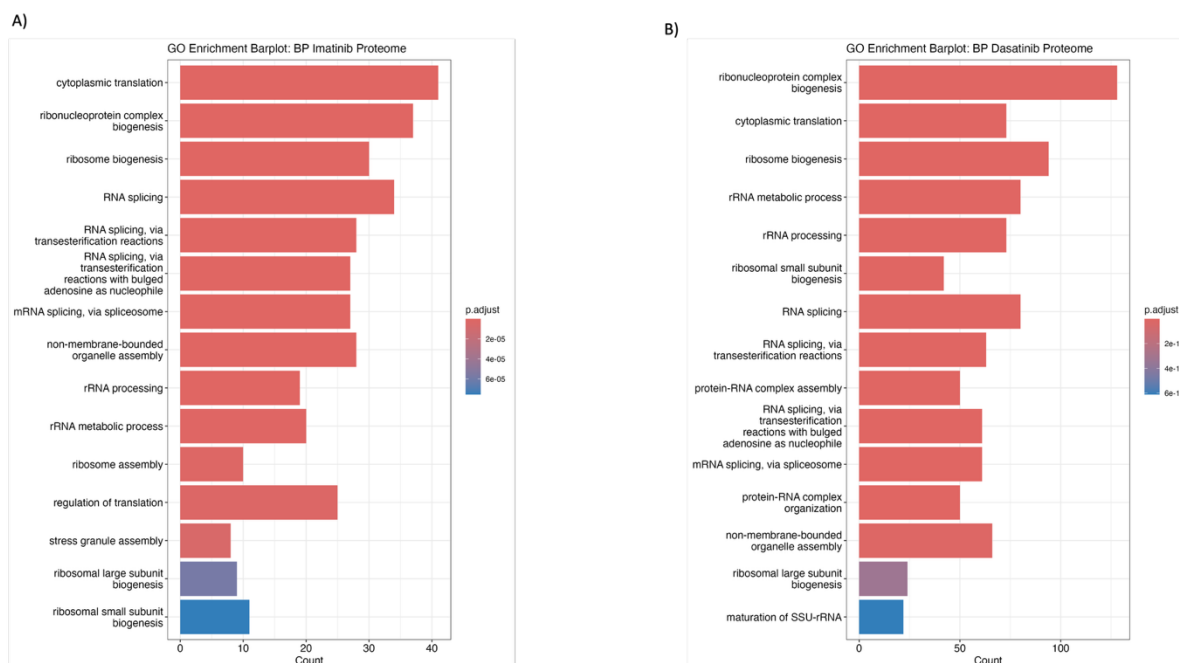


Figura 4. Análisis de enriquecimiento en términos de procesos biológicos (GO-BP) para las proteínas diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x representa el número de proteínas asociadas a cada término, mientras que el color de las barras indica el valor de p-ajustado (p.adjust). Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

En el nivel de funciones moleculares (MF), ambos ITK también se asocian con actividades vinculadas a la estructura ribosomal y la unión a ARN/proteínas, pero con perfiles diferenciales. El tratamiento con imatinib produjo enriquecimiento en proteínas ribosomales y la unión a cadherinas, además de actividades relacionadas con el inicio de la traducción y factores de unión a ADN/ARN (Figura 5A), mientras que dasatinib causó más desregulación de actividad de hidrólisis de ATP, regulación de la traducción y actividad helicasa, sugiriendo una mayor influencia en la regulación energética y dinámica de procesos de traducción y remodelación de ácidos nucleicos (Figura 5B). En conjunto, esto refleja que imatinib afecta principalmente funciones estructurales y de interacción, mientras que dasatinib impacta en funciones reguladoras y enzimáticas.

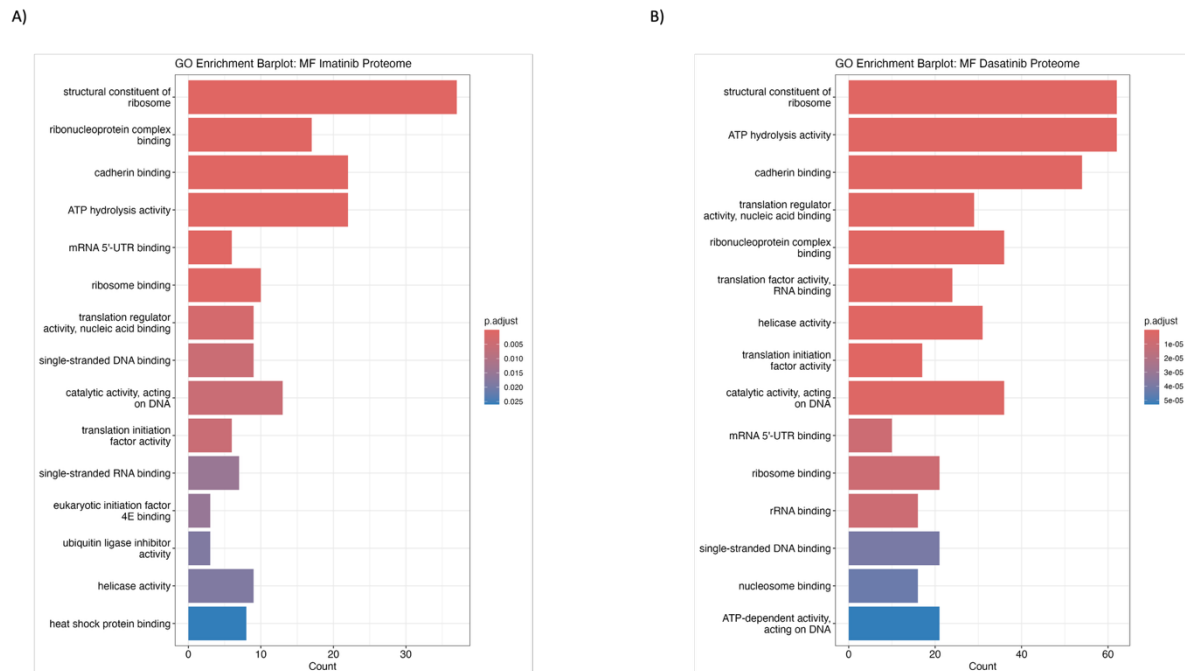


Figura 5. Gráficos de barras del análisis de enriquecimiento en términos de funciones moleculares (GO-MF) para las proteínas diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x muestra el recuento de proteínas y la escala de color corresponde al valor de p.adjust. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

El análisis de componentes celulares (CC) resalta que ambos inhibidores actúan en el ribosoma y sus subunidades, principales estructuras alteradas. En imatinib, además de ribosomas, se identifica un enriquecimiento en el espliceosoma y en componentes de uniones focales y gránulos citoplasmáticos, efectos sobre ensamblajes de ARN y estructuras celulares específicas (Figura 6A). Dasatinib, en cambio, induce un enriquecimiento más marcado y diversificado en compartimentos ribosomales y luminales, junto con la adhesión focal y el espliceosoma (Figura 6B).

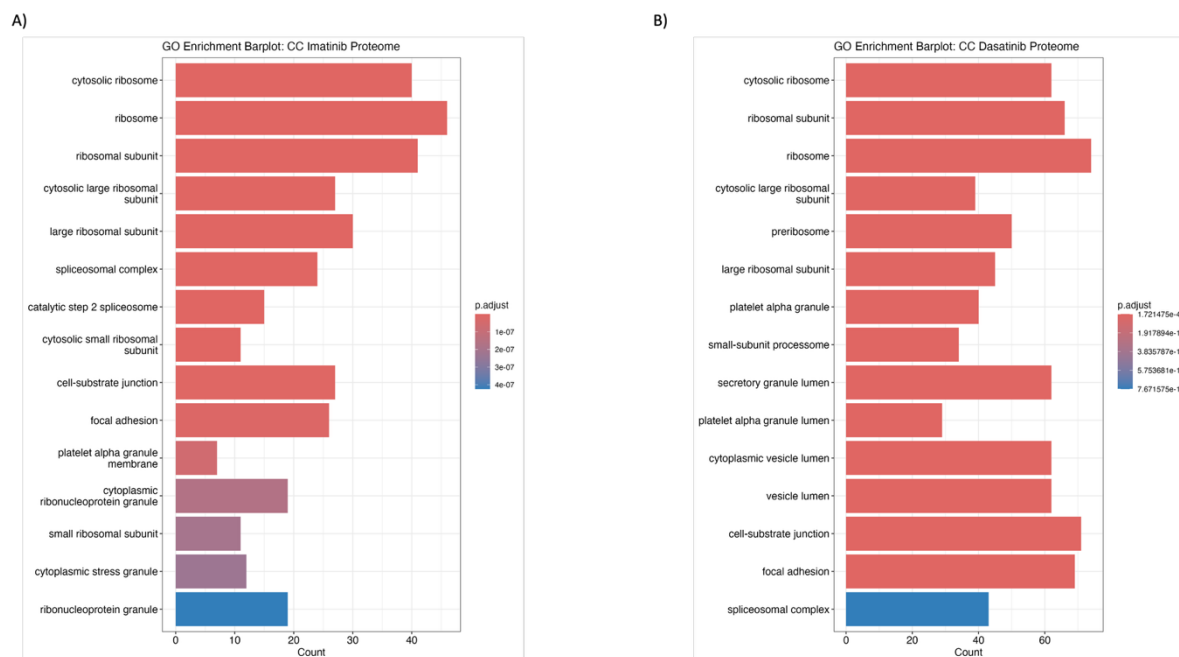


Figura 6. Análisis de enriquecimiento en términos de componentes celulares (GO-CC) para las proteínas diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x indica el número de proteínas asociadas a cada término, y la intensidad de color refleja el valor de *p.adjust*. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

El análisis de vías KEGG muestra que, en el caso de imatinib, se inducen cambios en proteínas relacionadas con espliceosoma, replicación del ADN y reparación por escisión de bases, lo que sugiere un efecto sobre procesos de reparación de ADN y procesamiento de ARN (Figura 7A). Dasatinib produce una desregulación mucho más amplia de vías enriquecidas, incluyendo, además de las anteriores, rutas de activación plaquetaria, uniones gap, reparación de errores de apareamiento de bases y vías cardiovasculares (miocardiopatía dilatada e hipertrófica) (Figura 7B).

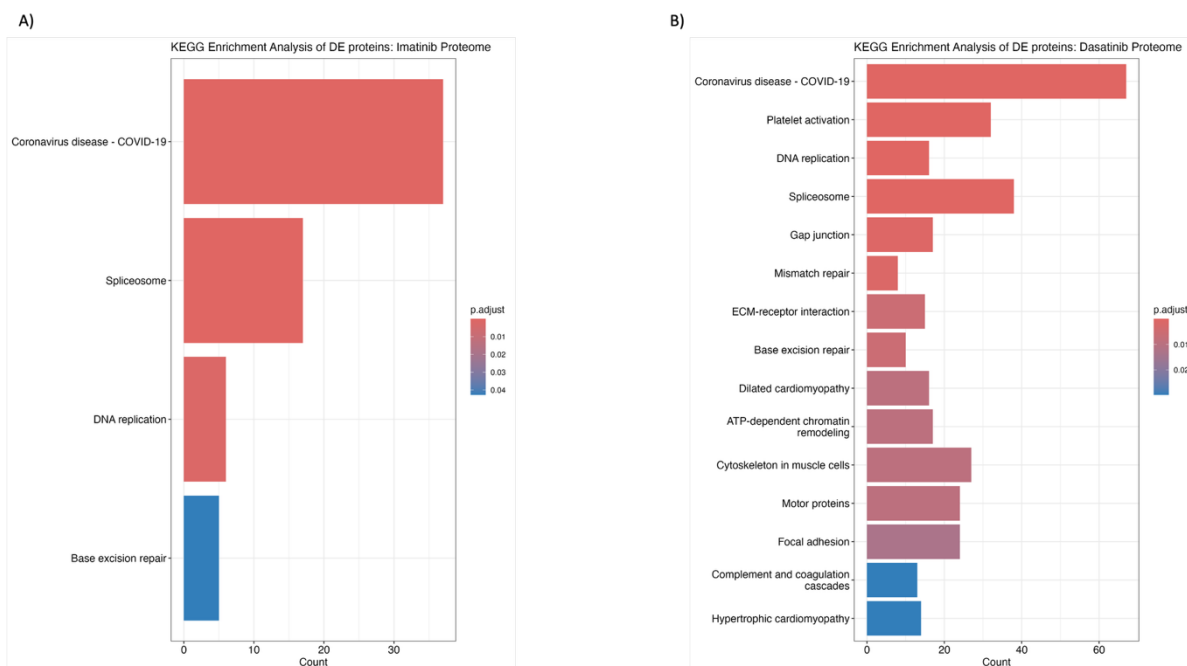


Figura 7. Análisis de enriquecimiento de rutas KEGG para las proteínas diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x representa el número de proteínas implicadas en cada ruta, y el color de las barras indica el valor de p.adjust. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

5.1.4. Análisis de interacciones proteína-proteína.

Dasatinib desregula la mayoría de las proteínas exclusivas (71,8%, 792), frente a un 4,62% (51) por imatinib (Figura 8). Un 23,6% de las proteínas (260) eran desreguladas por ambos ITK.

Diagrama de Venn Proteoma

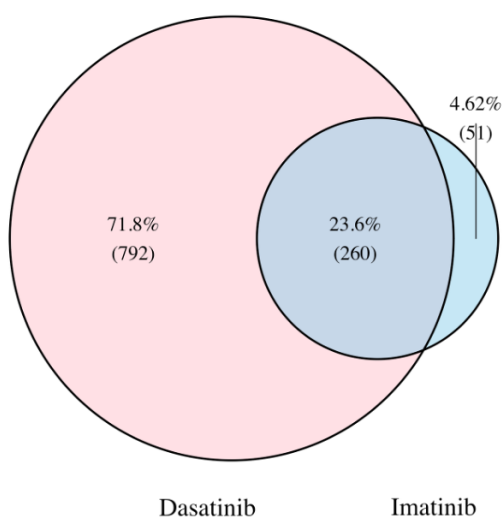


Figura 8. Diagrama de Venn que muestra las proteínas diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib y dasatinib. Se representan las fracciones exclusivas de cada inhibidor y el conjunto de proteínas comunes a ambos. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control y dasatinib vs. control.

El análisis de interacciones proteína-proteína (PPI) mediante STRING reveló diferencias notables en la organización de las redes proteicas entre los tratamientos con imatinib y dasatinib, así como en el conjunto de proteínas comunes. En la primera red, con proteínas exclusivas reguladas por Imatinib (Figura 9A), la red muestra un número moderado de interacciones, con un clúster central compacto y varios nodos periféricos menos conectados. En la red global exclusiva de proteínas reguladas únicamente por dasatinib (Figura 9B), la red es mucho más densa y compleja, con múltiples clústeres interconectados y una alta conectividad global. La red formada por las proteínas compartidas entre ambos tratamientos (Figura 9C) conserva un clúster central robusto, con conexiones relevantes en procesos de regulación de ARN, metabolismo y señalización.

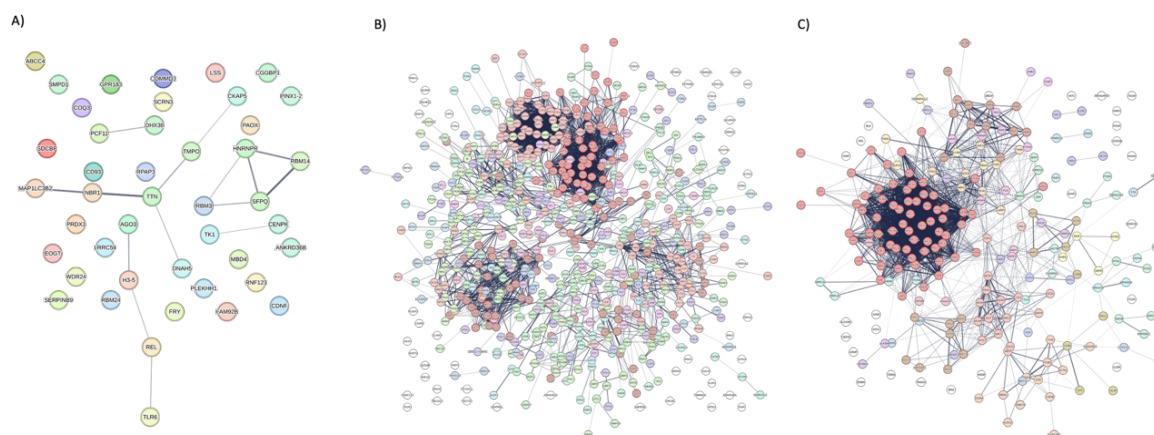


Figura 9. Redes de interacciones proteína-proteína (PPI) obtenidas mediante STRING a partir de las proteínas diferencialmente expresadas en el proteoma tras tratamiento con (A) imatinib, (B) dasatinib y (C) proteínas comunes a ambos inhibidores. Los nodos representan proteínas y las aristas corresponden a interacciones predichas o conocidas, destacando diferencias en densidad y organización de las redes entre tratamientos. Gráfica con imágenes separadas, con mejor enfoque y resolución en Anexos.

5.2. Análisis de fosfoproteoma

5.2.1. Análisis de componentes principales (PCA) del fosfoproteoma

Las réplicas de las diferentes condiciones en el análisis del fosfoproteoma están agrupadas de manera diferente, con más del 50% de varianza y reflejando que las modificaciones en el estado de fosforilación de las proteínas dependen de la condición del tratamiento (Figura 2, gráfica izquierda). La comparación y separación de las réplicas entre los grupos control e imatinib (Figura 2, arriba a la derecha), y control vs dasatinib (Figura 2, abajo a la derecha) muestran diferencias claras entre los controles y los tratamientos.

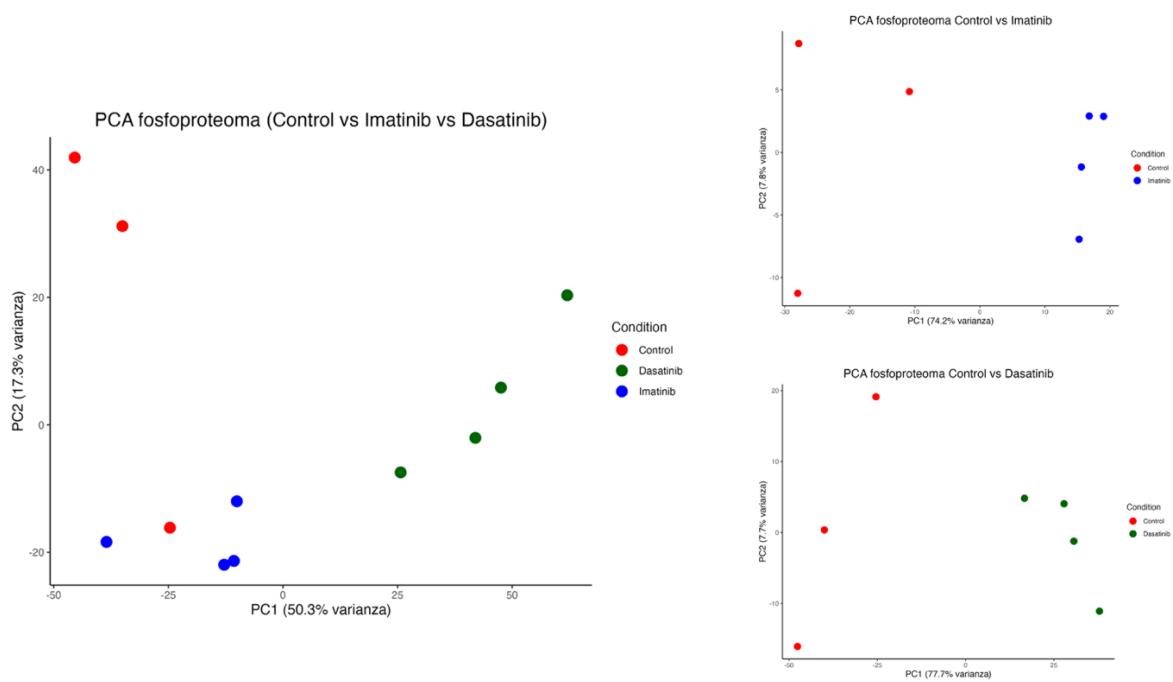
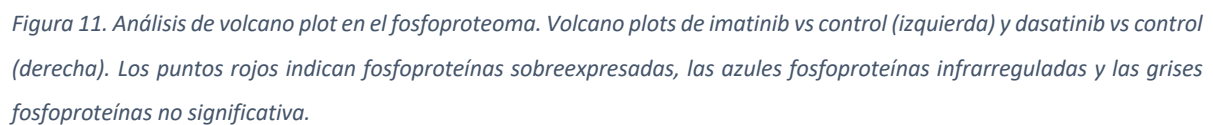


Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) del fosfoproteoma. Izquierda: PCA global que muestra la separación entre control (rojo), imatinib (azul) y dasatinib (verde). Derecha superior: comparación de control vs imatinib. Derecha inferior: comparación de control vs dasatinib.

5.2.2. Análisis de expresión diferencial del fosfoproteoma

Imatinib y dasatinib inducen cambios específicos en la fosforilación de proteínas respecto a los controles. En el volcano plot de imatinib (Figura 6A, gráfica izquierda) se han identificado proteínas con un aumento significativo de su nivel de fosforilación, mientras que otras muestran una disminución marcada en comparación con el control. El volcano plot correspondiente a dasatinib (Figura 6B, gráfica derecha) muestra un perfil de regulación diferencial con un mayor número de proteínas significativamente reguladas con respecto a los controles.



Las 50 fosfoproteínas desreguladas más relevantes en la comparación imatinib vs. control frente a dasatinib vs. control reflejan una regulación diferente de eventos de fosforilación según el inhibidor (Figura 12A). Se distinguen perfiles diferenciales bien definidos en los que muy pocas fosfoproteínas están exclusivamente desreguladas por imatinib. Sin embargo, cuando esta comparación es entre dasatinib vs. control respecto a imatinib vs. control, se observan muchas más proteínas desreguladas solamente con dasatinib (Figura 12B). Por último, el heatmap correspondiente a las 50 fosfoproteínas comunes más reguladas entre ambos inhibidores evidencia un contraste marcado: las mismas fosfoproteínas presentan cambios opuestos de fosforilación o en la intensidad de regulación en función del tratamiento recibido (Figura 12C).



Figura 12. Análisis de heatmap de las 50 fosfoproteínas más diferencialmente reguladas tras tratamiento con imatinib frente a dasatinib. Se representan los perfiles individuales para cada inhibidor (gráfica izquierda-A y centro-B) y el grupo de fosfoproteínas comunes a ambos tratamientos (gráfica derecha-C). La escala de color indica los niveles relativos de fosforilación. Gráficas con imágenes separadas, con mejor enfoque y resolución en Anexos. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

5.2.3. Gene Ontology (GO) y análisis de enriquecimiento KEGG de las fosfoproteínas diferenciales

El análisis de enriquecimiento del fosfoproteoma reveló que imatinib y dasatinib alteran de manera diferencial procesos celulares clave vinculados a la regulación de la señalización y la dinámica nuclear. Imatinib y dasatinib afectan de forma destacada rutas relacionadas con el ARN splicing y el procesamiento de ARNm. En el caso de imatinib, están enriquecidos procesos asociados al metabolismo del ARN y la regulación de la cromatina, incluyendo reparación de doble cadena (Figura 13A). En contraste, dasatinib afecta a un repertorio más amplio, abarcando además transporte nuclear, señalización mediada por GTPasas y organización supramolecular (Figura 13B).

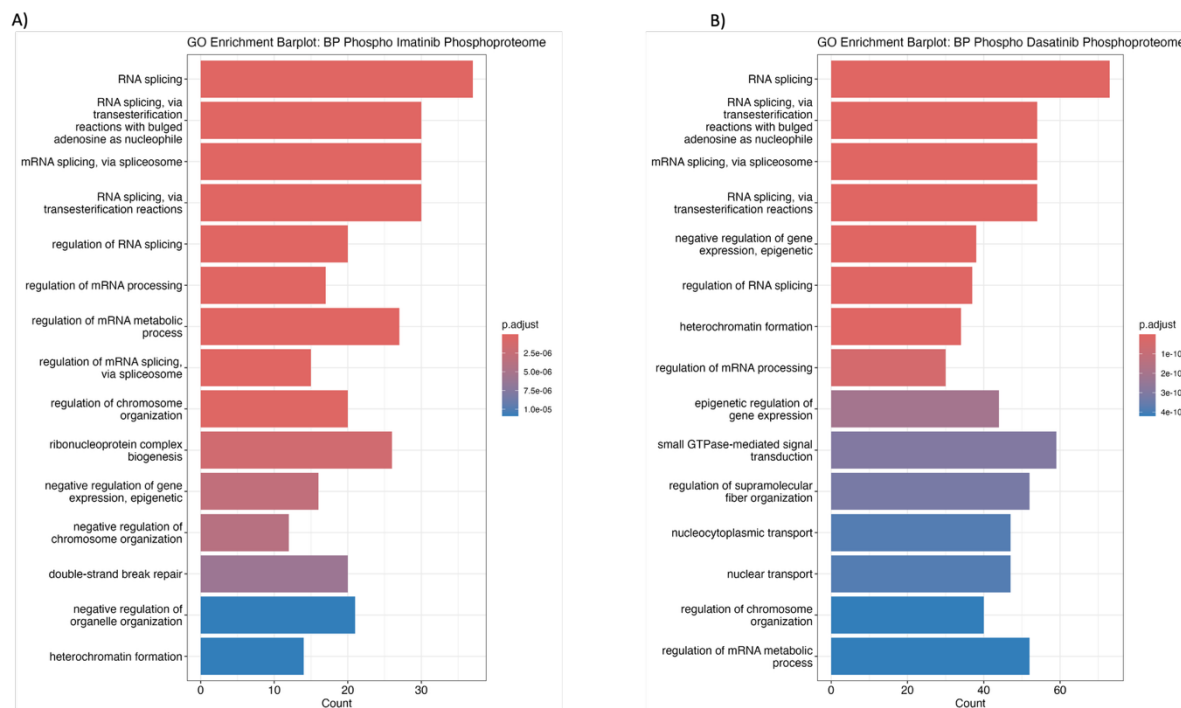


Figura 13. Gráficos de barras del análisis de enriquecimiento en procesos biológicos (GO-BP) del fosfoproteoma tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x indica el número de proteínas asociadas a cada término, y la escala de color representa el valor de p.adjust. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

En las funciones moleculares, imatinib señala un enriquecimiento en actividades relacionadas con la unión a histonas y cadherinas, así como en adaptadores proteína-cromatina y actividades enzimáticas vinculadas al ADN (Figura 14A). Dasatinib, por su parte, presenta un perfil más diverso con términos de unión a cadherinas, factores de transcripción dependientes de ADN, actina y actividades de modificación de histonas, además de procesos reguladores de GTPasas (Figura 14B).

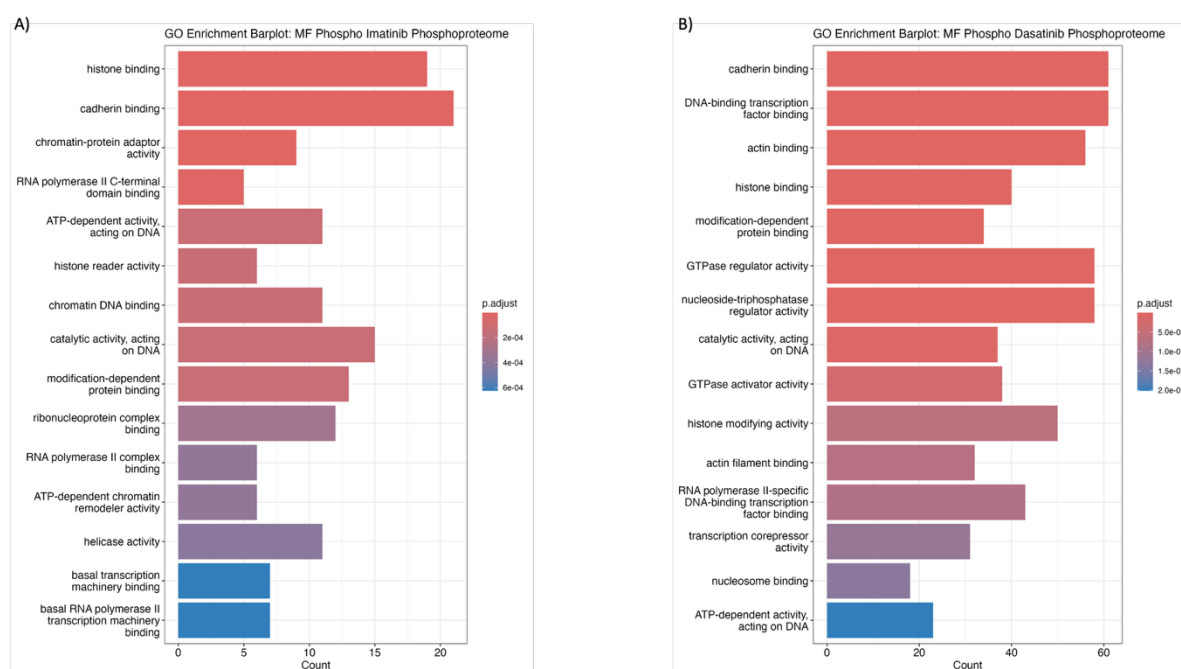


Figura 14. Gráficos de barras del análisis de enriquecimiento en funciones moleculares (GO-MF) del fosfoproteoma tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x muestra el recuento de proteínas, y los colores corresponden a los valores de *p.adjust*. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

A nivel de componentes celulares, imatinib se asoció principalmente a estructuras nucleares como sacos nucleares, matriz nuclear, pericromatina y complejo de empalme, además de sitios de daño en el ADN (Figura 15A). Dasatinib también destacó en sacos nucleares y regiones cromosómicas, pero amplió el espectro hacia uniones célula-sustrato, adhesiones focales y estructuras relacionadas con el citoesqueleto (Figura 15B).

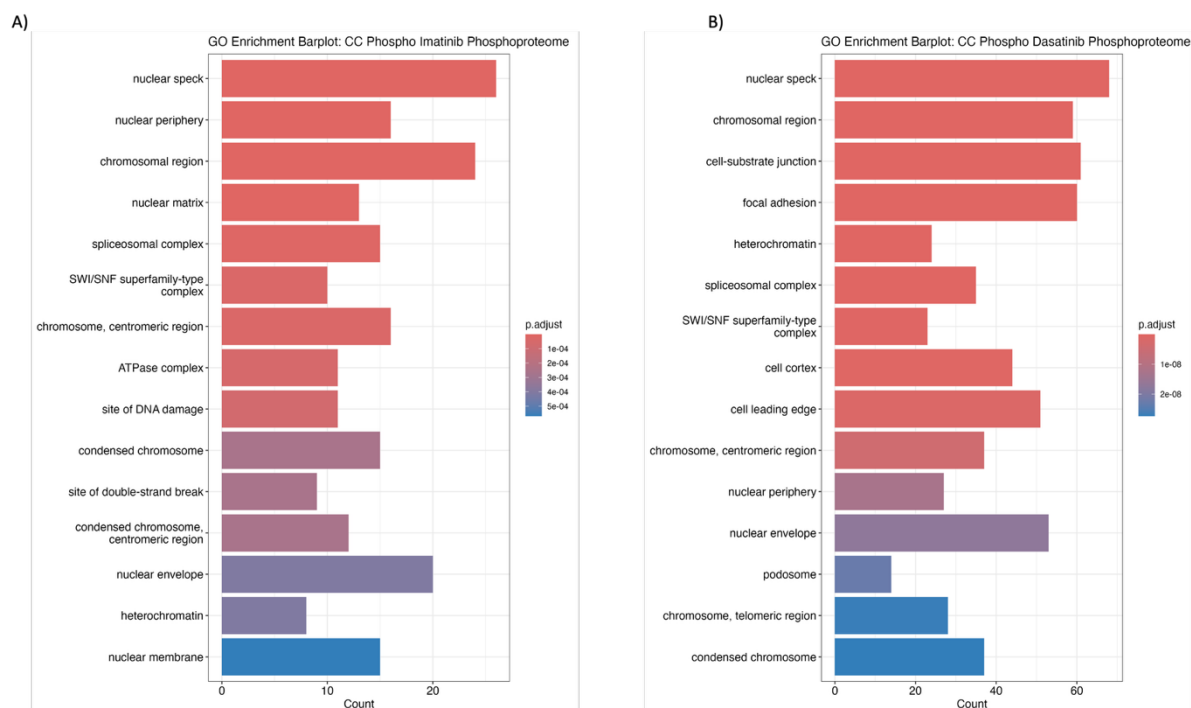


Figura 15. Gráficos de barras del análisis de enriquecimiento en componentes celulares (GO-CC) del fosfoproteoma tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x representa el número de proteínas asociadas, mientras que la escala de color refleja los valores de p.adjust. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

En el análisis de vías KEGG, imatinib mostró un número reducido de rutas enriquecidas, principalmente vinculadas a infecciones virales (virus del Herpes simple-1, ciclo del VIH-1) y al espliceosoma (Figura 16A). Dasatinib, en cambio, presentó un repertorio más variado que incluye rutas de cáncer (leucemias, cáncer de páncreas, pulmón, carcinogénesis viral), señalización celular (ErbB, FcγR, quimiocinas) y procesos de remodelación cromatínica (Figura 16B).

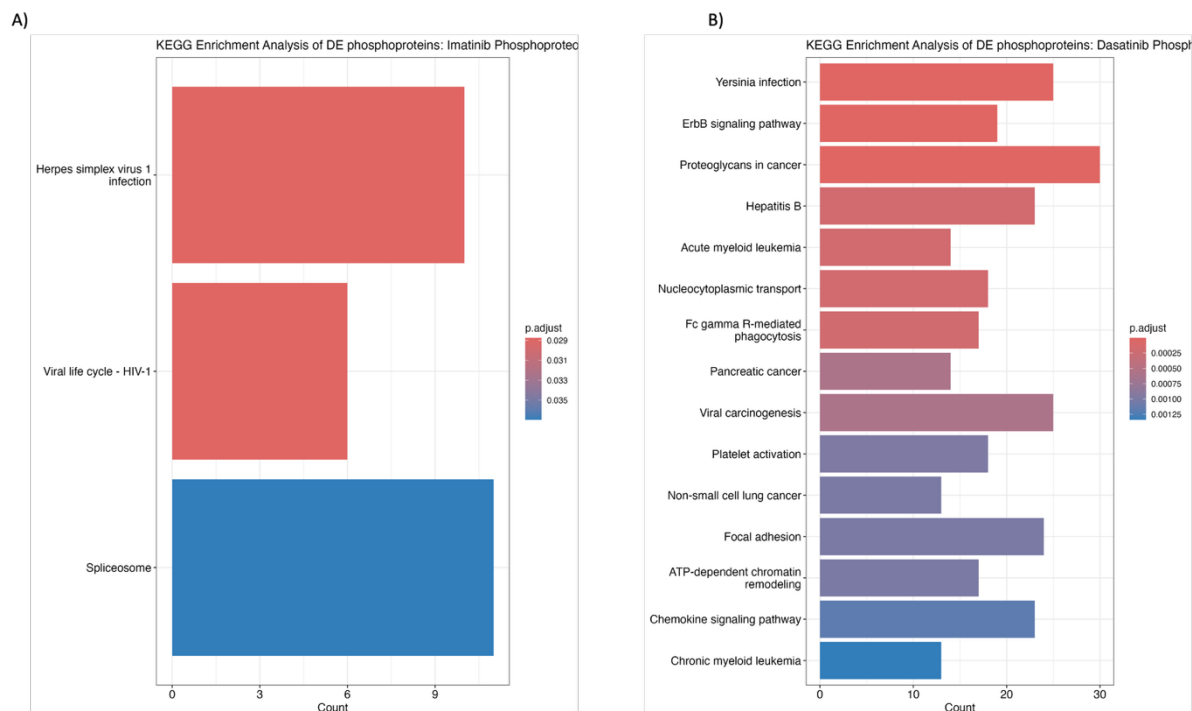


Figura 16. Gráficos de barras del análisis de enriquecimiento en rutas KEGG a partir de proteínas diferencialmente fosforiladas tras tratamiento con imatinib (izquierda-A) y dasatinib (derecha-B). El eje x indica el recuento de proteínas implicadas en cada ruta, y el color de las barras corresponde a los valores de p.adjust. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control (A) y dasatinib vs. control (B).

5.2.4. Análisis de interacciones fosfoproteína-fosfoproteína.

El diagrama de Venn del fosfoproteoma muestra que dasatinib desreguló la fosforilación de un número mucho mayor de proteínas que no fueron modificadas por imatinib (70,6%, 647), en comparación con las proteínas cuya fosforilación sólo fue alterada por imatinib (7,52%, 69) (Figura 17). Ambas condiciones compartieron un 21,9% (201) de proteínas cuya fosforilación era diferente al control.

Diagrama de Venn Fosfoproteoma

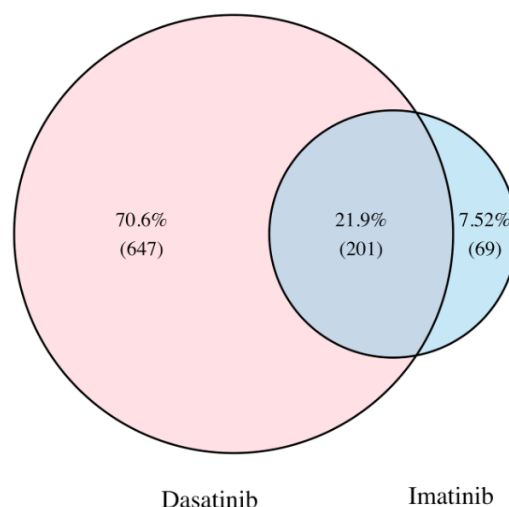


Figura 17. Diagrama de Venn que representa la distribución de fosfoproteínas diferencialmente reguladas tras tratamiento con imatinib y dasatinib. Los números y porcentajes indican las proteínas exclusivas de cada inhibidor y las compartidas. Se comparan los datos relativos a imatinib vs. control y dasatinib vs. control.

El análisis PPI mostró diferencias claras en la conectividad y organización de las redes fosfoproteicas entre los tratamientos. La red asociada a imatinib presentó un número moderado de interacciones, con un clúster central de proteínas asociadas a remodelación de cromatina, factores de transcripción y regulación de ARN y nodos periféricos menos conectados, indicativos de un efecto más focalizado (Figura 18A). En cambio, la red de proteínas fosforiladas desreguladas por dasatinib, es más extensa y densamente interconectada, con múltiples módulos funcionales relacionados con procesos nucleares, regulación transcripcional y vías de señalización, sugiriendo un impacto más amplio en la dinámica fosfoproteica (Figura 18B). Las proteínas fosforiladas desreguladas por ambos tratamientos forman una red central densa con nodos clave relacionados con procesamiento de ARN y organización nuclear (Figura 18C).

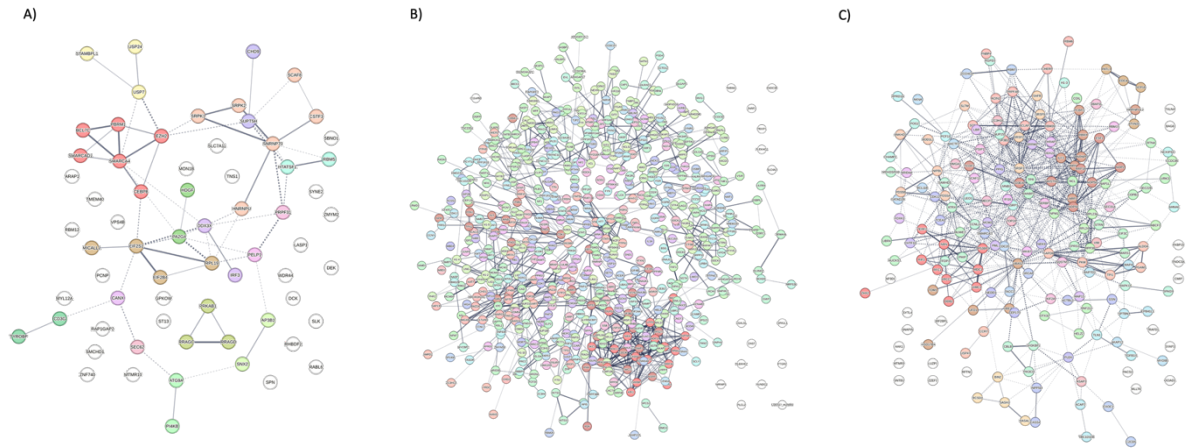


Figura 18. Redes de interacciones proteína-proteína (PPI) obtenidas mediante STRING a partir de las fosfoproteínas diferencialmente reguladas tras tratamiento con (A) imatinib, (B) dasatinib y (C) proteínas comunes a ambos inhibidores. Los nodos representan fosfoproteínas y las aristas corresponden a interacciones funcionales conocidas o predichas. Gráfica con imágenes separadas, con mejor enfoque y resolución en Anexos.

6. Discusión

En este estudio, el análisis integrado de proteómica y fosfoproteómica de PBMCs tratadas con los ITK imatinib y dasatinib reveló que estos fármacos alteran procesos celulares similares, aunque con distinta intensidad y amplitud de la modulación de las redes celulares que desregulan, relacionadas principalmente con el ciclo de replicación y procesos postranscripcionales del VIH-1.

El análisis de componentes principales (PCA) mostró una clara separación entre las tres condiciones experimentales (control, imatinib y dasatinib), confirmando la consistencia de las réplicas biológicas y evidenciando la existencia de firmas moleculares diferenciadas para cada tratamiento. Este patrón es coherente con la distinta selectividad de ambos inhibidores: imatinib actúa sobre un conjunto limitado de quinasas, mientras que dasatinib presenta un espectro más amplio, característica que le confiere una acción multiquinasa. Resultados similares se han descrito en estudios proteómicos de individuos con VIH en supresión viral, donde el PCA permite distinguir los perfiles moleculares incluso bajo tratamiento antiretroviral (Vadaq et al., 2023). Los volcano plots revelaron que dasatinib desreguló significativamente un mayor número de fosfoproteínas que imatinib, en concordancia con un estudio previo en cáncer de pulmón (Li et al., 2010). Otro estudio mostró su amplio espectro en comparación con imatinib y nilotinib (Rix et al., 2007). En el contexto del VIH-1, esa mayor amplitud de acción es relevante porque el virus utiliza múltiples factores fosforilados del hospedador en su ciclo, desde la entrada hasta la integración (Rodríguez-Mora et al., 2024). En los heatmaps, los perfiles proteómicos y fosfoproteómicos mostraron que muchas proteínas eran desreguladas de manera similar por ambos inhibidores, aunque con mayor intensidad en el caso de dasatinib. Estas proteínas compartidas participan en procesos celulares esenciales, como el splicing y la biogénesis ribosomal, que resultan críticos tanto para la célula como para el ciclo de replicación del VIH-1. Además, se observaron subconjuntos de proteínas desreguladas de forma exclusiva por cada fármaco: imatinib afecta rutas más restringidas, mientras que dasatinib amplía su acción hacia procesos como la adhesión, el citoesqueleto y la remodelación de cromatina. Este patrón concuerda con estudios recientes que muestran cómo el VIH-1 aprovecha componentes nucleares como CPSF6 y los speckles de splicing nucleares para facilitar la entrada al núcleo y la integración del ADN viral (Jang et al., 2024).

El análisis de enriquecimiento funcional GO-BP mostró que ambos fármacos afectan procesos nucleares relacionados con el splicing de ARN y biogénesis ribosomal, mientras que dasatinib ejerce efectos adicionales sobre el transporte nuclear y la organización de la cromatina. Esto se relaciona con el ciclo del VIH-1, ya que el virus depende de un procesamiento complejo de su ARN mediante splicing y del transporte nuclear eficiente de sus transcritos (J. Wu et al., 2024). En este contexto, imatinib promovió principalmente funciones de unión a ADN/ARN y actividades dependientes de ATP, mientras que dasatinib amplió el espectro hacia reguladores de GTPasas y remodeladores de cromatina. Estos efectos en cascada podrían reflejar tanto la inhibición directa de quinasas diana como la activación indirecta de rutas compensatorias, un fenómeno bien descrito en inhibidores multiquinasa.. En el contexto del VIH-1, estos cambios resultan particularmente relevantes ya que el virus utiliza CPSF6 y señales de localización nuclear para dirigir el complejo preintegrado hacia regiones de cromatina accesible, de modo que alterar remodeladores de cromatina podría modificar la eficiencia de la integración (Rohlfes et al., 2025). Aunque imatinib también afecta la fosforilación de proteínas relevantes para el VIH-1, su espectro de acción más limitado podría no ser suficiente para bloquear de forma robusta los mecanismos nucleares que el virus emplea para la infección (Bozzi et al., 2024). Además, imatinib influye sobre estructuras nucleares como speckles de splicing y matriz nuclear, mientras que dasatinib afecta, además, a adhesiones focales y citoesqueleto. Estudios previos han demostrado que dasatinib modula la adhesión y migración mediante la inhibición de moléculas de adhesión focal, además de alterar la reorganización del citoesqueleto e inhibir el agrupamiento de linfocitos T alrededor de monocitos (Chang & Wang, 2013; Dasgupta et al., 2017; Schade et al., 2008). Por otro lado, el VIH-1 utiliza los speckles de splicing para la integración y transcripción, por lo que las alteraciones observadas podrían modificar la eficiencia del ciclo viral (Francis et al., 2020; Jang et al., 2024).

El análisis KEGG mostró que imatinib se enfoca en el espliceosoma y vías de reparación de ADN, mientras que dasatinib desregula, además, rutas adicionales de adhesión, señalización de quimiocinas y activación plaquetaria. Estas rutas son relevantes para VIH-1, ya que la señalización de quimiocinas como CXCR4/CXCL12 regula la entrada viral y la remodelación cromatínica condiciona el establecimiento de la infección (Majsterek et al., 2006; McCaig et al., 2012; Peng et al., 2016).

Los resultados también muestran un predominio de proteínas desreguladas de forma exclusiva por dasatinib, frente a un número mucho menor en el caso de imatinib. Estos resultados reflejan la diferencia en el espectro de acción de ambos inhibidores, posiblemente relacionado con los mayores efectos off-target del dasatinib. En el contexto del VIH-1, muchas de las proteínas exclusivas de dasatinib podrían no ser esenciales para el ciclo viral, pero la alteración del conjunto compartido, en el que se incluyen procesos de splicing de ARN y biogénesis ribosomal, y el espliceosoma en la regulación del ARN, sí podría impactar directamente en etapas críticas de la transcripción y el procesamiento del ARN viral (Jang et al., 2024; J. Wu et al., 2024).

Por último, el análisis de redes de interacciones proteína-proteína (PPI) mostró que imatinib tiende a generar redes más compactas, centradas en procesos nucleares relacionados con el splicing y la organización de la cromatina. En contraste, dasatinib construye redes más extensas y diversificadas, donde además de nodos nucleares aparecen módulos adicionales asociados a la adhesión celular, tráfico intracelular y señalización. Este patrón de expansión ha sido descrito en perfiles fosfoproteómicos obtenidos con inhibidores de amplio espectro (Pan et al., 2009). En el contexto del VIH-1, los nodos comunes identificados en ambas condiciones corresponden a proteínas esenciales del splicing, necesarias para producir los distintos tipos de ARN viral, mientras que los nodos adicionales observados con dasatinib representan procesos celulares secundarios como adhesión, tráfico o señalización que, aunque no son imprescindibles para el virus, su alteración podría influir en su capacidad de replicarse o mantenerse en el hospedador (Dasgupta et al., 2017; Klammer et al., 2012).

7. Conclusiones

El análisis comparativo del proteoma y fosfoproteoma de PBMCs tratadas con inhibidores de tirosina quinasas (imatinib y dasatinib) revela que ambos fármacos inducen modificaciones diferenciadas en los perfiles proteómicos. Estas diferencias reflejan mecanismos inmunomoduladores distintos, con dasatinib mostrando un efecto más amplio y multifuncional, y imatinib actuando de forma más selectiva.

- El tratamiento con dasatinib mostró un impacto más amplio y heterogéneo sobre las proteínas y fosfoproteínas, afectando a una red más extensa de quinasas mientras que imatinib ejerció efecto sobre un conjunto más restringido, como inhibidor selectivo.
- Ambos inhibidores alteran procesos nucleares y ribosomales esenciales, pero con distinta magnitud. Dasatinib regula de forma más intensa rutas de biogénesis ribosomal, procesamiento y transporte de ARN, así como adhesión celular y remodelación de la cromatina. Imatinib, en cambio, se centra en funciones estructurales y de interacción proteína-ADN.
- A nivel fosfoproteómico, ambos tratamientos impactan de forma significativa en rutas de splicing de ARN, procesamiento postranscripcional y señalización nuclear. Sin embargo, dasatinib induce una reorganización más compleja del mapa de fosforilaciones, modulando de manera diferencial proteínas relacionadas con GTPasas, remodeladores de cromatina y adhesiones focales.

En conjunto, estos resultados muestran que dasatinib presenta un perfil inmunomodulador más amplio y complejo que imatinib, induciendo una reprogramación proteómica y fosfoproteómica más extensa, que abarca tanto vías de señalización intracelular como procesos nucleares y citoesqueléticos. Este mayor espectro de acción refuerza el potencial del dasatinib, no sólo como agente antineoplásico, sino también como modulador de la respuesta inmune y posible candidato en estrategias complementarias frente a la persistencia del VIH y otros procesos inflamatorios crónicos o de senescencia celular, donde la fosforilación de los componentes de las distintas rutas de activación desempeña un papel esencial.

Bibliografía

- Alcamí, J., & Coiras, M. (2011). Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(3), 216-226. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.01.006>
- Ambrosioni, J., Coiras, M., Alcamí, J., & Miró, J. M. (2017). Potential role of tyrosine kinase inhibitors during primary HIV-1 infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(5), 421-423. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1308823>
- Bantscheff, M., Eberhard, D., Abraham, Y., Bastuck, S., Boesche, M., Hobson, S., Mathieson, T., Perrin, J., Raida, M., Rau, C., Reader, V., Sweetman, G., Bauer, A., Bouwmeester, T., Hopf, C., Kruse, U., Neubauer, G., Ramsden, N., Rick, J., ... Drewes, G. (2007). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1035-1044. <https://doi.org/10.1038/nbt1328>
- Bermejo, M., Ambrosioni, J., Bautista, G., Climent, N., Mateos, E., Rovira, C., Rodríguez-Mora, S., López-Huertas, M. R., García-Gutiérrez, V., Steegmann, J. L., Duarte, R., Cervantes, F., Plana, M., Miró, J. M., Alcamí, J., & Coiras, M. (2018). Evaluation of resistance to HIV-1 infection ex vivo of PBMCs isolated from patients with chronic myeloid leukemia treated with different tyrosine kinase inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 156, 248-264. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.031>
- Bermejo, M., López-Huertas, M. R., García-Pérez, J., Climent, N., Descours, B., Ambrosioni, J., Mateos, E., Rodríguez-Mora, S., Rus-Bercial, L., Benkirane, M., Miró, J. M., Plana, M., Alcamí, J., & Coiras, M. (2016). Dasatinib inhibits HIV-1 replication through the

- interference of SAMHD1 phosphorylation in CD4+ T cells. *Biochemical Pharmacology*, 106, 30-45. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.02.002>
- Bermejo, M., López-Huertas, M. R., Hedgpeth, J., Mateos, E., Rodríguez-Mora, S., Maleno, M. J., Plana, M., Swindle, J., Alcamí, J., & Coiras, M. (2015). Analysis of protein kinase C theta inhibitors for the control of HIV-1 replication in human CD4+ T cells reveals an effect on retrotranscription in addition to viral transcription. *Biochemical Pharmacology*, 94(4), 241-256. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.02.009>
- Blake, S., Hughes, T. P., Mayrhofer, G., & Lyons, A. B. (2008). The Src/ABL kinase inhibitor dasatinib (BMS-354825) inhibits function of normal human T-lymphocytes in vitro. *Clinical Immunology*, 127(3), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.02.006>
- Bozzi, G., Centazzo, M., Scaglioni, S., Butta, G. M., Saltini, P., Liparoti, A., Trombetta, E., Prati, D., Gori, A., Bandera, A., & Manganaro, L. (2024). Primary HIV infection during chronic treatment with imatinib: Impact on infection dynamics. *AIDS*, 38(10), 1601-1604. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003942>
- Chang, A. Y., & Wang, M. (2013). Molecular mechanisms of action and potential biomarkers of growth inhibition of dasatinib (BMS-354825) on hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer*, 13(1), 267. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-267>
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Hill, B. J., Douek, D. C., Routy, J.-P., Haddad, E. K., & Sékaly, R.-P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature*

Medicine, 15(8), 893-900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972>

Coiras, M., Ambrosioni, J., Cervantes, F., Miró, J. M., & Alcamí, J. (2017). Tyrosine kinase inhibitors: Potential use and safety considerations in HIV-1 infection. *Expert Opinion on Drug Safety*, 16(5), 547-559. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1313224>

Coiras, M., Bermejo, M., Descours, B., Mateos, E., García-Pérez, J., López-Huertas, M.-R., Lederman, M. M., Benkirane, M., & Alcamí, J. (2016). IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle. *Cell Reports*, 14(9), 2100-2107. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.022>

Cortes, J. E., Jiang, Q., Wang, J., Weng, J., Zhu, H., Liu, X., Hochhaus, A., Kim, D.-W., Radich, J., Savona, M., Martin-Regueira, P., Sy, O., & Saglio, G. (2024). Treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia in patients randomized to dasatinib or imatinib after suboptimal responses to 3 months of imatinib therapy: Final 5-year results from DASCERN. *Haematologica*, 109(10), 3251-3260. <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283428>

Cortes, J. E., Saglio, G., Kantarjian, H. M., Baccarani, M., Mayer, J., Boqué, C., Shah, N. P., Chuah, C., Casanova, L., Bradley-Garelik, B., Manos, G., & Hochhaus, A. (2016). Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 34(20), 2333-2340. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.8899>

Dasgupta, S. K., Le, A., Vijayan, K. V., & Thiagarajan, P. (2017). Dasatinib inhibits actin fiber reorganization and promotes endothelial cell permeability through RhoA- ROCK

pathway. *Cancer Medicine*, 6(4), 809-818. <https://doi.org/10.1002/cam4.1019>

Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., & Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+T-cells. *Retrovirology*, 9(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-87>

Ebrahimi, N., Fardi, E., Ghaderi, H., Palizdar, S., Khorram, R., Vafadar, R., Ghanaatian, M., Rezaei-Tazangi, F., Baziyar, P., Ahmadi, A., Hamblin, M. R., & Aref, A. R. (2023). Receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(4), 104. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04729-4>

Fauziya, Gupta, A., Nadaf, A., Ahmad, S., Hasan, N., Imran, M., Sahebkar, A., Jain, G. K., Kesharwani, P., & Ahmad, F. J. (2023). Dasatinib: A potential tyrosine kinase inhibitor to fight against multiple cancer malignancies. *Medical Oncology*, 40(6), 173. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02018-5>

Francis, A. C., Marin, M., Singh, P. K., Achuthan, V., Prellberg, M. J., Palermino-Rowland, K., Lan, S., Tedbury, P. R., Sarafianos, S. G., Engelman, A. N., & Melikyan, G. B. (2020). HIV-1 replication complexes accumulate in nuclear speckles and integrate into speckle-associated genomic domains. *Nature Communications*, 11(1), 3505. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17256-8>

Futosi, K., Németh, T., Pick, R., Vántus, T., Walzog, B., & Mócsai, A. (2012). Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood*, 119(21), 4981-4991. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-369041>

- Giansanti, P., Preisinger, C., Huber, K. V. M., Gridling, M., Superti-Furga, G., Bennett, K. L., & Heck, A. J. R. (2014). Evaluating the Promiscuous Nature of Tyrosine Kinase Inhibitors Assessed in A431 Epidermoid Carcinoma Cells by Both Chemical- and Phosphoproteomics. *ACS Chemical Biology*, 9(7), 1490-1498. <https://doi.org/10.1021/cb500116c>
- Goss, V. L., Lee, K. A., Moritz, A., Nardone, J., Spek, E. J., MacNeill, J., Rush, J., Comb, M. J., & Polakiewicz, R. D. (2006). A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. *Blood*, 107(12), 4888-4897. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3399>
- Harmon, B., Campbell, N., & Ratner, L. (2010). Role of Abl Kinase and the Wave2 Signaling Complex in HIV-1 Entry at a Post-Hemifusion Step. *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000956. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000956>
- Hartmann, J., Haap, M., Kopp, H.-G., & Lipp, H.-P. (2009). Tyrosine Kinase Inhibitors – A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Current Drug Metabolism*, 10(5), 470-481. <https://doi.org/10.2174/138920009788897975>
- Irgit, A., Kamis, R., Sever, B., Tuyun, A. F., Otsuka, M., Fujita, M., Demirci, H., & Ciftci, H. (2025). Structure and Dynamics of the ABL1 Tyrosine Kinase and Its Important Role in Chronic Myeloid Leukemia. *Archiv Der Pharmazie*, 358(5), e70005. <https://doi.org/10.1002/ardp.70005>
- Jang, S., Bedwell, G. J., Singh, S. P., Yu, H. J., Arnarson, B., Singh, P. K., Radhakrishnan, R., Douglas, A. W., Ingram, Z. M., Freniere, C., Akkermans, O., Sarafianos, S. G., Ambrose, Z., Xiong, Y., Anekal, P. V., Montero Llopis, P., KewalRamani, V. N., Francis, A. C., &

- Engelman, A. N. (2024). HIV-1 usurps mixed-charge domain-dependent CPSF6 phase separation for higher-order capsid binding, nuclear entry and viral DNA integration. *Nucleic Acids Research*, 52(18), 11060-11082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae769>
- Klammer, M., Kaminski, M., Zedler, A., Oppermann, F., Blencke, S., Marx, S., Müller, S., Tebbe, A., Godl, K., & Schaab, C. (2012). Phosphosignature Predicts Dasatinib Response in Non-small Cell Lung Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(9), 651-668. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.016410>
- Kong, K.-F., Yokosuka, T., Canonigo-Balancio, A. J., Isakov, N., Saito, T., & Altman, A. (2011). A motif in the V3 domain of the kinase PKC- θ determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nature Immunology*, 12(11), 1105-1112. <https://doi.org/10.1038/ni.2120>
- Lee, H., Basso, I. N., & Kim, D. D. H. (2021). Target spectrum of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *International Journal of Hematology*, 113(5), 632-641. <https://doi.org/10.1007/s12185-021-03126-6>
- Li, J., Rix, U., Fang, B., Bai, Y., Edwards, A., Colinge, J., Bennett, K. L., Gao, J., Song, L., Eschrich, S., Superti-Furga, G., Koomen, J., & Haura, E. B. (2010). A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nature Chemical Biology*, 6(4), 291-299. <https://doi.org/10.1038/nchembio.332>
- Majsterek, I., Arabski, M., Czechowska, A., Pytel, D., Morawiec, Z., Morawiec-Bajda, A., & Blasiak, J. (2006). Imatinib (STI571) Inhibits DNA Repair in Human Leukemia Oncogenic Tyrosine Kinase-Expressing Cells. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(11-

12), 896-902. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-11-1219>

McCaig, A. M., Cosimo, E., Leach, M. T., & Michie, A. M. (2012). Dasatinib Inhibits CXCR4 Signaling in Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells and Impairs Migration Towards CXCL12. *PLoS ONE*, 7(11), e48929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048929>

Mustjoki, S., Ekblom, M., Arstila, T. P., Dybedal, I., Epling-Burnette, P. K., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Höglund, M., Kovanen, P., Laurinolli, T., Liesveld, J., Paquette, R., Pinilla-Ibarz, J., Rauhala, A., Shah, N., Simonsson, B., Sinisalo, M., Steegmann, J. L., Stenke, L., & Porkka, K. (2009). Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*, 23(8), 1398-1405. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.46>

Norman, R. A., Toader, D., & Ferguson, A. D. (2012). Structural approaches to obtain kinase selectivity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(5), 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.005>

Palacios, E. H., & Weiss, A. (2004). Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, 23(48), 7990-8000. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208074>

Pan, C., Olsen, J. V., Daub, H., & Mann, M. (2009). Global Effects of Kinase Inhibitors on Signaling Networks Revealed by Quantitative Phosphoproteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(12), 2796-2808. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900285-MCP200>

Paul, M. K., & Mukhopadhyay, A. K. (2004). Tyrosine kinase—Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 1(2), 101-115.

<https://doi.org/10.7150/ijms.1.101>

- Peng, S., Sen, B., Mazumdar, T., Byers, L. A., Diao, L., Wang, J., Tong, P., Giri, U., Heymach, J. V., Kadara, H. N., & Johnson, F. M. (2016). Dasatinib induces DNA damage and activates DNA repair pathways leading to senescence in non-small cell lung cancer cell lines with kinase-inactivating BRAF mutations. *Oncotarget*, 7(1), 565-579. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6376>
- Preisinger, C., Schwarz, J. P., Bleijerveld, O. B., Corradini, E., Müller, P. J., Anderson, K. I., Kolch, W., Scholten, A., & Heck, A. J. R. (2013). Imatinib-dependent tyrosine phosphorylation profiling of Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 27(3), 743-746. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.243>
- Rivera-Torres, J., & San José, E. (2019). Src Tyrosine Kinase Inhibitors: New Perspectives on Their Immune, Antiviral, and Senotherapeutic Potential. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1011. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01011>
- Rix, U., Hantschel, O., Dürnberger, G., Rensing Rix, L. L., Planavsky, M., Fernbach, N. V., Kaupe, I., Bennett, K. L., Valent, P., Colinge, J., Köcher, T., & Superti-Furga, G. (2007). Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*, 110(12), 4055-4063. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-102061>
- Rodríguez-Agustín, A., Casanova, V., Grau-Expósito, J., Sánchez-Palomino, S., Alcamí, J., & Climent, N. (2023). Immunomodulatory Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Dasatinib to Elicit NK Cytotoxicity against Cancer, HIV Infection and Aging.

Pharmaceutics, 15(3), 917. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030917>

Rodríguez-Mora, S., Sánchez-Menéndez, C., Bautista-Carrascosa, G., Mateos, E., Moreno-Serna, L., Megías, D., Cantón, J., García-Gutiérrez, V., Murciano-Antón, M. A., Cervero, M., Spivak, A., Planelles, V., & Coiras, M. (2024). Dasatinib interferes with HIV-1 proviral integration and the inflammatory potential of monocyte-derived macrophages from people with HIV. *Biochemical Pharmacology*, 229, 116512. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116512>

Rodríguez-Mora, S., Spivak, A. M., Szaniawski, M. A., López-Huertas, M. R., Alcamí, J., Planelles, V., & Coiras, M. (2019). Tyrosine Kinase Inhibition: A New Perspective in the Fight against HIV. *Current HIV/AIDS Reports*, 16(5), 414-422. <https://doi.org/10.1007/s11904-019-00462-5>

Rohlfes, N., Radhakrishnan, R., Singh, P. K., Bedwell, G. J., Engelman, A. N., Dharan, A., & Campbell, E. M. (2025). The nuclear localization signal of CPSF6 governs post-nuclear import steps of HIV-1 infection. *PLOS Pathogens*, 21(1), e1012354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012354>

Schade, A. E., Schieven, G. L., Townsend, R., Jankowska, A. M., Susulic, V., Zhang, R., Szpurka, H., & Maciejewski, J. P. (2008). Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood*, 111(3), 1366-1377. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-084814>

Shammas, T., Peiris, M. N., Meyer, A. N., & Donoghue, D. J. (2025). BCR-ABL: The molecular mastermind behind chronic myeloid leukemia. *Cytokine & Growth Factor Reviews*,

83, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2025.05.001>

Thomson, R. J., Moshirfar, M., & Ronquillo, Y. (2025). Tyrosine Kinase Inhibitors. En StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563322/>

Tomuleasa, C., Tigu, A.-B., Munteanu, R., Moldovan, C.-S., Kegyes, D., Onaciu, A., Gulei, D., Ghiaur, G., Einsele, H., & Croce, C. M. (2024). Therapeutic advances of targeting receptor tyrosine kinases in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01899-w>

Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.-R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J.-P., Haddad, E. K., & Sekaly, R.-P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine*, 12(10), 1198-1202. <https://doi.org/10.1038/nm1482>

Vadaq, N., Zhang, Y., Vos, W. A., Groenendijk, A. L., Blaauw, M. J., van Eekeren, L. E., Jacobs-Cleophas, M., van de Wijer, L., Dos Santos, J. C., Gasem, M. H., Joosten, L. A., Netea, M. G., de Mast, Q., Fu, J., van der Ven, A. J., & Matzaraki, V. (2023). High-throughput proteomic analysis reveals systemic dysregulation in virally suppressed people living with HIV. *JCI Insight*, 8(11), e166166. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.166166>

Wintheiser, G. A., & Silberstein, P. (2025). Physiology, Tyrosine Kinase Receptors. En StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538532/>

Wu, J., Xiao, Y., Liu, Y., Wen, L., Jin, C., Liu, S., Paul, S., He, C., Regev, O., & Fei, J. (2024). Dynamics of RNA localization to nuclear speckles are connected to splicing efficiency.

Science Advances, 10(42), eadp7727. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adp7727>

Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. Trends in Pharmacological Sciences, 36(7), 422-439. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>

Anexo

Resolución positiva del Comité de Evaluación de Investigación

Este trabajo se ha realizado con muestras de personas sanas, donadas al Centro de Transfusión de Madrid. La solicitud se realizó el 03 de diciembre de 2022 y el Comité de Evaluación de Investigación del Centro de Transfusión aprobó dicha solicitud el 18 de enero de 2023, con código de centro 28510 y servicio 00009, en dicha petición.

Flujo de trabajo experimental

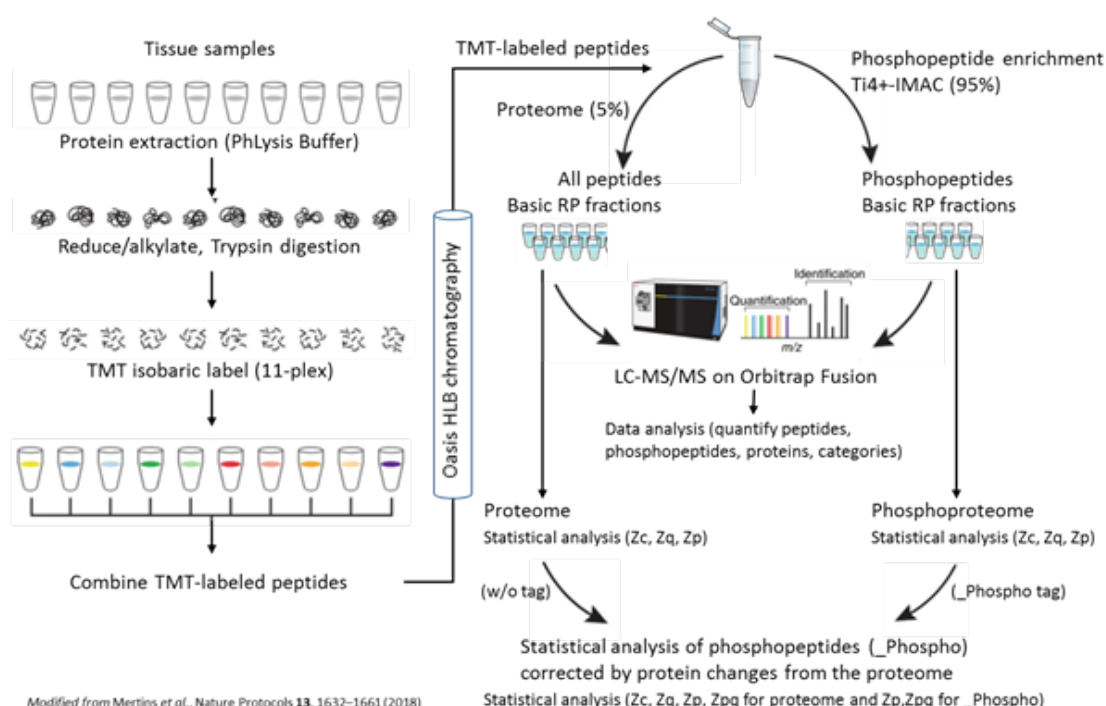


Figura suplementaria 1. Flujo de trabajo experimental para el procesamiento de las muestras y extracción de proteínas y fosfoproteínas. Extracción de sangre periférica y tratamiento de las células. Se obtuvieron muestras de sangre y se extrajeron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). La lisis celular se llevó a cabo empleando el tampón de extracción: Tris-HCl 50 mM pH 8,5 y SDS 2% (p/v). Se llevó a cabo la digestión con endopeptidasa LysC y posteriormente con tripsina en una proporción 1:100 (enzima:proteína en masa) a 37 °C durante 16 horas. Se marcaron las muestras de péptidos con reactivos TMT-10, permitiendo que las muestras marcadas se separasen mediante cromatografía líquida de fase reversa a pH alto y columnas con microesferas C18 de 15 cm (cromatografía líquida Easy Nano, Thermo Fisher Scientific). Tras la mezcla con TMT-10, se divide el pool de muestras en dos alícuotas: análisis global/proteómico y análisis de péptidos fosforilados. Para este último, se pasa el extracto de péptidos TMT-marcados por una columna/resina Ti4+ a la cual quedarán unidos los fosfopéptidos. Se usó fosfato de amonio ajustado a pH 7-8 como agente competitivo para liberar los fosfopéptidos de la resina. El análisis de los péptidos, tanto la fracción global como la enriquecida, se realizó en un sistema nano-LC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (LC-MS, Thermo Fisher Scientific, modelo Orbitrap Fusion Lumos). Por último, se analizó estadísticamente y se representaron los resultados.

Flujo de trabajo para el análisis bioinformático

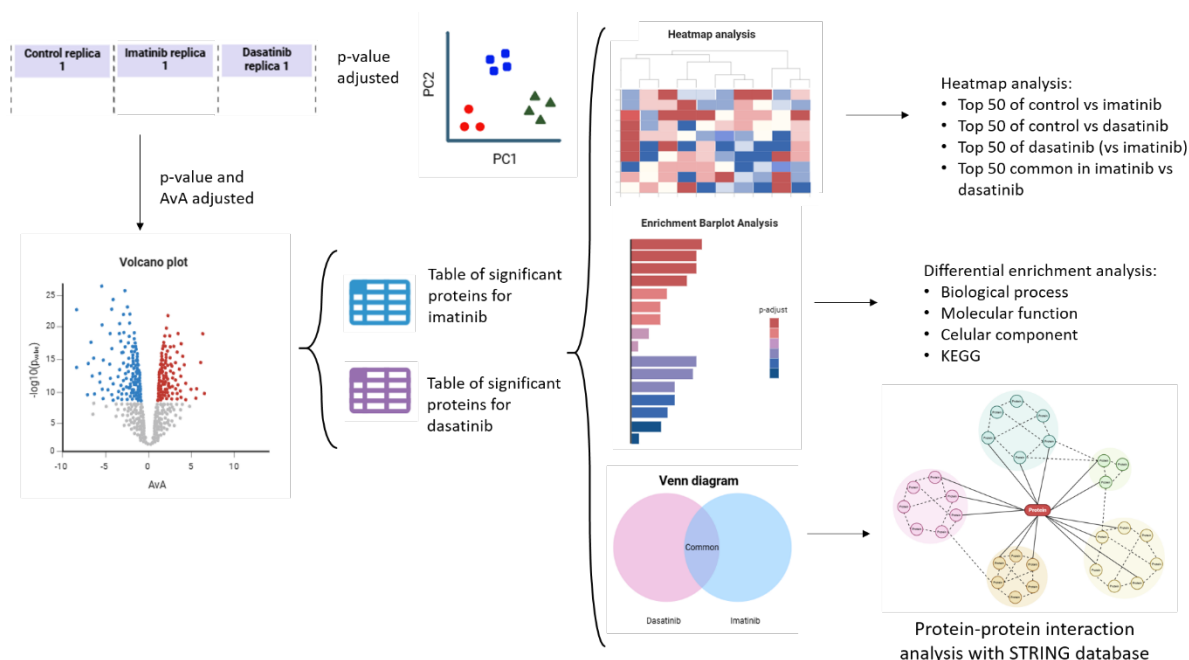


Figura suplementaria 2. Filtro por p -valor $< 0,05$ de los archivos Excel para la obtención de las proteínas y fosfoproteínas estadísticamente significativas. Generación de un PCA a partir de ese archivo filtrado por el p -valor, con las columnas correspondientes a cada réplica, de cada una de las condiciones. Por otro lado, se genera un volcano plot ajustando por p -valor y AvA, con las columnas correspondientes al valor AvA de los dos tratamientos, además de generar tablas con las proteínas más significativas de las condiciones imatinib y dasatinib. A partir de dichas tablas, se generan los diferentes heatmaps, análisis diferenciales (Gene Ontology: procesos biológicos, funciones moleculares, componentes celulares, y análisis KEGG), diagrama de Venn con que recoge las proteínas y fosfoproteínas afectadas únicamente por dasatinib, aquellas afectadas por imatinib, y las comunes. Además, se introducen las tablas en la base de datos STRING, para obtener las interacciones proteína-proteína y fosfoproteína-fosfoproteína.

Códigos empleados para el análisis con R

El código usado en el presente trabajo se encuentra disponible a través del siguiente enlace: https://github.com/Oliviadelacalle/TFM_Olivia_de_la_Calle

El repositorio consta de los siguientes archivos:

- Scripts: los scripts ejecutados para la generación de las gráficas utilizadas en el desarrollo del proyecto.
- Proteoma: archivos csv y tsv junto con las gráficas generadas que se muestran en el apartado de resultados.
- Fosfoproteoma: archivos csv y tsv junto con las gráficas generadas que se muestran en el apartado de resultados.

Figuras del análisis de proteoma

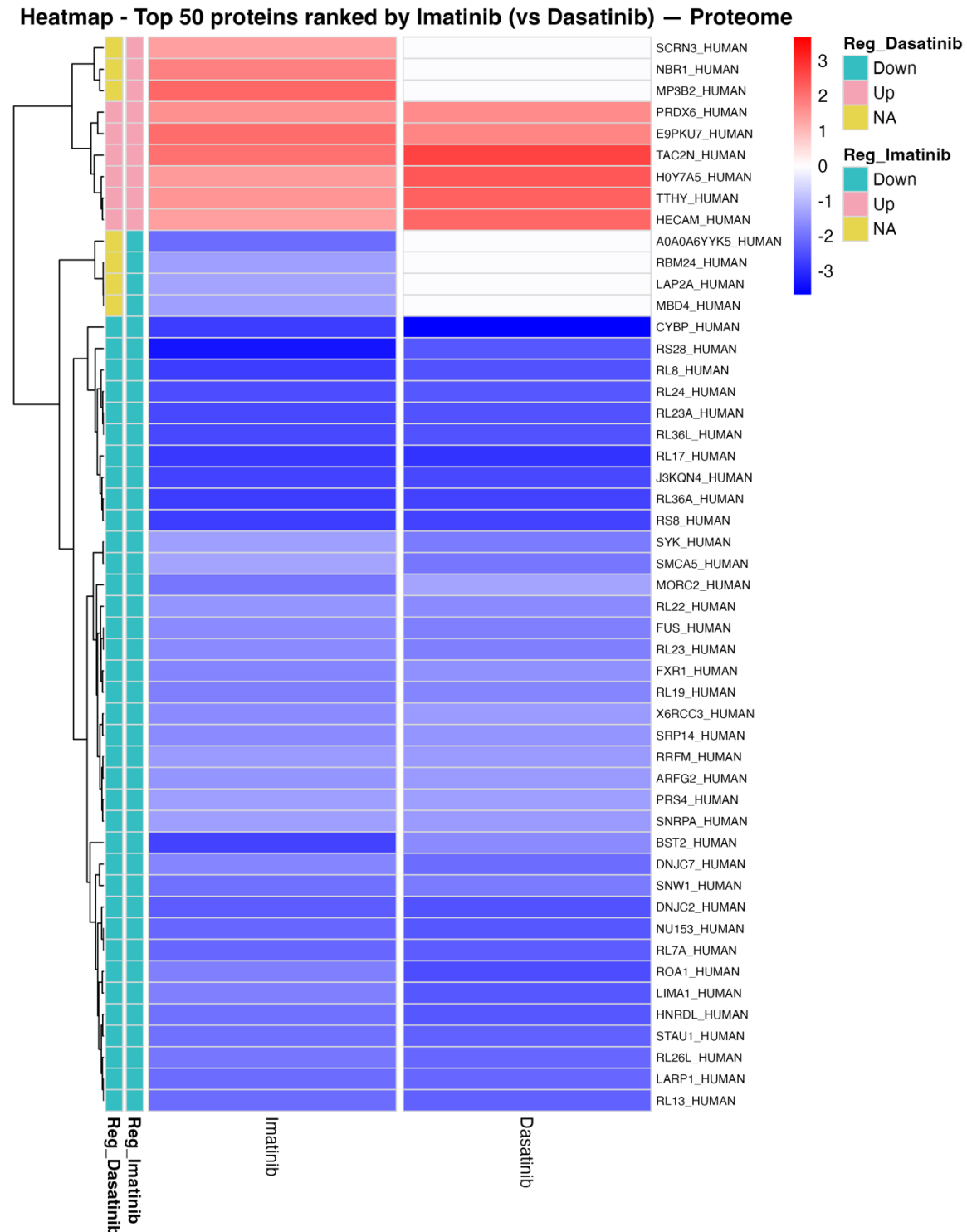


Figura suplementaria 3. Análisis de heatmap de las 50 proteínas más diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib frente a dasatinib. Se muestran las proteínas clasificadas por imatinib de manera independiente. Las intensidades de color reflejan los niveles relativos de abundancia proteica. Gráfica con imágenes separadas, con mejor enfoque y resolución en Anexos.

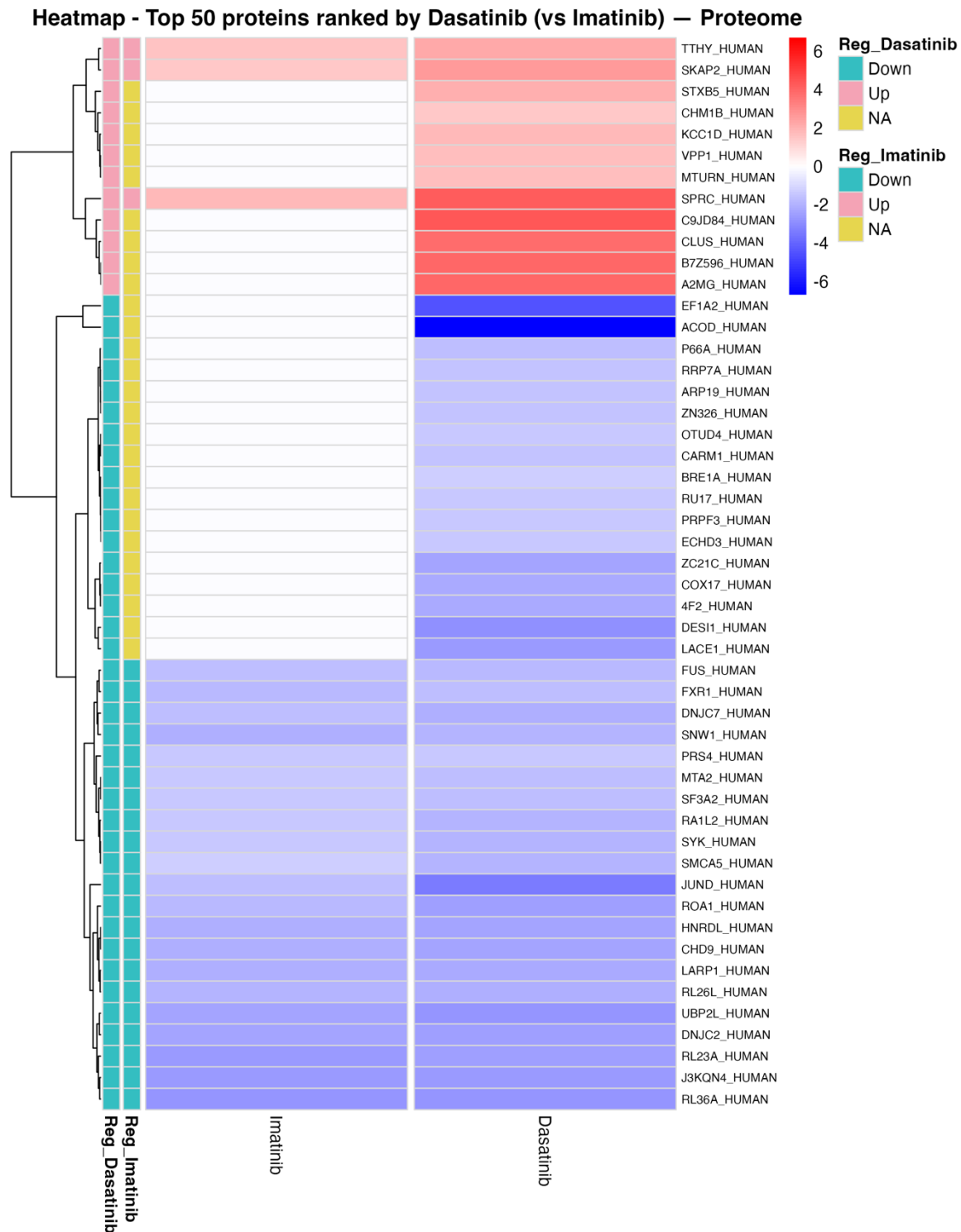


Figura suplementaria 4. Análisis de heatmap de las 50 proteínas más diferencialmente expresadas tras tratamiento con dasatinib frente a imatinib. Se muestran las proteínas clasificadas por dasatinib de manera independiente. Las intensidades de color reflejan los niveles relativos de abundancia proteica.

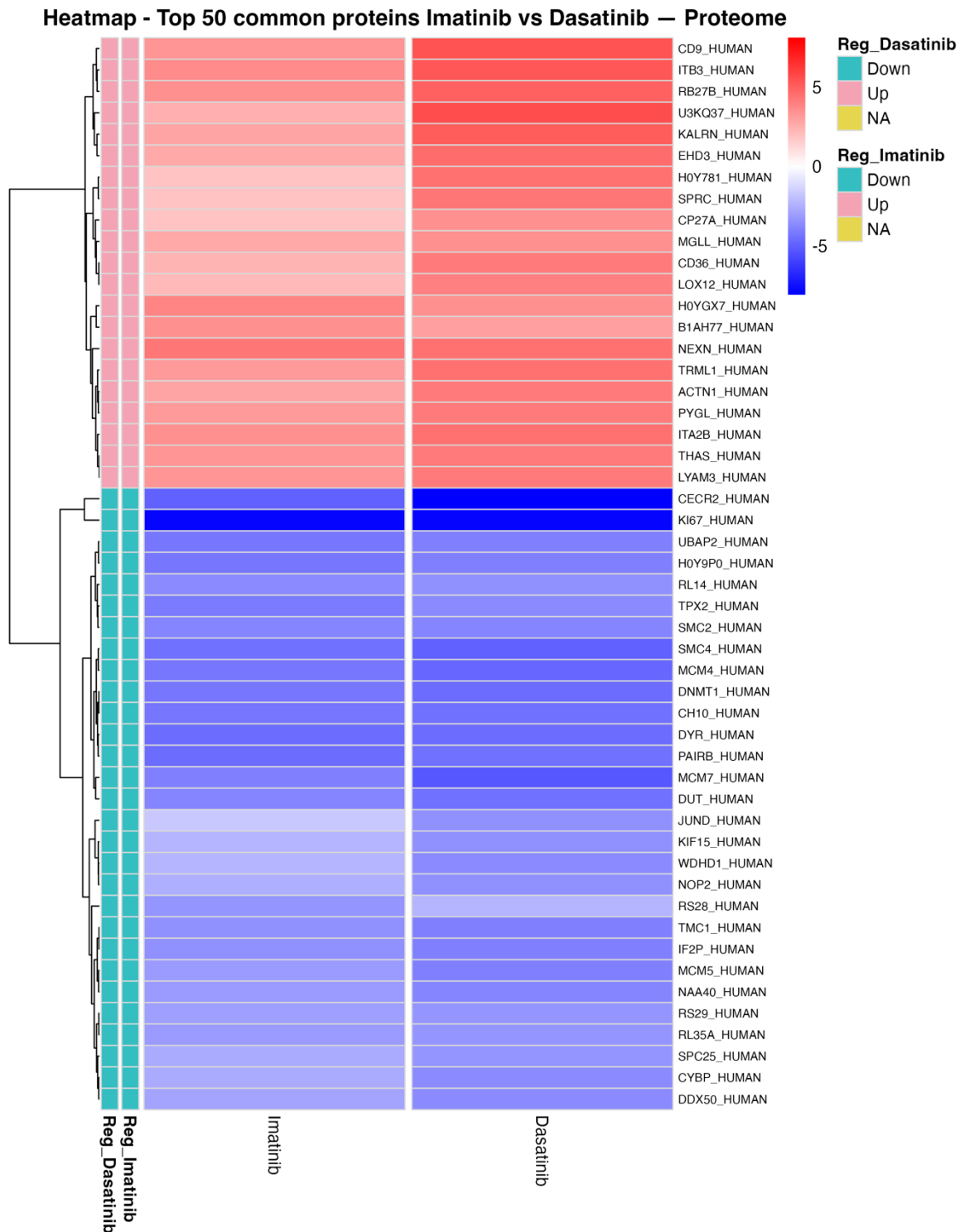
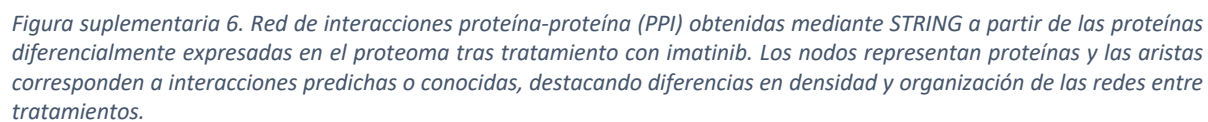


Figura suplementaria 5. Análisis de heatmap de las 50 proteínas más diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib y dasatinib. Se muestra el conjunto de proteínas comunes entre ambos. Las intensidades de color reflejan los niveles relativos de abundancia proteica.



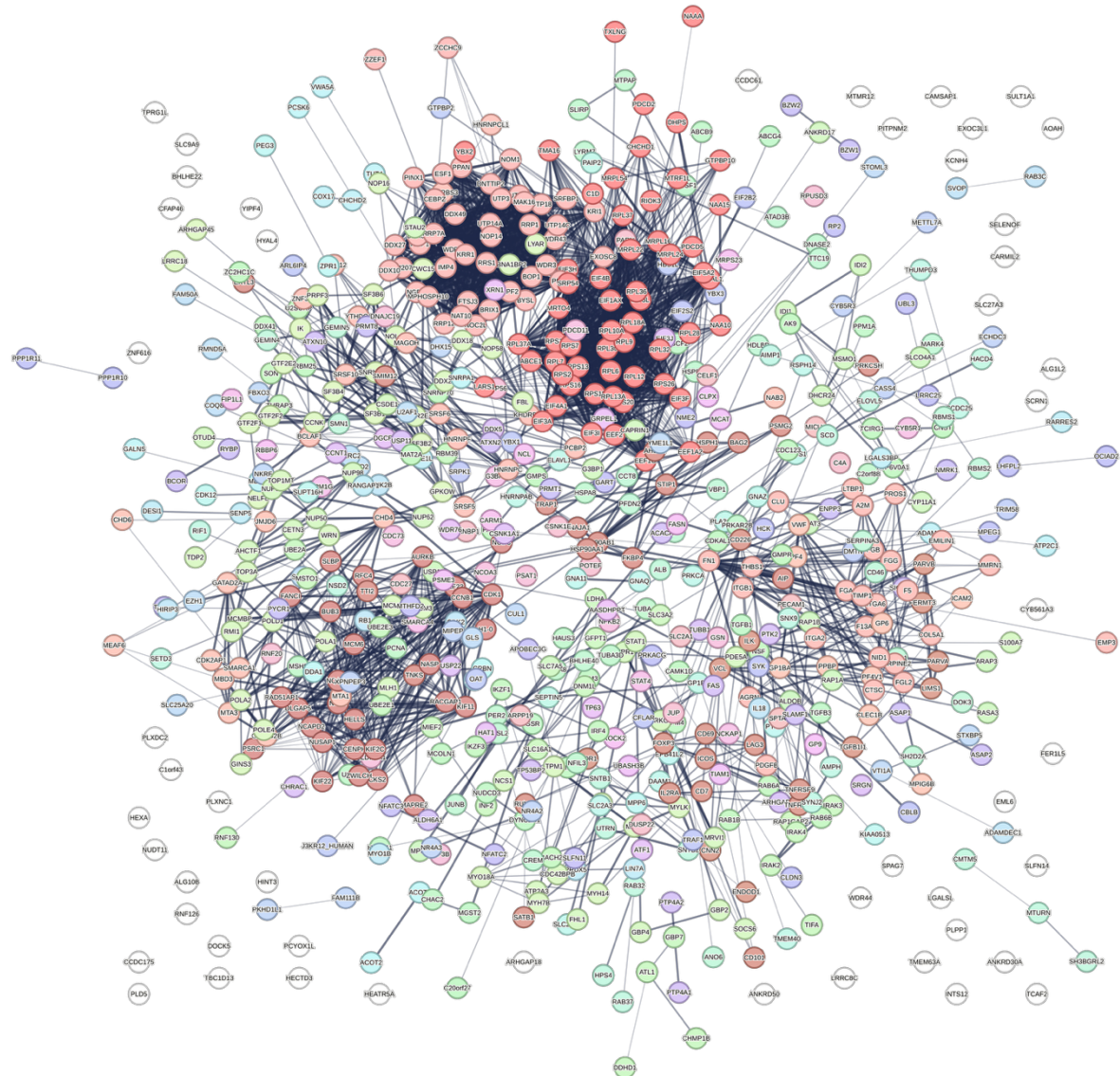


Figura suplementaria 7. Red de interacciones proteína-proteína (PPI) obtenidas mediante STRING a partir de las proteínas diferencialmente expresadas en el proteoma tras tratamiento con dasatinib. Los nodos representan proteínas y las aristas corresponden a interacciones predichas o conocidas, destacando diferencias en densidad y organización de las redes entre tratamientos.

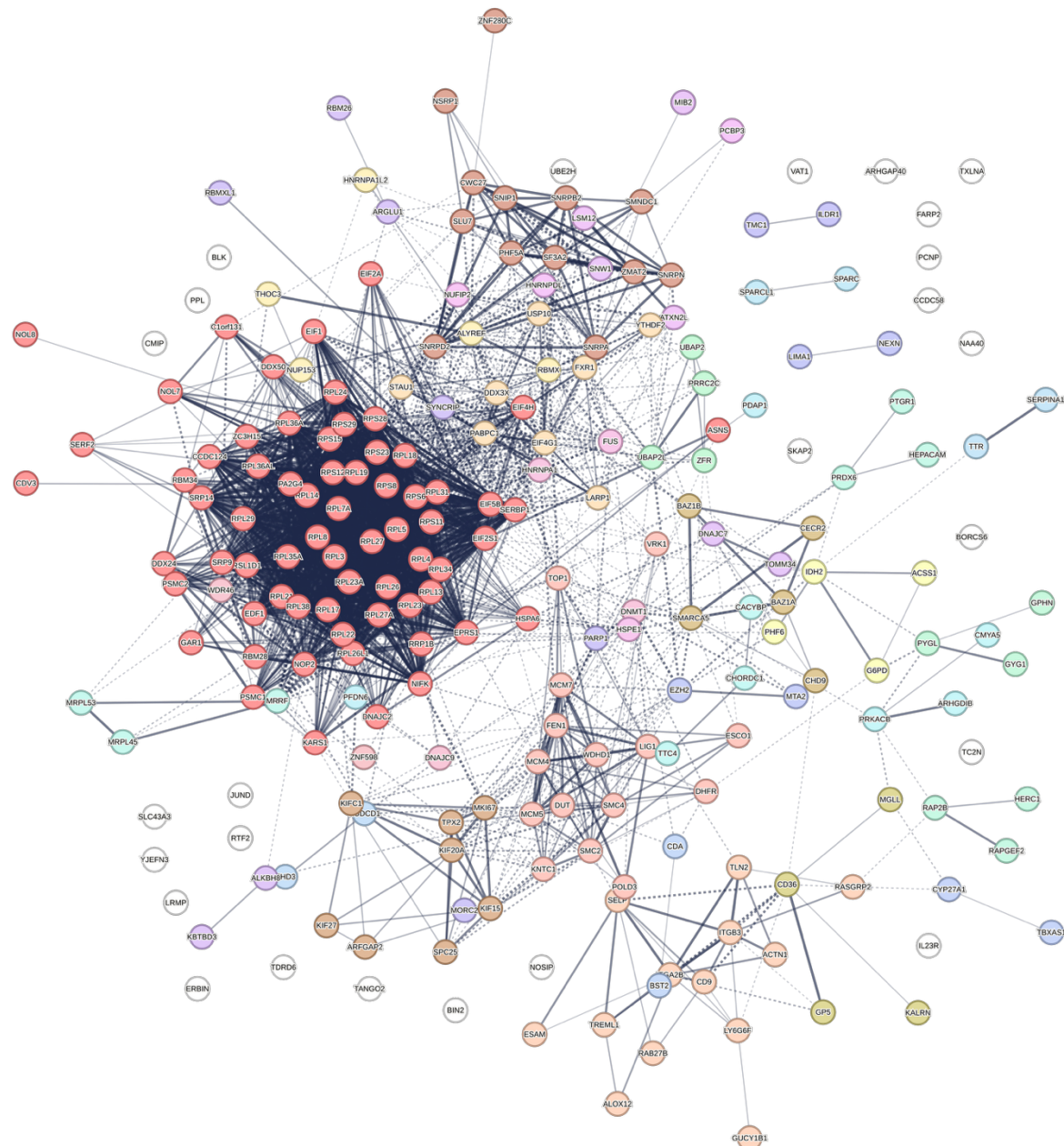


Figura suplementaria 8. Red de interacciones proteína-proteína (PPI) obtenidas mediante STRING a partir de las proteínas diferencialmente expresadas en el proteoma tras tratamiento con imatinib y dasatinib (comunes en ambas condiciones). Los nodos representan proteínas y las aristas corresponden a interacciones predichas o conocidas, destacando diferencias en densidad y organización de las redes entre tratamientos.

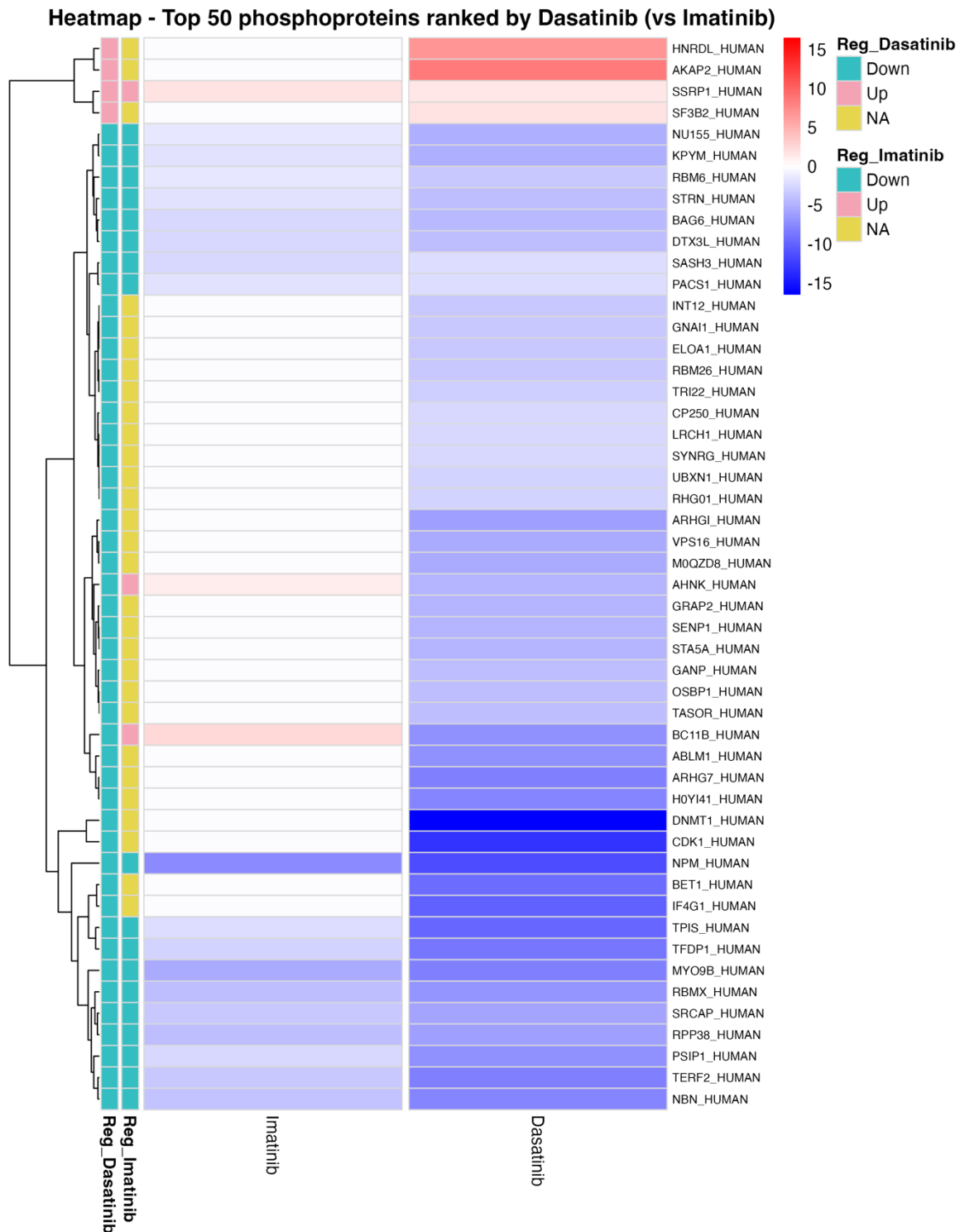


Figura suplementaria 10. Análisis de heatmap de las 50 fosfoproteínas más diferencialmente expresadas tras tratamiento con dasatinib frente a imatinib. Se muestran las fosfoproteínas clasificadas por dasatinib de manera independiente. La escala de color indica los niveles relativos de fosforilación.

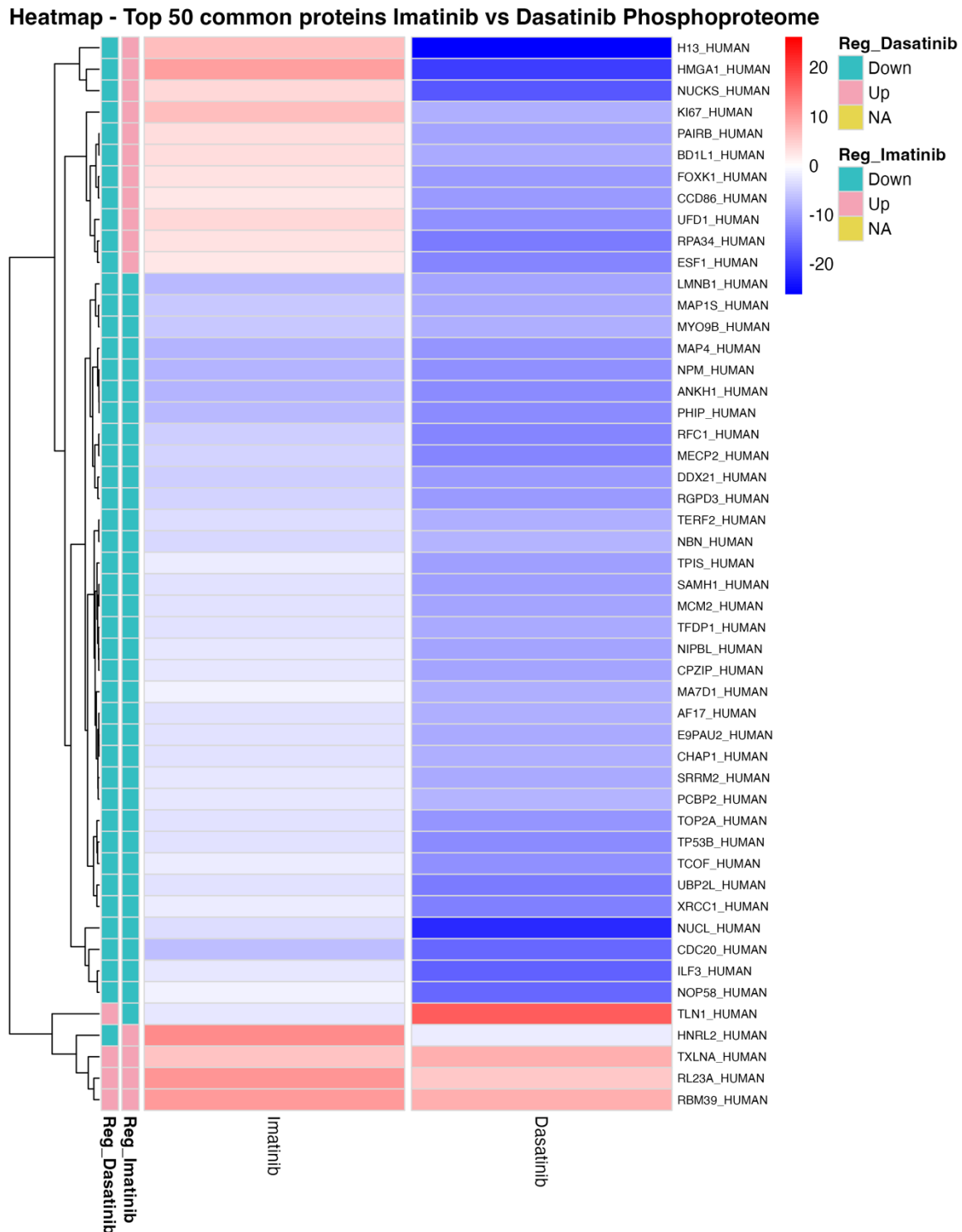


Figura suplementaria 11. Análisis de heatmap de las 50 fosfoproteínas más diferencialmente expresadas tras tratamiento con imatinib y dasatinib. Se muestra el conjunto de fosfoproteínas comunes entre ambos. La escala de color indica los niveles relativos de fosforilación.

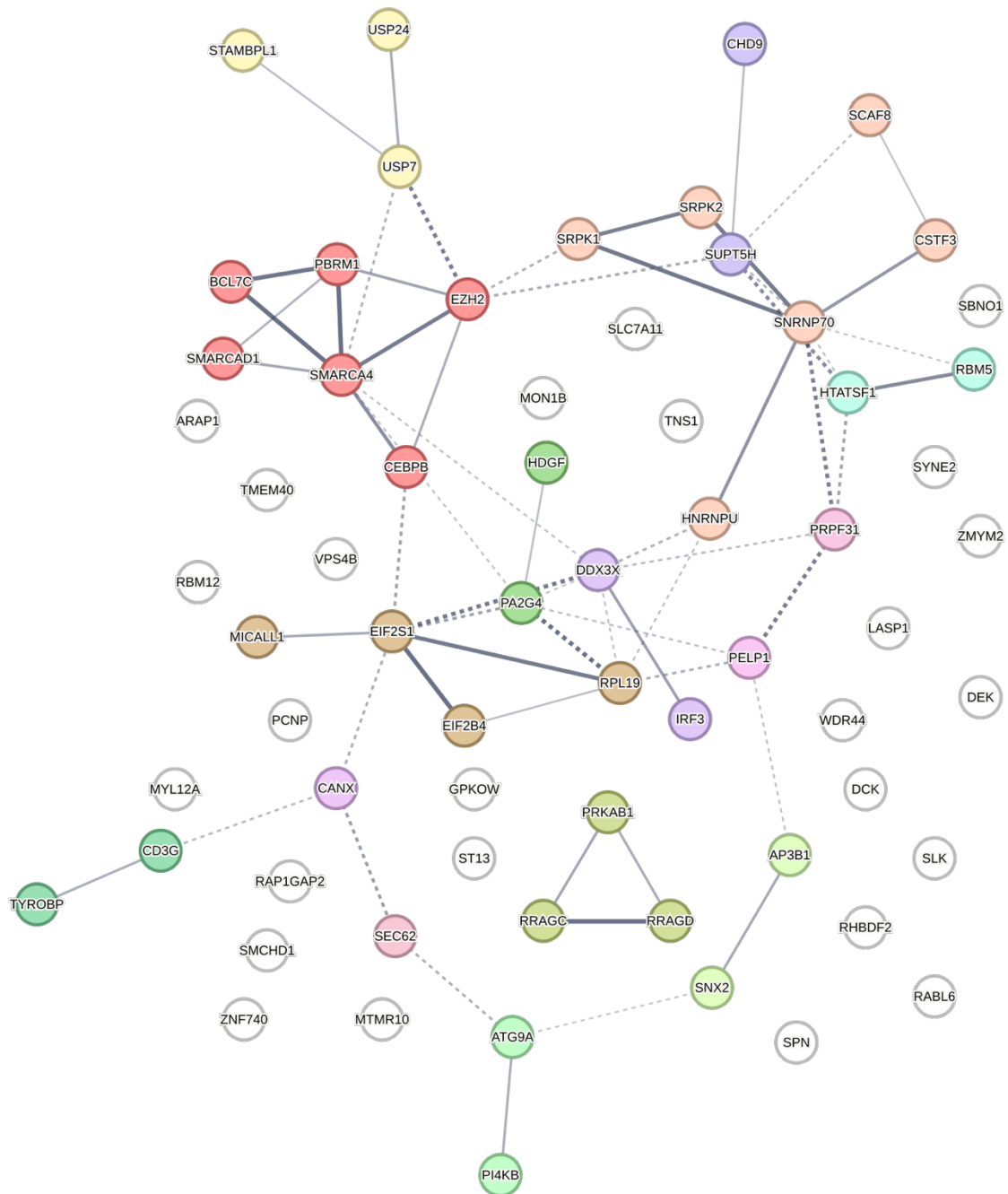


Figura suplementaria 12. Redes de interacciones proteína-proteína (PPI) obtenidas mediante STRING a partir de las fosfoproteínas diferencialmente reguladas tras tratamiento con imatinib. Los nodos representan fosfoproteínas y las aristas corresponden a interacciones funcionales conocidas o predichas.

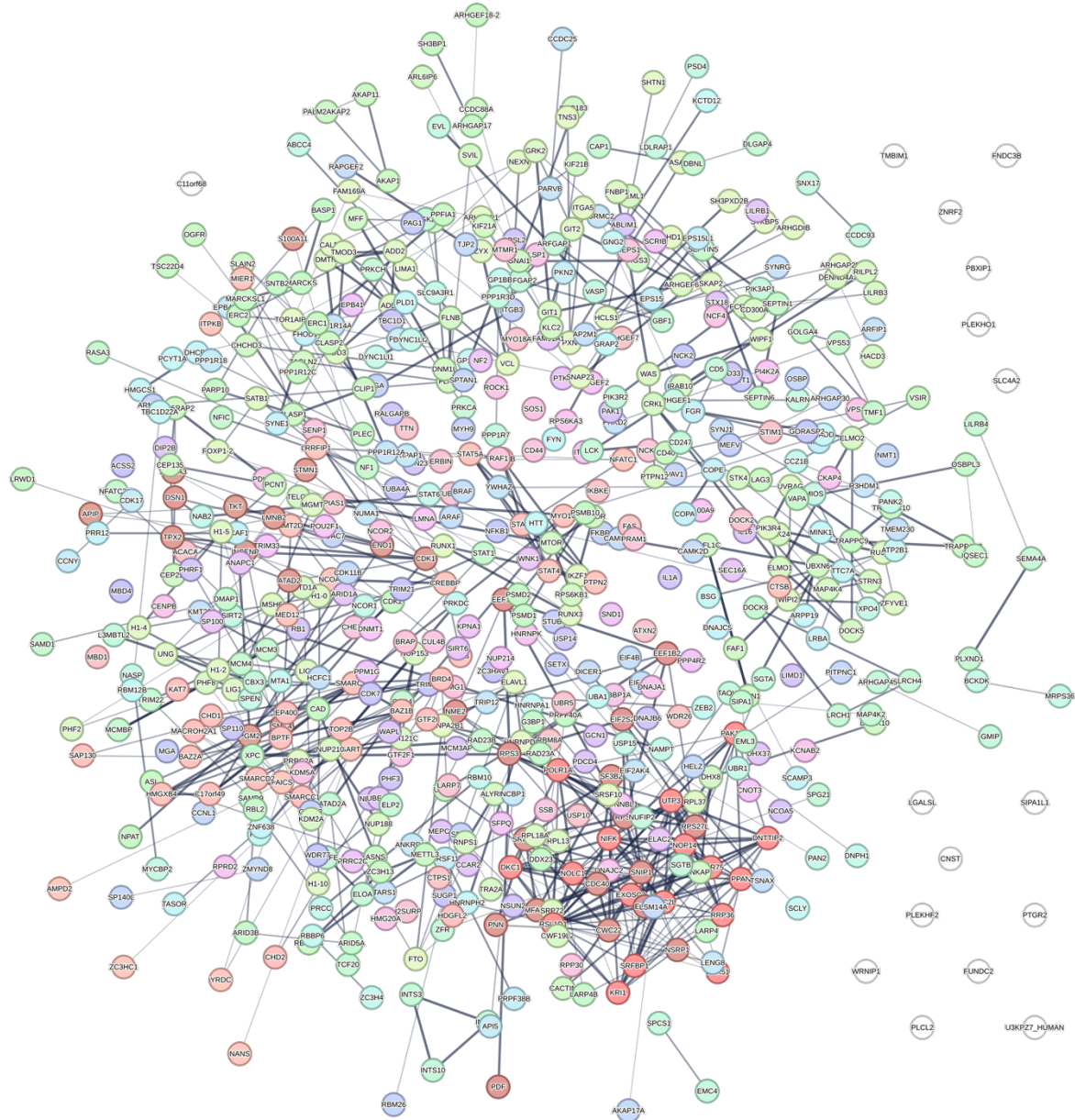


Figura suplementaria 12. Redes de interacciones proteína-proteína (PPI) obtenidas mediante STRING a partir de las fosfoproteínas diferencialmente reguladas tras tratamiento con dasatinib. Los nodos representan fosfoproteínas y las aristas corresponden a interacciones funcionales conocidas o predichas.

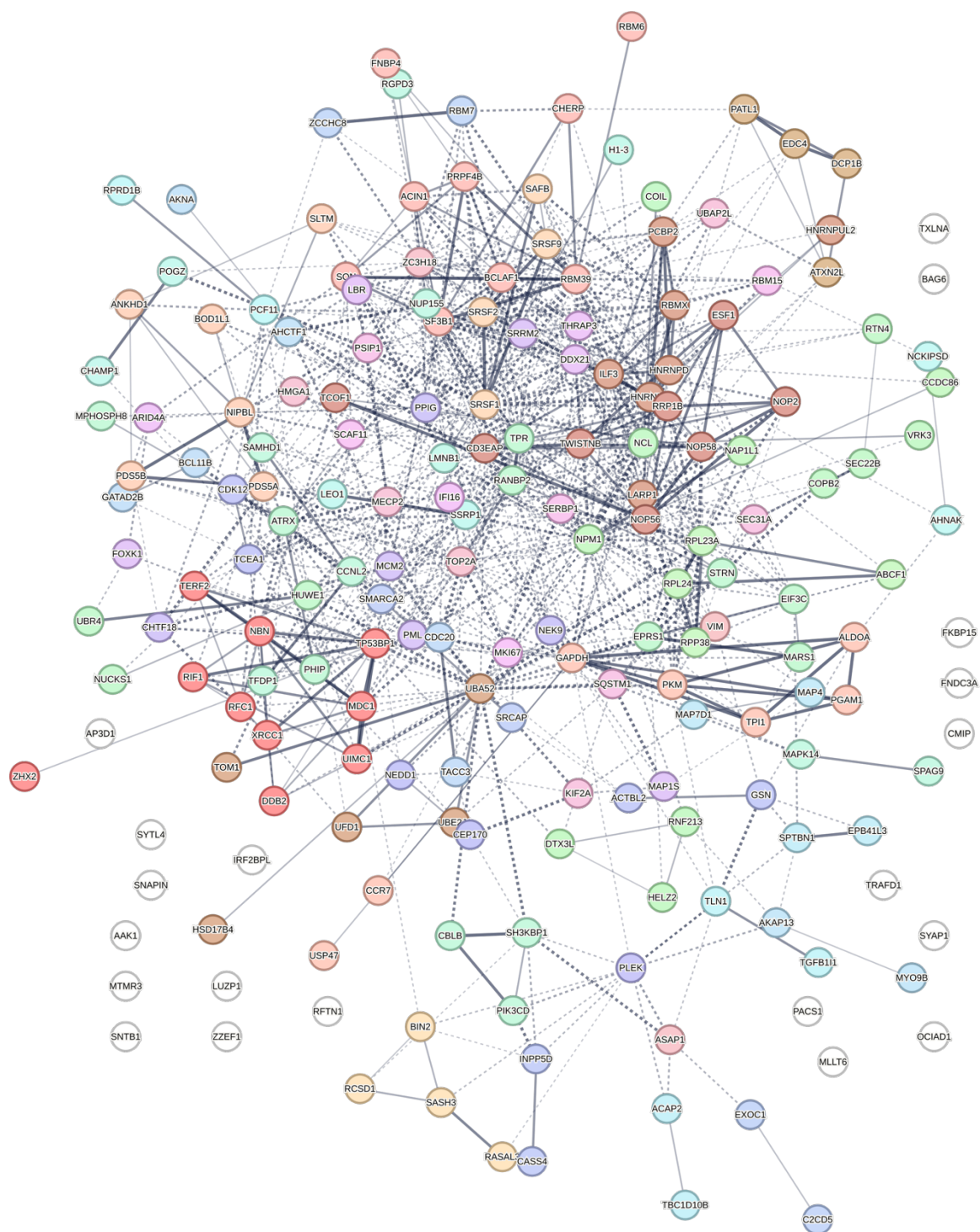


Figura suplementaria 12. Redes de interacciones proteína-proteína (PPI) obtenidas mediante STRING a partir de las fosfoproteínas comunes diferencialmente reguladas tras tratamiento con ambos inhibidores. Los nodos representan fosfoproteínas y las aristas corresponden a interacciones funcionales conocidas o predichas.