

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**EVALUACIÓN DE LA CAPTACIÓN DEL *Beta Amiloide*₁₋₄₂ POR EL
RECEPTOR 1 LIGADO A LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD
(LRP-1) EN CÉLULAS HEPÁTICAS (HepG2)**

Tesis presentada por las Bachilleres:

Cruz Torres, Pamela Shua.

Mamani Apaza, Leydi Mikely.

para optar el Título Profesional de

Química Farmacéutica.

Asesora:

Dra. Vera Lopez, Karin Jannet

AREQUIPA - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000042645

N° Trámite en Fac. 1715-2017

Fecha 14-09-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **CRUZ TORRES, Pamela Shua**
MAMANI APAZA, Leydi Mikely

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION DE LA CAPTACION DEL Beta amiloide 1-42 POR EL RECEPTOR LIGADO A LA LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD-1 (LRP-1) EN CELULAS HEPATICAS (HepG2)"

DICTAMINADORES: 1) Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar 2) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, se ha procedido a la revisión del mismo, sugiriendo se cambie el título a: **"EVALUACION DE LA CAPTACION DEL Beta amiloide 1-42 POR EL RECEPTOR LIGADO A LA LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD-1 (LRP-1) EN CELULAS HEPATICAS (HepG2) UCSM"**, y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
Firmas:  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha **26/03/2018**

ASESOR: Dra. Karin Vera López


DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesora en el presente Trabajo de Investigación, cumpla con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente
Firma  Fecha **13/07/18**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas**
- 2) **Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar**
- 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a: **"EVALUACION DE LA CAPTACION DEL Beta Amiloide 1-42 POR EL RECEPTOR LIGADO A LA LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD (LRP-1) EN CELULAS HEPATICAS (HepG2)"**, y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha **17/08/2018**

JURADOS:
Presidente **Dr. José Villanueva Salas**
Vocal **Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar**
Secretario **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

SUSTENTACION DE TRABAJO:

Fecha: **12/09/18** Hora: **19:00** Local: **C- 402 (SUM)**


DECANO

DEDICATORIA

A mi madre, Lilia Apaza, la persona más importante de mi vida y el motivo de mis logros, quien estuvo ahí siempre a pesar de la distancia y me enseñó a no rendirme a pesar de las circunstancias. Gracias por ser mi mamá loca y no rendirte.

A mi papa abuelito, Francisco Apaza, quien es la figura paterna en mi vida y ejemplo a seguir. Que con sus enseñanzas y consejos supe superarme y seguir adelante para alcanzar mis metas.

A mis tíos y tías, que estuvieron ahí para apoyarme con sus consejos para ser una mejor persona en aspecto laboral y personal.

A mis primos y sobrinos, quienes me alegran el día, para que ellos logren cumplir sus metas y no exista un no puedo en sus vidas y así puedan lograr todo lo que se propongan.

Leydi.

DEDICATORIA

Ante todo, Dios, quién supo guiarme por el buen camino dándome fuerzas para seguir adelante a pesar de las adversidades que se nos presenta en la vida.

La dedico con todo mi amor y cariño a mis padres Teresa y Jimmy, quienes son mi motivación e inspiración, siempre me apoyaron incondicionalmente que con sus palabras de aliento no me dejaban decaer y cumpla con mis ideales.

De manera muy especial, a mi madre TERESA, quien sin escatimar esfuerzo alguno ha sacrificado por mi gran parte de su vida, me ha formado y educado.

Los amo con todo mi corazón, mi familia es lo mejor y lo más valioso que Dios me ha dado.

Pamela.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por su amor y sus infinitas bendiciones, permitiéndonos culminar nuestros estudios.

A la Universidad Católica Santa María a nuestra Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a nuestros docentes por brindarnos una educación de calidad de manera personal y profesional.

De manera especial, agradecer a nuestra asesora Dra. Karin Vera López, por su apoyo, dedicación y el tiempo incondicional que nos ha brindado durante la redacción del presente trabajo de investigación.

A la Universidad de *Massachusetts Collage of Pharmacy and Health Sciences*, en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa, por la confianza, oportunidad y conocimientos brindados en la ejecución de esta investigación.

De igual manera, agradecemos a nuestro amigo, compañero Nicholas Jakowenko por la paciencia, apoyo, dedicación y empeño para la culminación del presente proyecto.

A nuestro querido amigo MSc. Alejandro Rondón Ortiz, por su tiempo, orientación y colaboración en el trascurso de la ejecución del proyecto.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo, que destruye progresivamente las funciones del sistema nervioso central. Dos procesos degenerativos caracterizan esta patología: la amiloidogénesis, que corresponde a la formación de filamentos de péptido *beta-amiloide* en forma de depósitos extracelulares; y la degeneración neurofibrilar, resultado de la agregación intraneuronal de filamentos de proteínas tau patológicas.¹

Los estudios realizados indican un aumento de la incidencia de esta enfermedad, diagnosticada por vez primera en 1907, por el médico alemán Alois Alzheimer.² Según estimaciones globales, hay unos 12 millones de afectados en todo el mundo. En 2010, se estimaba que había 454,000 nuevos casos de demencia por Alzheimer.³ Para 2025, se estima que el número de personas de 65 años o más con demencia de Alzheimer alcanzará 7,1 millones, casi un aumento del 35 por ciento de los 5,3 millones de personas de 65 años y más afectadas en 2017.⁴

El receptor 1 ligado a la lipoproteína de baja densidad (LRP-1) es un receptor endocítico que pertenece a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL).⁵ LRP-1 se expresa en un gran panel de células, como hepatocitos, fibroblastos, células de músculo liso, neuronas y astrocitos. LRP-1 reconoce y está implicado en la endocitosis de más de 40 ligandos diferentes incluyendo apolipoproteína E (apoE), APP y A β .⁶

En la enfermedad del Alzheimer, estudios previos determinaron que los niveles de LRP-1 son significativamente inferiores de un paciente con Alzheimer a diferencia con un adulto mayor normal.⁷

El presente trabajo busca establecer la evaluación de la captación del *beta amiloide* *1-42* por el receptor 1 ligado a la lipoproteína de baja densidad (LRP-1) en células hepáticas HepG2. Por tanto, permite desarrollar una alternativa terapéutica y/o investigación para la prevención de la progresión de la enfermedad del Alzheimer.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA), en la actualidad, la sexta causa principal de muerte en adultos mayores de EEUU según la Asociación de Alzheimer, es una de las formas más comunes de demencia en el mundo, causando una pérdida progresiva de memoria y funciones cognitivas debido a un daño severo lento de las células cerebrales.

Actualmente se conoce que la acumulación, agregación y deposición del péptido *Beta amiloide* $1-42$ ($A\beta_{1-42}$) depositadas en varias áreas del cerebro, debido a un desequilibrio entre la producción y su eliminación, es una característica importante de la patogénesis del Alzheimer.

El LRP-1 es un receptor transmembrana que está presente en diferentes células (gliales, astrocitos, células hepáticas, etc.) y actúa como un receptor endocítico para múltiples ligandos incluyendo $A\beta_{1-42}$. Por esta razón, LRP-1 desempeña un papel crítico en la eliminación de $A\beta_{1-42}$ del cerebro y el cuerpo.

Basándonos en que el hígado es un órgano de metabolismo y eliminación de sustancias del organismo, el presente estudio tuvo como propósito investigar si la captación del péptido $A\beta_{1-42}$ es un proceso dependiente de los niveles de expresión del receptor LRP-1 en las células hepáticas (HepG2). Para ello se trabajó a diferentes condiciones, disminuyendo y manteniendo la expresión de LRP-1.

Para la evaluación de la expresión del LRP-1, se trató a las células con un antagonista del PPAR γ (T007097) a 10 μ M por 24h, donde se comprobó la disminución de la expresión dicho receptor. Posterior a ello se evaluó la captación del péptido $A\beta_{1-42}$ en células HepG2, con la expresión de LRP-1 disminuido, a diferentes tiempos: 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h y 6h, mediante el método de

inmunofluorescencia, obteniéndose resultados no coherentes se decidió trabajar con otro método para la evolución de la captación de $A\beta_{1-42}$ con niveles de expresión normales de LRP-1.

Para mantener la expresión de LRP-1 en niveles normales, las células se trataron con Bafilomicina A1 10nM por 3h y la captación del péptido $A\beta_{1-42}$ se evaluó por el método de Inmunocitoquímica, mostrando una mayor captación que las células control.

Además, se evaluó la especificidad del receptor LRP-1 sobre el $A\beta_{1-42}$ en células hepáticas, en el cual se usó el Scrambled, que tiene los mismos aminoácidos que el péptido, pero en diferente orden. Obteniendo como resultado que el LRP-1 es específico para el péptido $A\beta_{1-42}$. Esto se realizó mediante los métodos de espectrometría de fluorescencia, Elisa e Inmunocitoquímica, Todos los datos estadísticos obtenidos se analizaron por el software GraphPad Prism 6®.

En el presente estudio se concluyó que el $A\beta_{1-42}$ tiene una captación dependiente del receptor LRP-1 en células hepáticas G2 y el receptor implicado es específico para el ligando $A\beta_{1-42}$.

Palabras Clave: Beta amiloide $_{1-42}$, LRP-1, Bafilomicina A1, T0070907, Scrambled.



ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD), currently the sixth leading cause of death in older adults in the US according to the Alzheimer's Association, is one of the most common forms of dementia in the world, causing a progressive loss of memory and functions cognitive due to severe slow damage of brain cells.

It is currently known that the accumulation, aggregation and deposition of the peptide Beta amyloid 1-42 ($A\beta_{1-42}$) deposited in several areas of the brain, due to an imbalance between production and its elimination, is an important characteristic of the pathogenesis of Alzheimer's.

LRP-1 is a transmembrane receptor that is present in different cells (glial, astrocytes, liver cells, etc.) and acts as an endocytic receptor for multiple ligands including $A\beta_{1-42}$. For this reason, LRP-1 plays a critical role in the elimination of $A\beta_{1-42}$ from the brain and the body.

Based on the fact that the liver is an organ of metabolism and elimination of substances from the organism, the present study had the purpose of investigating whether the uptake of the $A\beta_{1-42}$ peptide is a process dependent on the expression levels of the LRP-1 receptor in liver cells (HepG2). For this, different conditions were worked on, decreasing and maintaining the expression of LRP-1.

For the evaluation of the expression of LRP-1, the cells were treated with a PPAR γ antagonist (T007097) at 10 μ M for 24h, where the decrease in the expression of said

receptor was checked. After that, the uptake of A β 1-42 peptide in HepG2 cells was evaluated, with decreased LRP-1 expression, at different times: 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h and 6h, using the immunofluorescence method, obtaining results We decided to work with another method for the evolution of uptake of A β 1-42 with normal expression levels of LRP-1.

To maintain the expression of LRP-1 at normal levels, the cells were treated with 10nM Bafilomycin A1 for 3h and the uptake of the A β 1-42 peptide was evaluate by the Immunocytochemistry method, showing a higher uptake than the control cells. In addition, the specificity of the LRP-1 receptor on A β 1-42 was evaluate in liver cells, in which Scrambled, which has the same amino acids as the peptide, was used, but in a different order. Obtaining as a result that LRP-1 is specific for the A β 1-42 peptide. This was do using the fluorescence, Elisa and immunocytochemistry methods. The GraphPad Prism 6® software analyzed all the statistical data obtained.

In the present study it was concluded that A β 1-42 has an uptake dependent on the LRP-1 receptor in G2 liver cells and the receptor involved is specific for the A β 1-42 ligand.

Keywords: Beta amyloid 1-42, LRP-1, Bafilomycin A1, T0070907, Scrambled.





HIPÓTESIS

Dado que, en células cerebrales la captación del péptido *Beta Amiloide*₁₋₄₂ aumenta cuando los niveles de LRP-1 son mayores. Es probable que, cuanto mayor es el nivel de LRP1, mayor será la cantidad de *Beta Amiloide*₁₋₄₂ internalizada por las células hepáticas (*in vitro*), siendo así un proceso dependiente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la captación del *Beta Amiloide* ₁₋₄₂ por el receptor 1 ligado a la lipoproteína de baja densidad (LRP-1) en células hepáticas (HepG2).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

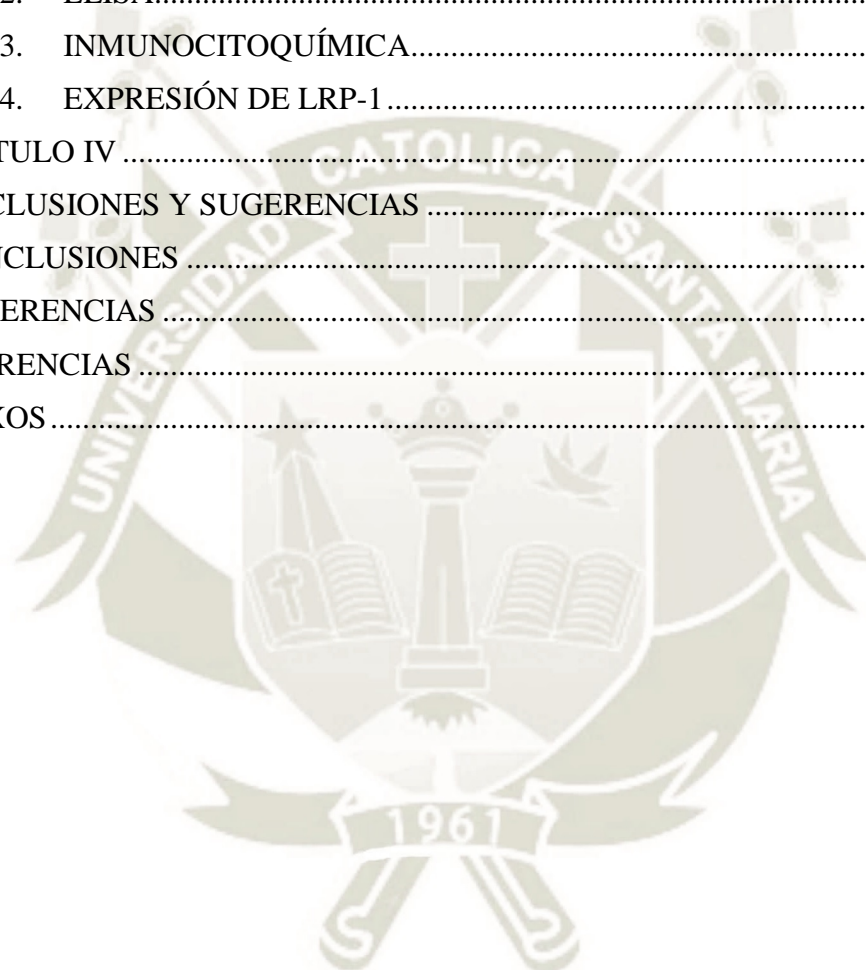
1. Evaluar el efecto del T0070907 (antagonista del PPAR γ) en los niveles de LRP-1 en células HepG2.
2. Evaluar la captación del *Beta Amiloide* ₁₋₄₂ por el LRP-1 en células HepG2 tratadas con T0070907 a diferentes tiempos.
3. Determinar la captación de *Beta Amiloide* ₁₋₄₂ en células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1 (Inhibidor de la degradación lisosomal).
4. Determinar si el péptido *Beta Amiloide* ₁₋₄₂ es captado como un proceso dependiente, de la concentración de LRP-1 en células HepG2.
5. Determinar si el LRP-1 es específico para el ligando *Beta Amiloide* ₁₋₄₂.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
HIPÓTESIS.....	X
OBJETIVOS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVIII
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1. ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER.....	2
1.1. DEFINICIÓN.....	2
1.2. HISTORIA.....	3
1.3. FISIOPATOLOGÍA.....	4
1.4. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
1.5. IMPACTO ECONÓMICO.....	6
1.6. FACTORES.....	6
1.6.1. FACTORES DE RIESGO.....	6
1.6.2. FACTORES GENÉTICOS.....	6
1.6.3. FACTORES PROTECTORES.....	8
1.7. SINTOMATOLOGÍA.....	9
1.7.1. ALTERACIONES COGNOSCITIVAS.....	9
1.7.2. TRASTORNOS DEL ESTADO DE ÁNIMO Y CONDUCTUALES.....	9
1.8. DIAGNÓSTICO.....	11
1.9. TRATAMIENTO.....	12
1.9.1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO/BIOLÓGICO.....	13
1.9.2. TRATAMIENTOS INNOVADORES.....	15
2. PATOGÉNESIS DEL ALZHEIMER.....	15
2.1. HIPÓTESIS COLINÉRGICA.....	15
2.2. HIPÓTESIS TAU.....	16
2.3. HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA.....	17
3. RECEPTOR 1 LIGADO A LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD (LRP-1) ..	22
3.1. DEFINICIÓN.....	22

3.2. RELACIÓN CON EL ALZHEIMER	23
4. ANTAGONISTA DEL PPAR γ (T0070907)	26
5. BAFILOMICINA A1	27
6. ENSAYOS EN LÍNEAS CELULARES	27
6.1. WESTERN BLOT.....	27
6.2. BCA.....	28
6.3. INMUNOCITOQUÍMICA.....	29
6.4. ELISA.....	29
CAPÍTULO II.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. MATERIALES	31
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	31
1.2. MATERIAL DE LABORATORIO	31
1.3. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	33
2. MÉTODOS	33
2.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL PÉPTIDO 5 (6) – CARBOXIFLUORESCÉINA (FAM)-Beta Amiloide ₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$).....	33
2.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL SCRAMBLED FAM- Beta Amiloide ₁₋₄₂	34
2.3. CULTIVO CELULAR.....	35
2.4. CONTEO CELULAR	36
2.5. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LRP-1 EN CÉLULAS Hep-G2.....	37
2.6. PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE SOLUCIONES PARA TRATAMIENTO CELULAR: T0070907 Y BAFILOMICINA A1	38
2.7. ADICIÓN DEL FAM- $A\beta_{1-42}$	44
2.8. EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD DEL LRP-1 CON EL SCRAMBLE FAM- $A\beta_{1-42}$	46
2.9. LISIS CELULAR.....	47
2.10. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LRP-1	48
2.11. CAPTACIÓN DEL PÉPTIDO FAM- $A\beta_{1-42}$ POR EL LRP-1	53
2.12. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	57
CAPÍTULO III	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
1. CULTIVO CELULAR.....	59
2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	60
3. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LRP-1 EN CÉLULAS HepG2	62

4. EXPRESIÓN DEL LRP1 DESPUÉS DEL ANTAGONISMO DEL PPAR γ	64
5. CAPTACIÓN DEL PÉPTIDO FAM- $A\beta_{1-42}$	66
5.1. CAPTACIÓN DE FAM- $A\beta_{1-42}$ A DIFERENTES TIEMPOS TRATADAS CON T0070907	66
5.2. CAPTACIÓN DE FAM- $A\beta_{1-42}$ TRATADAS CON BAFILOMICINA A1.....	70
6. ESPECIFICIDAD DEL EL PÉPTIDO <i>Beta Amiloide</i>	75
6.1. ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA	75
6.2. ELISA.....	76
6.3. INMUNOCITOQUÍMICA.....	79
6.4. EXPRESIÓN DE LRP-1	83
CAPÍTULO IV	85
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	85
CONCLUSIONES	86
SUGERENCIAS	87
REFERENCIAS	88
ANEXOS	103



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del cerebro con Alzheimer.....	2
Figura 2. Diseño de placas seniles por Alois Alzheimer.....	3
Figura 3: Procesos celulares y moleculares que se estima participan en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer	4
Figura 4: Casos de demencia en el Mundo se triplicarán en 2050.....	5
Figura 5: Efectos de la tau hiperfosforilación en la función axonal.....	16
Figura 6: Cascada Amiloidea	17
Figura 7: Efectos del Beta amiloide 1-42 en la función sináptica.....	19
Figura 8: Presentación esquemática de las vías de procesamiento de APP.	20
Figura 9: Unión de ligandos del LRP-1.....	23
Figura 10: Estructura del LRP-1	24
Figura 11: Pasos de la eliminación de A β mediada por LRP-1 del cerebro.....	25
Figura 12: Estructura del T0070907	26
Figura 13: Estructura de la Bafilomicina A1.....	27
Figura 14: Corrida electroforética en Western Blot	28
Figura 15: Péptido FAM-Beta Amiloide 1-42	34
Figura 16: Equipo de evaporación rotatorio XCELVAP	35
Figura 17: Pellet de células HepG2.....	36
Figura 18: Equipo de conteo de viabilidad celular.....	37
Figura 19: Validación de la expresión de células HepG2	38
Figura 20: Administración de T0070907 en células HepG2.....	41
Figura 21: Placa de 12 pocillos para sembrado se células	41
Figura 22: Administración de T0070907 en células HepG2 a diferentes tiempos.....	42
Figura 23: Placa para inmunocitoquímica.....	43
Figura 24: Administración de Bafilomicina A1 en células HepG2.....	43
Figura 25: Administración de A β 1-42 en células HepG2 tratadas con T0070907	44
Figura 26: Administración de Scrambled-A β 1-42 y A β 1-42 a células HepG2	46
Figura 27: Administración de Scrambled- A β 1-42 y A β 1-42 a células HepG2.	47
Figura 28: Camara de Electroforesis vertical.....	50
Figura 29: Electrotransferencia de proteínas.....	51
Figura 30: Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau.....	52

Figura 31: Escaner Blotting (C-Blot Digit®).....	53
Figura 32: Placa oscura para fluorescencia	54
Figura 33: Fijación con Metanol y Paraformaldehído.....	54
Figura 34: Microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600)	55
Figura 35: Células de cáncer de hígado (HepG2) muertas, flotando y formando clusters .59	
Figura 36: Células de cáncer de hígado (HepG2, ATCC) al tercer día de sembradas, con una confluencia más del 90%	60
Figura 37: Curva de Calibración de Albumina de Suero Bovino.....	61
Figura 38: Pocillos con concentraciones de albúmina de 0, 125, 250, 500, 1000 y 2000µg/mL y muestra, por triplicado para la curva de calibración y cuantificación de proteínas.	61
Figura 39: Bandas de LRP-1 en células HepG2. Western Blot.....	62
Figura 40: Niveles de expresión del LRP-1 en células HepG2.....	63
Figura 41: Bandas de LRP-1 en células HepG2 tratadas con T0070907.	64
Figura 42: Niveles de expresión del LRP-1 en células HepG2 control y tratadas con T0070907.....	65
Figura 43: Captación de A β ₁₋₄₂ por el LRP-1 a diferentes tiempos.....	67
Figura 44: Bandas de LRP-1 en células HepG2 tratadas con T0070907 a diferentes tiempos. Western Blot	68
Figura 45: Niveles de expresión de LRP-1 en células HepG2 control y tratadas con T0070907.....	69
Figura 46: Bandas de LRP-1 en Citosol y Membrana de células HepG2. Western Blot...70	
Figura 47: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) perteneciente al FAM-A β ₁₋₄₂ , LRP-1, DAPI y Merge, de células control y tratado con Bafilomicina A1. Fijadas con Metanol.	71
Figura 48: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) pertenecientes al FAM-A β ₁₋₄₂ , LRP-1, DAPI y Merge, de células control y tratadas con Bafilomicina A1. Fijadas con Paraformaldehído.	72
Figura 49: Captación de A β ₁₋₄₂ por el LRP-1 en células tratadas con Bafilomicina A1 por 3h.	74
Figura 50: Captación del A β ₁₋₄₂ por el LRP-1 en células HepG2, comparadas con el Scrambled A β ₁₋₄₂ , para la evaluación de la especificidad del LRP-1.....	76
Figura 51: Curva de Calibración de Estándares de Hu-A β ₁₋₄₂	77

Figura 52: Captación del $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 en células HepG2, comparadas con el Scrambled $A\beta_{1-42}$, para la evaluación de la especificidad del LRP-1..... 78

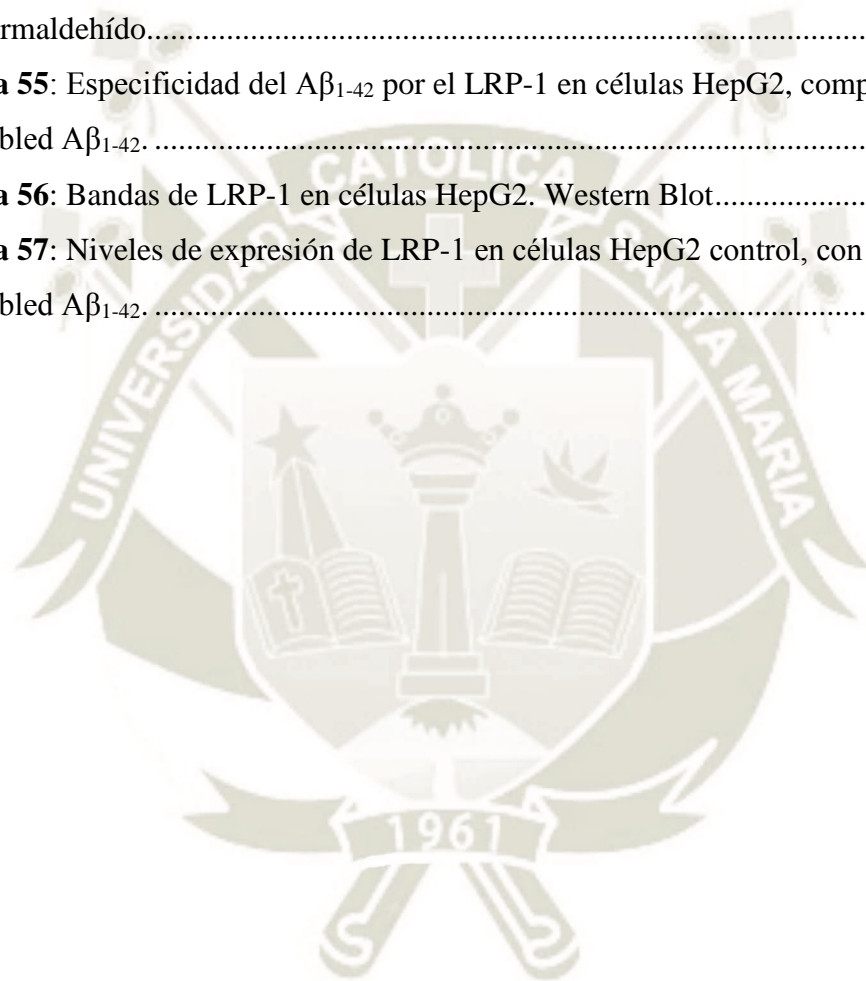
Figura 53: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) pertenecientes al FAM- $A\beta_{1-42}$, LRP-1, DAPI y Merge, de células control, scrambled y $A\beta_{1-42}$. Fijadas con Metanol..... 79

Figura 54: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) pertenecientes al FAM- $A\beta_{1-42}$, LRP-1, DAPI y Merge, de células control scrambled y $A\beta_{1-42}$. Fijadas con Paraformaldehído..... 80

Figura 55: Especificidad del $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 en células HepG2, comparadas con el Scrambled $A\beta_{1-42}$ 82

Figura 56: Bandas de LRP-1 en células HepG2. Western Blot..... 84

Figura 57: Niveles de expresión de LRP-1 en células HepG2 control, con $A\beta_{1-42}$ y con Scrambled $A\beta_{1-42}$ 84



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Factores de riesgo y protectores para la enfermedad del Alzheimer.	8
Tabla 2: Signos de la Enfermedad del Alzheimer a lo largo de cada etapa.....	10
Tabla 3: Diferencias entre Criterios NINCDS-ARDRA y NIA-AA	11
Tabla 4: Criterios clínicos de demencia por enfermedad Alzheimer (EA) según criterios NIA-AA.....	11
Tabla 5: Indicaciones aprobadas para EA. Fuente: Ministerio de Salud MINSA.....	14
Tabla 6: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2.....	63
Tabla 7: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2.....	64
Tabla 8: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2.....	68
Tabla 9: Áreas de A β 1-42 y LRP-1 en células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1	73
Tabla 10: Porcentaje de A β 1-42 captado por el LRP-1 en células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1.	73
Tabla 11: Concentración de péptido A β 1-42 por microgramo de proteína en células HepG2 control, scrambled y A β 1-42.....	78
Tabla 12: Áreas de A β 1-42 y LRP-1 en células HepG2 con Scrambled y A β 1-42	81
Tabla 13: Porcentaje de A β 1-42 captado por el LRP-1 en células HepG2 con scrambled y A β 1-42.....	82
Tabla 14: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2	84

LISTA DE ABREVIATURAS

A β ₁₋₄₂ :	<i>Beta amiloide</i> ₁₋₄₂
AchE:	Inhibidores de la acetilcolinesterasa
AEMPS:	Agencia de Evaluación de Medicamento y Productos Sanitarios
APP:	Proteína precursora de amiloide.
BCA:	Ácido bicincinamico
CAA:	Angiopatía amiloide cerebral
CHAP:	Project Chicago Health and Aging
CIE-10:	Décima Edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades
DMSO:	Dimetilsulfoxido
DAPI:	4',6-diamino-2-fenilindol, marcador fluorescente
EA:	Enfermedad del Alzheimer
EDTA:	Etilendiaminotetraacético.
EMA:	Agencia Medicina Europea
ENFs:	Enredos neurofibrilares Tau
EP:	Enfermedad de Parkinson
FAM:	5 (6) –carboxifluoresceína
FDA:	Administración Drogas y Alimentos
HepG2:	Células hepáticas G2
HFIP:	1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol
HRP:	Anticuerpo de Conejo IgG Horseradish Peroxidase
ICC:	Ensayo Inmunocitoquímica
INSERM:	El Instituto Nacional de la Salud y de la Investigación
LRP-1:	Receptor 1 ligado a la lipoproteína de baja densidad (LRP-1)

MBS:	MEM con bajo suero
MEM:	Medio Esencial Mínimo
MeOH:	Metanol
MC:	MEM completo
MEM.PER:	Reactivo de Extracción de Proteína de Membrana de Mamíferos
MLS:	MEM libre de suero
M-PER:	Reactivo de Extracción de Proteína de Mamíferos
NIA-AA:	National Institute of Aging (NIA) and Alzheimer's Association (AA)
NINCDS-ADRDA:	Criteria of National Institute of Neurological and Communicative Disorders y Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NMDA:	Receptores de N-metil-D-aspartato
PAF:	Paraformaldehído
PBS:	Buffer fosfato salino
PBS-T:	Buffer fosfato salino con tween
PPRE:	Respuesta del proliferador de peroxisoma
PSEN:	Prensilina
RFU:	Unidades de fluorescencia relativa
SDS:	Sodio dodecil sulfato
TBS-T:	Solución tris buffer salino tween 20
TEP:	Tomografía por emisión de positrones
TMB:	Tetrametilbencidina
WB:	Western blot



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER

1.1. DEFINICIÓN

La enfermedad del Alzheimer (EA) es una entidad clínico patológica neurodegenerativa, caracterizada clínicamente por el deterioro progresivo de múltiples funciones cognitivas por la presencia de ovillos neurofibrilares y placas neuríticas hipocampo-neocorticales.⁸ (Figura 1) Esta enfermedad es el tipo más común de demencia en adultos mayores, que conduce a una pérdida de la función cognitiva, es decir, la capacidad del ser humano de procesar la información.⁹

En particular, EA es una enfermedad irreversible que destruye las células del cerebro causando que la capacidad de pensamiento y la memoria se deterioren.¹⁰

El Instituto Nacional de la Salud y de la Investigación (INSERM), la define como una degeneración lenta de las neuronas, que comienza en el hipocampo y se propaga al resto del cerebro. Se caracteriza por trastornos de la memoria a corto plazo, funciones de ejecución y orientación en el tiempo y el espacio, perdiendo gradualmente las habilidades cognitivas y la autonomía.¹¹

Antiguamente a la EA se le conocía como “demencia senil” “ateroesclerosis” “falta de lucidez”.¹² Según la Organización Mundial de la Salud en su décima edición de la Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE-10), define la EA como «una enfermedad degenerativa cerebral primaria, de etiología desconocida, que presenta rasgos neuropatológicos y neuroquímicos característicos».¹³

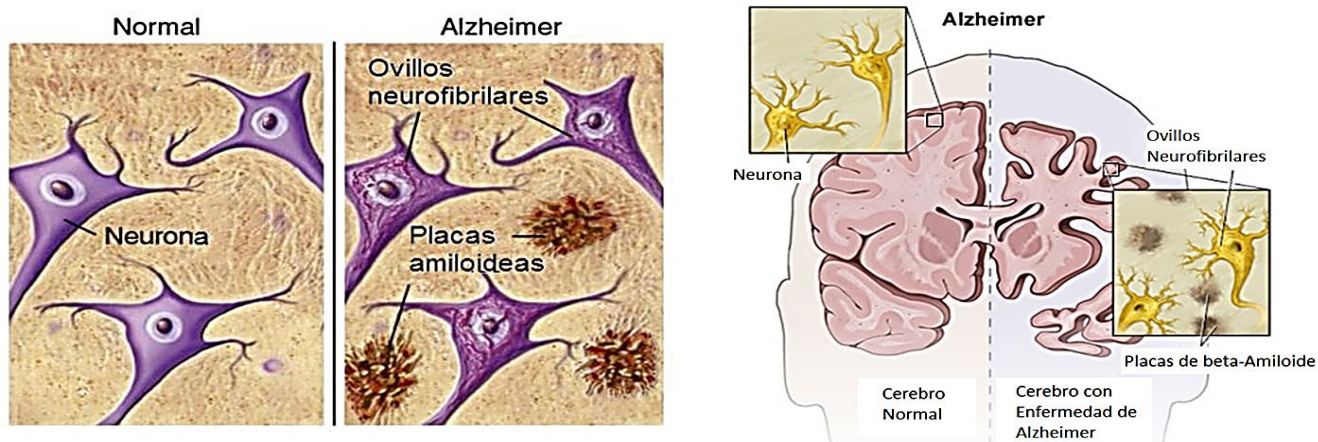


Figura 1. Estructura del cerebro con Alzheimer.¹⁴

1.2. HISTORIA

Fue descubierta por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Dr. Alois Alzheimer, que atribuye la descripción por primera vez una condición de demencia que más tarde se conoció como “ALZHEIMER” en 1906.¹⁵

En una conferencia en Tübingen, Alemania Alzheimer describió el caso de Auguste D, mujer de 51 años con una enfermedad peculiar de la corteza cerebral que había presentado con progresiva deterioro de la memoria, lenguaje, desorientación, síntomas de comportamiento y deterioro psicosocial.^{16,17} Después de su muerte, el Dr. Alzheimer realizó una autopsia, (Figura 2) durante la cual encontró una reducción dramática de la corteza cerebral y células cerebrales atrofiadas, es decir, descubrió ovillos neurofibrilares y placas seniles, que se han convertido en indicativos de la enfermedad.¹⁸



Figura 2. Diseño de placas seniles por Alois Alzheimer.¹⁹

En 1910, Emil Kraepelin denominó «enfermedad de Alzheimer» a la demencia presenil degenerativa ya que trataba del *senium praecox* (senilidad precoz o demencia precoz) y restringía la enfermedad a los casos que se inician antes de los 65 años de edad.²⁰

En 1955, sir Martin Roth publicó una investigación fundamental para el estudio científico de la demencia, en la que se establecían las semejanzas entre la demencia senil y la presenil (es decir la anterior a los 65 años)²¹

1.3. FISIOPATOLOGÍA

El Alzheimer es un trastorno cerebral neurodegenerativo que causa la interrupción significativa de la función del cerebro. Hay varias teorías e hipótesis acerca de la causa para explicar este trastorno multifactorial como la hipótesis colinérgica, la hipótesis Beta Amiloide, la hipótesis Tau y la hipótesis de la inflamación. (Figura 3) De las cuales quien está tomando más relevancia es la hipótesis Amiloidea en estas 2 últimas décadas. ^{22,23}

Esta hipótesis, con estudios previos hechos, demuestra que la formación de placas seniles de Beta Amiloide ($A\beta$) depositadas en varias áreas del cerebro, es la principal causa de eventos patológicos complejos del Alzheimer debido a un desequilibrio entre la producción y la eliminación del péptido ²⁴

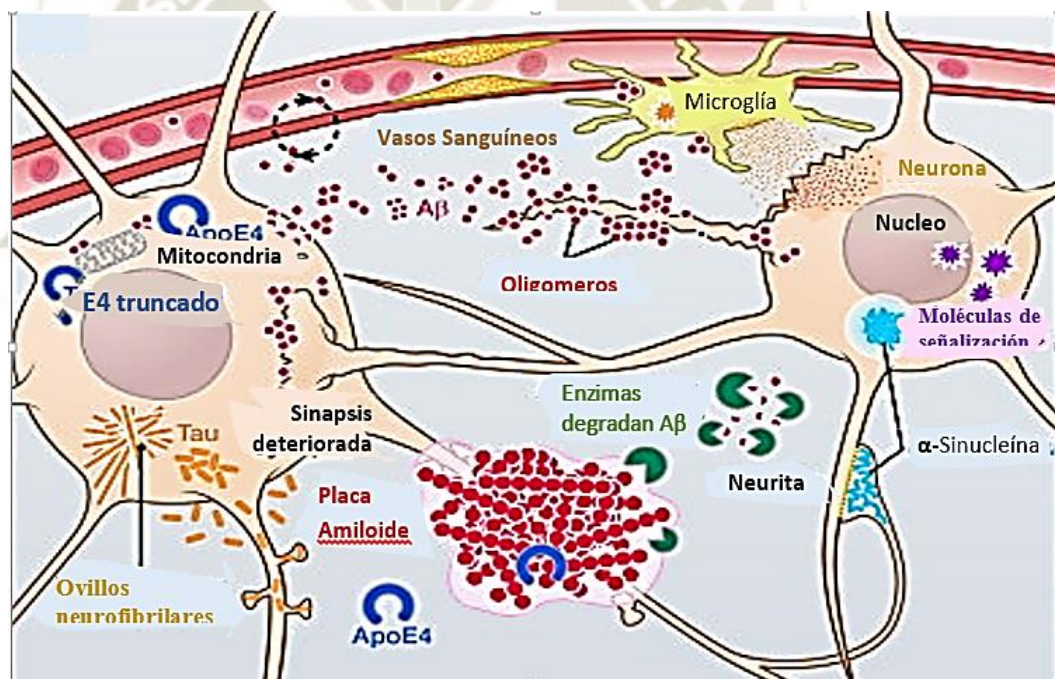


Figura 3: Procesos celulares y moleculares que se estima participan en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.²⁵

1.4. EPIDEMIOLOGÍA

En el 2015, el Informe Mundial sobre el Alzheimer actualiza las cifras de casos con demencia, donde nos indica que actualmente existen en el mundo cerca de 900 millones de personas mayores de 60 años, de las cuales se estima, que 46.8 millones

viven con demencia en el mundo y se proyecta que este número se duplique cada 20 años, alcanzando los 74.7 millones en el 2030 y los 131.5 millones en el 2050.²⁶ (Figura 4)

Según estudios que utilizaron los últimos datos del Censo de EE.UU. del 2010 y el Proyecto Chicago Health and Aging (CHAP), una de cada 10 personas de 65 años en adelante tiene demencia de Alzheimer.⁴ Se estima que 5,3 millones de estadounidenses de todas las edades vivieron con demencia por Alzheimer en 2017, de los cuales 3,3 millones son mujeres y 2,0 millones son hombres.³

En el Perú la prevalencia de demencia es de un 6.85%, dentro de los cuales un 56.2% tienen Alzheimer, esta se incrementa con la edad de 1,1% (95% CI: 1,0-1,3) en el grupo etario de 65 a 69 años de edad hasta 45,1% (95% CI: 44,6-45,8) en aquellos de más de 85 años de edad.²⁷

El Ministerio de Salud (MINSA) ha atendido en el 2015, alrededor de un millón doscientas mil personas de la tercera edad, 70 mil por problemas de salud mental y alrededor de 5 mil personas con demencia, incluido Alzheimer. Sin embargo, en el 2017, se calculó que en el país hay 200 mil personas que sufren de Alzheimer.²⁸

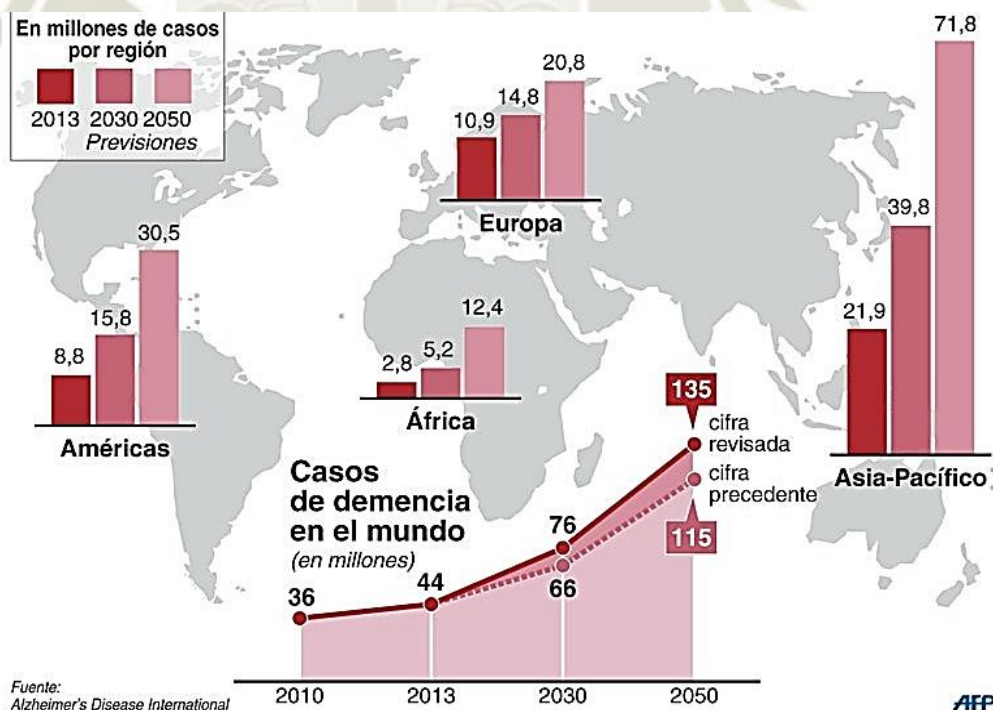


Figura 4: Casos de demencia en el Mundo se triplicarán en 2050.²⁹

1.5. IMPACTO ECONÓMICO

A nivel mundial, los costos que representa la demencia han aumentado de US\$604 billones en el 2010 a US\$818 billones en el 2015, lo que significa un incremento del 35,4%. Actualmente calculamos que US\$818 billones representan el 1,09% del Producto Bruto Interno (PBI) a nivel mundial, visualizándose un incremento de lo estimado en el 2010 que fue del 1,01%.³⁰

En el Perú, para evaluar el Alzheimer y otras enfermedades de la demencia, uno debe pasar por una consulta neurológica, exámenes de laboratorio, evaluación neuropsicológica y una neuroimagen (tomografía o resonancia magnética).³¹

1.6. FACTORES

Se clasifican en: factores de riesgo, genéticos y protectores. (Tabla 1)

1.6.1. FACTORES DE RIESGO

a. Edad:

La edad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de EA debido a que, durante el envejecimiento, se observa una pérdida normal de la reserva neuronal, así como una disminución de la neuroplasticidad. La prevalencia de la EA se duplica cada cinco años entre los 65 y los 85 años.³²

Después de 65 años, la frecuencia de la enfermedad aumenta y especialmente después de 80 años. La enfermedad de Alzheimer afecta al 15% de las personas mayores de 80 años.³³

b. Género:

Existe mayor prevalencia en mujeres a diferencia de los hombres, alrededor del 20,5% de las mujeres y el 13% de los hombres mayores de 75 años. La reducción de estrógenos en la menopausia también sería un factor de riesgo que muestra que las mujeres son más afectadas que los hombres.³⁴

1.6.2. FACTORES GENÉTICOS

a. **Mutación cromosómica:** Representa solo 1.5 a 2% de los casos, pero se pueden identificar 3 mutaciones raras en el origen de la enfermedad.

➤ **Mutación del gen precursor de la proteína amiloide (APP)**

El gen para la APP ubicado en el cromosoma 21, el gen codifica una proteína transmembrana que tiene el fragmento correspondiente al péptido β -amiloide.³⁵ Las mutaciones en este gen conducirán a la producción del péptido $A\beta_{1-42}$ a través de la ruta amiloidogénica.³⁷

➤ **Mutación del gen de presenilina 1 (PS1)**

El gen de PS1 se encuentra en el cromosoma 14 y codifica una proteína transmembrana. Esta proteína se encuentra en las neuronas y es parte del complejo γ -secretasa, que escinde la proteína APP y libera el péptido $A\beta_{1-42}$. Se ha encontrado aproximadamente el 70% de los pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar y la edad de inicio es aproximadamente 45 años.³⁸

➤ **Mutación del gen de presenilina 2 (PS2)**

El gen de PS2 se encuentra en el cromosoma 1, se ha identificado gracias a una homología en AA con el gen de PS1. Hasta la fecha, se han descrito 13 mutaciones de falso sentido de este gen. Son las mutaciones más raras, y la edad de inicio es alrededor de los 52 años.³⁹

b. Síndrome de Down

Un individuo nace con una copia adicional del cromosoma 21, uno de los 23 cromosomas humanos. Este cromosoma incluye un gen que codifica la producción de APP, que en personas con Alzheimer se corta en fragmentos de beta amiloide que se acumulan en placas, es decir, puede aumentar la cantidad de fragmentos de beta amiloide en el cerebro.³⁷ La tasa media de prevalencia de enfermedad de Alzheimer en el síndrome de Down parece estar alrededor del 15%, y aumenta con la edad.⁴⁰

c. Gen APoE

El gen ha sido identificado como un factor de riesgo, presente en el cromosoma 19, codifica una proteína de 299 AA y es polimorfo: tiene tres alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$).³⁵ Esta proteína ApoE permite el transporte de lípidos,

redistribuye los lípidos (colesterol, colesterol HDL, colesterol LDL) a las células del cuerpo, incluido el sistema nervioso y esto permite la reparación de las células en los sitios de la lesión. El alelo $\epsilon 4$ es el más común en pacientes con AE, el riesgo de desarrollar la enfermedad se duplica para los portadores de un solo alelo, pero se multiplica por 12 a 15 para ambos alelos.³⁶

1.6.3. FACTORES PROTECTORES

a. Vida social

Existen una diversidad de factores que disminuirían el riesgo de desarrollar la enfermedad como un alto nivel de educación, una actividad profesional estimulante, un séquito importante, un buen nivel de educación, actividades de ocio.³⁸ Todos estos factores parecen retrasar la aparición de los primeros síntomas y su gravedad, no reducen la pérdida de neuronas, pero permiten una buena plasticidad cerebral, lo que da como resultado una adaptabilidad permanente del cerebro.⁴¹

b. Alimentación y Deporte

Una dieta mediterránea saludable reduciría el riesgo de desarrollar la enfermedad, como el consumo regular de pescado o una dieta rica en frutas y verduras. Además, un consumo moderado de vino tendría un efecto beneficioso. La práctica de una actividad deportiva regular, como caminar, sería neuroprotectora.⁴²

FACTORES DE RIESGO	FACTORES GENÉTICOS	FACTORES PROTECTORES
Edad Sexo femenino	Mutaciones cromosómicas Síndrome de Down Gen ApoE	Vida social Alimentación Deporte

Tabla 1: Factores de riesgo y protectores para la enfermedad del Alzheimer.⁴³

1.7. SINTOMATOLOGÍA

Las alteraciones cerebrales de la enfermedad de Alzheimer dan lugar a tres tipos de síntomas/signos a lo largo de cada etapa: (Tabla 2)

1.7.1. ALTERACIONES COGNOSCITIVAS

Con la enfermedad se afectan todas las funciones intelectuales, pierde la capacidad para tomar decisiones y desenvolverse en las actividades simples de la vida

- A. **Pérdida de Memoria:** Uno de los signos más comunes de la enfermedad de Alzheimer, especialmente en las primeras etapas, es el olvido de la información recientemente aprendida. La afectación de la memoria semántica causa dificultad para recordar el nombre de los objetos. ⁴
- B. **Atención:** En los estadios iniciales los sujetos con EA presentan déficit en la atención selectiva (capacidad para dirigir la atención sobre un estímulo relevante e inhibir otros irrelevantes), principalmente en aquellas tareas que requieren inhibición de respuestas, selección y cambio atencional rápido. ³⁵
- C. **Disfasia:** Aparece precozmente y es ineludible cuando la EA está suficientemente avanzada, quizá porque la enfermedad causa mayor afectación del hemisferio izquierdo. Se afectan de forma sucesiva la capacidad semántica, la sintáctica y la fonológica. Progresivamente el lenguaje se va perdiendo, por lo que hay dificultad para encontrar las palabras correctas y denominar o expresarse. ⁴⁴
- D. **Dispraxia:** Dificultad para realizar movimientos en ausencia de pérdidas de fuerza, es uno de los elementos diagnósticos más importantes de la enfermedad de Alzheimer y se relaciona con la afectación parietal. ⁴⁵

1.7.2. TRASTORNOS DEL ESTADO DE ÁNIMO Y CONDUCTUALES

- A. **Depresión:** Cerca del 50% de los casos de EA se presentan como depresión (tristeza, pena, llanto, poca comunicación, entre otras manifestaciones). Esto dificulta el diagnóstico pues se cree que es

depresión y se deja pasar mucho tiempo antes del diagnóstico y tratamiento correcto. También puede presentarse poco después del inicio de EA cuando la persona se da cuenta que “ya no es la de antes” que “algo malo le está pasando”.⁴⁴

- B. **Ansiedad:** Se ha relacionado con la persistencia de los receptores corticales serotoninérgicos y se manifiesta como preocupación por el futuro. El estado de ánimo y las personalidades de las personas con Alzheimer pueden cambiar.³⁵
- C. **Alteraciones Psicóticas:** Delirios y alucinaciones son más frecuentes cuando la edad del enfermo es muy avanzada. Su prevalencia aumenta a medida que la enfermedad se agrava.⁴⁴
- D. **Retiro del trabajo o actividades sociales:** las personas con Alzheimer pueden comenzar a alejarse de pasatiempos, actividades sociales, proyectos de trabajo o deportes. Pueden tener problemas para mantenerse al día con un equipo deportivo favorito o recordar cómo completar un hobby favorito. También pueden evitar ser sociales debido a los cambios que han experimentado.⁴⁵

LEVE	MODERADO	SEVERO
Pérdida progresiva de memoria	Desorientación tiempo y espacio	Cambio en el estado de ánimo, el comportamiento y la personalidad
Disminución de la función cognitiva	Juicio pobre o bajado	Pérdida de iniciativa, que conduce a la depresión
Extraviar elementos	Problemas con el pensamiento abstracto	Problemas con el lenguaje
	Dificultad para llevar a cabo las actividades cotidianas de la vida diaria	Deambular sin rumbo

Tabla 2: Signos de la Enfermedad del Alzheimer a lo largo de cada etapa.⁴⁶

1.8. DIAGNÓSTICO

En 1984 se celebró en Estados Unidos una conferencia con el objetivo de consensuar criterios sobre el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Los criterios de National Institute of Neurological and Communicative Disorders y la Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (Tabla 3) se usan en la actualidad en muchos países.²¹

Los criterios clínicos pertenecientes al National Institute of Aging estadounidense (NIA) y la Alzheimer's Association (AA) surge del trabajo conjunto denominado NIA-AA para el diagnóstico de 'probable' de EA.⁴⁷ (Tabla 4) La posibilidad de utilizar biomarcadores permite evaluar en un diagnóstico en fases asintomáticas.⁴⁸

CRITERIOS	NINCDS-ARDRA	NIA-AA
Edad de aparición	De los 40 a 90 años	A cualquier edad
Clínica	Presencia de síndrome amnésico	Signos cognitivos o conductuales
Deterioro cognitivo leve	No recogido	Se diagnostica en función de la repercusión funcional
Biomarcadores	No	Evidencia opcional de biomarcadores de fisiopatología Alzheimer

Tabla 3: Diferencias entre Criterios NINCDS-ARDRA y NIA-AA⁴⁸

CRITERIOS NIA-AA POR ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER
Posible
Posible con evidencia de proceso fisiopatológico de EA
Probable
Probable con un nivel de certeza incrementado
Probable con evidencia de proceso fisiopatológico de EA
Fisiopatológicamente probada

Tabla 4: Criterios clínicos de demencia por enfermedad Alzheimer (EA) según criterios NIA-AA.⁴⁸

No existe una prueba única para el Alzheimer, sin embargo, utilizan una variedad de enfoques y herramientas para ayudar a hacer un diagnóstico. Incluyen lo siguiente:

- Obtener un historial médico y familiar del individuo, incluida la historia y la historia psiquiátrica de cambios cognitivos y de comportamiento.
- Realización de pruebas cognitivas y exámenes físicos y neurológicos.
- Hacer que el individuo se someta a análisis de sangre e imágenes del cerebro y otras causas posibles de síntomas de demencia. ⁴⁹

Las tecnologías de pruebas por imágenes del cerebro que se utilizan con más frecuencia son:

- A. Imágenes por resonancia magnética (RM): Una resonancia magnética usa potentes ondas de radio e imanes para crear una vista detallada del cerebro. ⁵⁰
- B. Tomografía computarizada (TC). Una exploración por tomografía computarizada usa rayos X para obtener imágenes transversales del cerebro. ⁵⁰
- C. Tomografía por emisión de positrones (TEP): En las TEP se usa una sustancia radioactiva, que se conoce como «radiomarcador», para detectar sustancias en el cuerpo. Existen diferentes tipos de TEP. La TEP que se usa con más frecuencia es la TEP con fluorodesoxiglucosa, que puede identificar las regiones del cerebro con disminuciones en el metabolismo de la glucosa. El patrón de cambios en el metabolismo sirve para distinguir distintos tipos de enfermedades cerebrales degenerativas. ⁵¹

Recientemente, se han presentado TEP que pueden detectar grupos de proteínas amiloide (placas), que están relacionados con la demencia de Alzheimer. Pero, en general, este tipo de TEP se usa en entornos de investigación. ⁵²

1.9. TRATAMIENTO

Actualmente no hay tratamiento curativo para la Enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, hay medicamentos y estrategias no farmacológicas que ayudan y mejoran las manifestaciones de la enfermedad.

1.9.1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO/BIOLÓGICO

Los fármacos más usados y aprobados para el tratamiento del Alzheimer son los:

1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE)

Previenen la descomposición de la Acetilcolina que es un mensajero químico muy importante para la memoria y el aprendizaje. Al mantener los niveles de Acetilcolina altos, estas drogas apoyan la comunicación entre las células del sistema nervioso.⁵³

Generalmente son bien tolerados. Los efectos colaterales más comunes son: náuseas, vómitos, pérdida de apetito y diarrea. Los inhibidores de acetilcolina más usados son:

1.1. Rivastigmina.- Es un doble inhibidor, inhibirá reversiblemente AChE pero también butirilcolinesterasa, es una enzima que también degrada Ach.³⁵ Esta molécula existe en forma de cápsula, solución oral y dispositivo transdérmico. Para las formas orales, el tratamiento con 1,5 mg dos veces al día.⁵⁴

1.2. Galantamina.- Es un alcaloide terciario, un inhibidor específico, competitivo y reversible de la AChE cerebral, que potencia la acción intrínseca de AChE sobre los receptores nicotínicos.³⁵ Al inicio del tratamiento, la dosis será de 8 mg por día en dos dosis por la mañana y por la noche o una en la mañana.⁵⁵

1.3. Donepezilo.- Es un inhibidor específico y reversible de AChE cerebral.⁵⁶ Existe en 2 formas, comprimido recubierto con película y bucodispersable en 5 mg y 10 mg. La dosis habitual al comienzo del tratamiento es de 5 mg por día tomada antes de acostarse.⁵⁷

2. Antagonistas de los receptores NMDA: Memantina

Aprobado por la FDA para el tratamiento de Alzheimer en estadio moderado avanzado. Se recomienda usarlo junto con un Inhibidor de acetil colinesterasa. Trabaja regulando la actividad del glutamato, un mensajero químico diferente que juega un papel en el aprendizaje y la memoria. Como efectos secundarios puede producir dolor de cabeza, confusión, mareos, estreñimiento⁵⁶ (Tabla 5)

MEDICAMENTO	Administración Drogas y Alimentos (FDA)	Agencia Medicina Europea (EMA)	Agencia de Evaluación de Medicamento y productos Sanitarios (AEMPS)
Memantina 10mg tableta	Indicado para el tratamiento de la demencia moderada a grave del tipo Alzheimer	Tratamiento de pacientes adultos con enfermedad de Alzheimer de moderada a grave	Tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer de moderada a grave
Donepezilo 10mg tableta	Indicado para el tratamiento de la demencia del tipo Alzheimer. Se ha demostrado la eficacia en pacientes con enfermedad de Alzheimer leve, moderada y grave		Tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer de leve a moderadamente grave.

Tabla 5: Indicaciones aprobadas para EA. Fuente: Ministerio de Salud MINSA⁵⁹

3. Vitamina E y Ácidos grasos omega 3

Son antioxidantes, algunos estudios han probado su efectividad en el rendimiento de actividades de la vida diaria de los pacientes con Alzheimer. Por los riesgos de interactuar con otros fármacos debe tomarse por indicación médica luego de una evaluación.⁵⁷

1.9.2. TRATAMIENTOS INNOVADORES

Renacenz (Cerebrolisina): Desarrollado por científicos austríacos, el nuevo fármaco basado en una sustancia llamada cerebro lisina, una proteína natural, permitiría detener el proceso degenerativo de las neuronas al acrecentar el desarrollo, fortalecimiento y protección de las neuronas, mejorando notoriamente la calidad de vida de los pacientes.⁵⁵

2. PATOGÉNESIS DEL ALZHEIMER

Hay varias teorías e hipótesis acerca de la patogénesis del Alzheimer, para explicar este trastorno multifactorial como la hipótesis colinérgica, la hipótesis Beta Amiloide, la hipótesis tau y la hipótesis de la inflamación. De las cuales quien está tomando más relevancia es la hipótesis Amiloidea en estas 2 últimas décadas^{22, 23}

2.1. HIPÓTESIS COLINÉRGICA

Es una antigua hipótesis basada en la disfunción colinérgica.⁶⁰ Fue definida hace más de 30 años como un proceso primario degenerativo capaz de dañar selectivamente grupos de neuronas colinérgicas en el hipocampo, corteza frontal, amígdalas, núcleo basal y tabique medial, regiones y estructuras que tiene una importante función en el rol de alerta consiente, atención, aprendizaje, memoria y otros procesos mnemotécnicos.^{61, 23}

Esta selectiva alteración genera una reducción de marcadores colinérgicos como la acetilcolinesterasa y la acetiltransferasa que está asociado con el comienzo del daño cognitivo.^{62, 63}

La investigación bioquímica sistemática del cerebro de pacientes con EA muestra una reducción en la actividad de la acetilcolinesterasa y la acetiltransferasa en la corteza del cerebro y otras áreas, comparada con un cerebro normal.^{64, 65}

Actualmente los tratamientos para EA están basadas en la hipótesis colinérgica, siendo solo para la prevención de la pérdida cognitiva.⁶⁶

2.2. HIPÓTESIS TAU

Los enredos neurofibrilares Tau (ENFs) fueron los primeros en ser descritos por Alois Alzheimer en una autopsia, como causa del Alzheimer.⁶⁷

La proteína Tau es abundantemente expresada en los axones de las neuronas⁶⁸ y su función más relevante es la unión y estabilización de los microtúbulos, que son las pistas para el tráfico intracelular.^{69, 70} En la EA la proteína Tau, por una anormal fosforilación, forma agregaciones de filamentos helicoidales emparejados, perdiendo su habilidad de mantener las pistas del microtúbulo. (Figura 5)⁶⁹

También se cree que las funciones fisiológicas normales del A β contribuyen a la disfunción neuronal. El A β interactúa con las vías de señalización que regulan la fosforilación de la proteína Tau asociada a microtúbulos. La hiperfosforilación de Tau interrumpe su función normal al regular el transporte axonal y conduce a la acumulación de enredos neurofibrilares y especies tóxicas de Tau soluble. Además, la degradación de Tau hiperfosforilada por el proteosoma se inhibe por las acciones del A β .⁷¹

En la actualidad los ENFs es uno de los mayores marcadores de la EA.⁶⁹

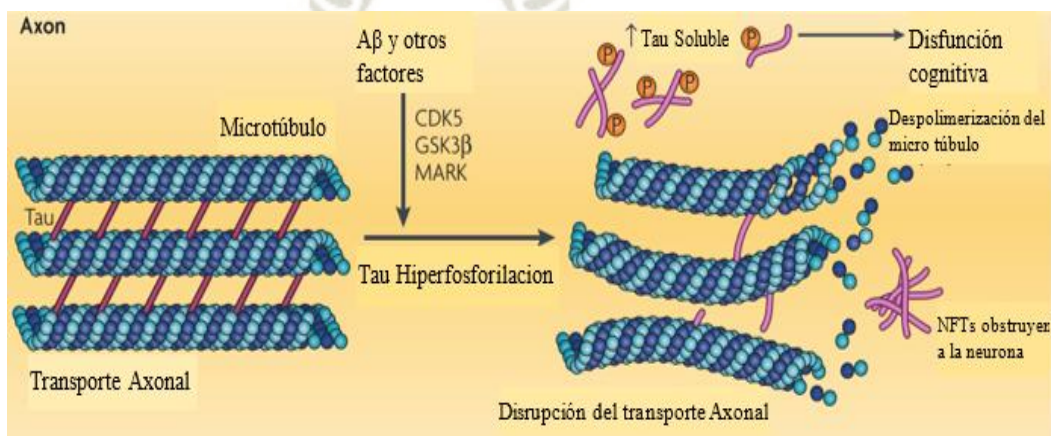


Figura 5: Efectos de la Tau hiperfosforilación en la función axonal⁷¹

2.3. HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA.

La hipótesis de la cascada amiloidea es el modelo más influyente en la patología del Alzheimer, propuesta hace 25 años, como resultado de numerosos estudios realizados.⁷² Esta hipótesis propone que la neurodegeneración en el EA es causada por una anormal formación de placas seniles de Beta Amiloide ($A\beta$) depositadas en diversas áreas del cerebro⁷³ debido a un desequilibrio entre la producción y la eliminación del péptido.⁶⁵

La identificación de Beta Amiloide ($A\beta$) en placas seniles y estudios genéticos que identificaron mutaciones en los genes de la proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) que conducen a la acumulación de $A\beta$ y demencia de inicio temprano, resultó en la formulación de la "Hipótesis de la cascada amiloide"^{74, 75} (Figura 6)

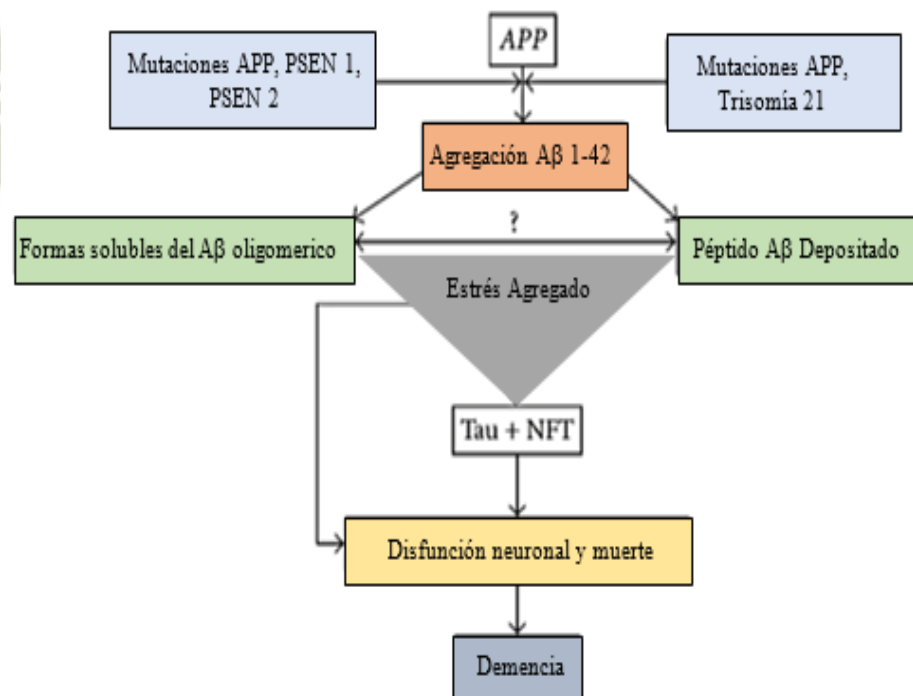


Figura 6: Cascada Amiloidea⁷⁴

Según la hipótesis amiloidea, la acumulación de placas de $A\beta$ actúa como un desencadenante patológico de una cascada que incluye daño neurótico, formación de enredos neurofibrilares a través de la proteína Tau que conduce a la disfunción neuronal y a la muerte celular en el Alzheimer⁷⁶

2.3.1. BETA AMILOIDE 1-42

Los péptidos $A\beta$ son 39-43 péptidos de residuos de aminoácidos derivados proteolíticamente de la acción enzimática secuencial de la β -secretasa y la γ -secretasa, sobre la APP transmembrana ampliamente distribuida.⁷⁷ El $A\beta$ forma el núcleo de los depósitos característicos observados en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer (EA), placas seniles y angiopatía amiloide cerebrovascular.⁷⁸

La longitud del péptido $A\beta$ varía en C-terminal de acuerdo con el patrón de escisión de APP. La isoforma $A\beta_{1-40}$ es la más prevalente, seguida por $A\beta_{1-42}$ que es hidrófoba en la naturaleza y se agrega a una velocidad más rápida que $A\beta_{1-40}$. Aunque el $A\beta$ es producido por casi todas las células del cuerpo, no se ha determinado una función fisiológica para el péptido.⁷⁹

Se cree que $A\beta$ tiene un papel fisiológico en la modulación de la actividad sináptica, cuya alteración probablemente subyace a la disfunción cognitiva. Además, el exceso de acumulación de $A\beta$ y oligómeros de $A\beta$ sinaptotóxicos induce la internalización e inhibición del receptor de neurotransmisores. Los niveles de acetilcolina se reducen marcadamente en EA, y los inhibidores de acetilcolinesterasa se usan como agentes terapéuticos.⁷¹ (Figura 7)

Se cree que $A\beta_{1-42}$ es una especie más tóxica ya que se agrega mucho más fácilmente que $A\beta_{1-40}$ y, por lo tanto, puede proporcionar la semilla para una mayor deposición de Ab y patologías relacionadas.⁸⁰

Los niveles más altos de $A\beta_{1-42}$, la forma más hidrófoba y fibrilogénica del péptido, fomenta el ensamblaje de $A\beta$ en estructuras de orden progresivamente más elevadas, desde los dímeros hasta las placas insolubles que finalmente se depositan en el cerebro.⁸¹

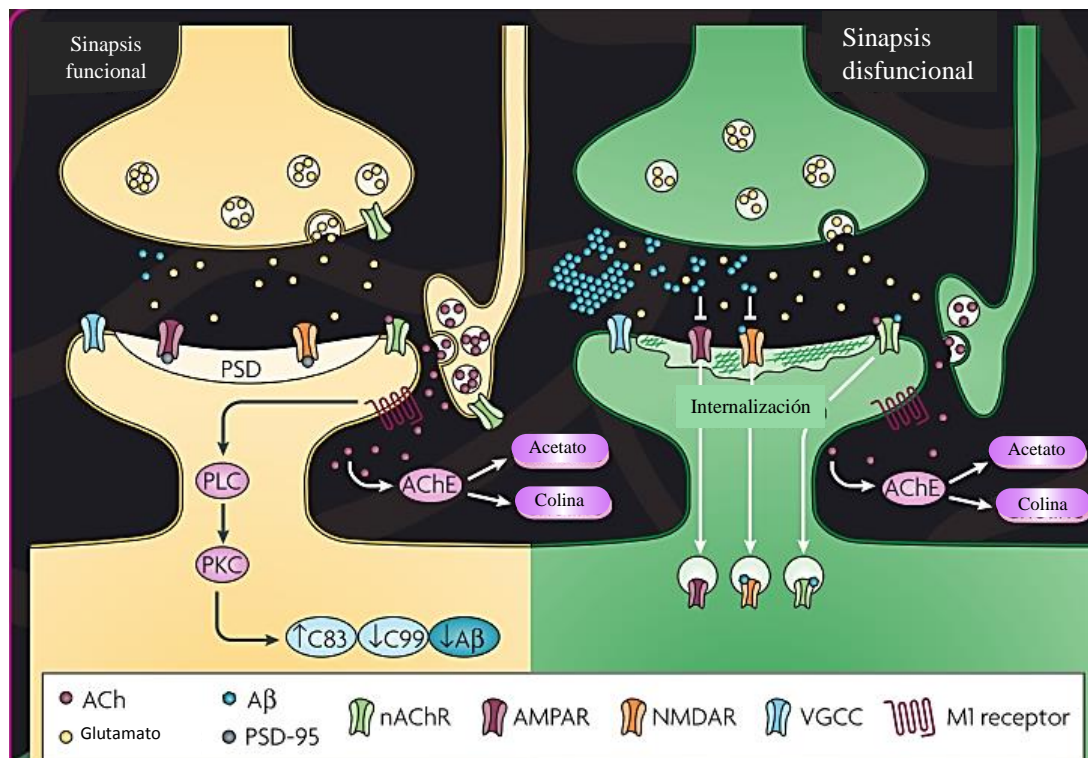


Figura 7: Efectos del Beta amiloide 1-42 en la función sináptica.⁷¹

2.3.2. PROTEINA PRECURSORA DE AMILOIDE

La proteína precursora amiloide (APP) es una proteína integral de membrana, expresada en muchos tipos de tejidos, y está concentrada en la sinapsis entre neuronas.^{82, 83} Posee múltiples isoformas derivadas de corte y empalme alternativo. Sin embargo, las funciones fisiológicas de la APP son poco conocidas.⁸⁴

La APP se puede dividir de dos maneras diferentes. La α -secretasa inicia la ruta no amiloidogénica y da como resultado la escisión de la APP dentro del dominio A β , lo que impide la generación de A β . La escisión de APP por α -secretasa produce APP secretada por α (sAPP α) y el fragmento C-terminal α -CTF unido a la membrana remanente.⁸⁵

Alternativamente, la escisión β catalizada por BACE de APP inicia la generación de A β y la ruta amiloidogénica. La escisión de BACE da como resultado la APP secretada por β (sAPP β) y el fragmento C-terminal β -CTF de la APP.⁸⁶

Ambos fragmentos C-terminales unidos a la membrana de APP, α -CTF y β -CTF, son sustratos para γ -secretasa, una proteasa multimérica ubicua. La escisión de γ -secretasa de α -CTF da como resultado la generación de un péptido no amiloidogénico truncado (p3), mientras que la escisión de γ -secretasa de β -CTF conduce a la generación de $A\beta$, el principal componente proteináceo de las placas amiloides encontradas en cerebros de pacientes con EA.^{85, 86}

Como β -CTF puede escindirse en lados diferentes por γ -secretasa, $A\beta$ varía en longitud; principalmente se producen un péptido $A\beta_{40}$ de 40 aminoácidos (aa) y un péptido que es 2 aa más largo, $A\beta_{1-42}$. Debido a su hidrofobicidad aumentada, $A\beta_{1-42}$ es capaz de formar agregados y es la especie predominante de $A\beta$ en las placas seniles. (Figura 8)^{85, 86, 87}

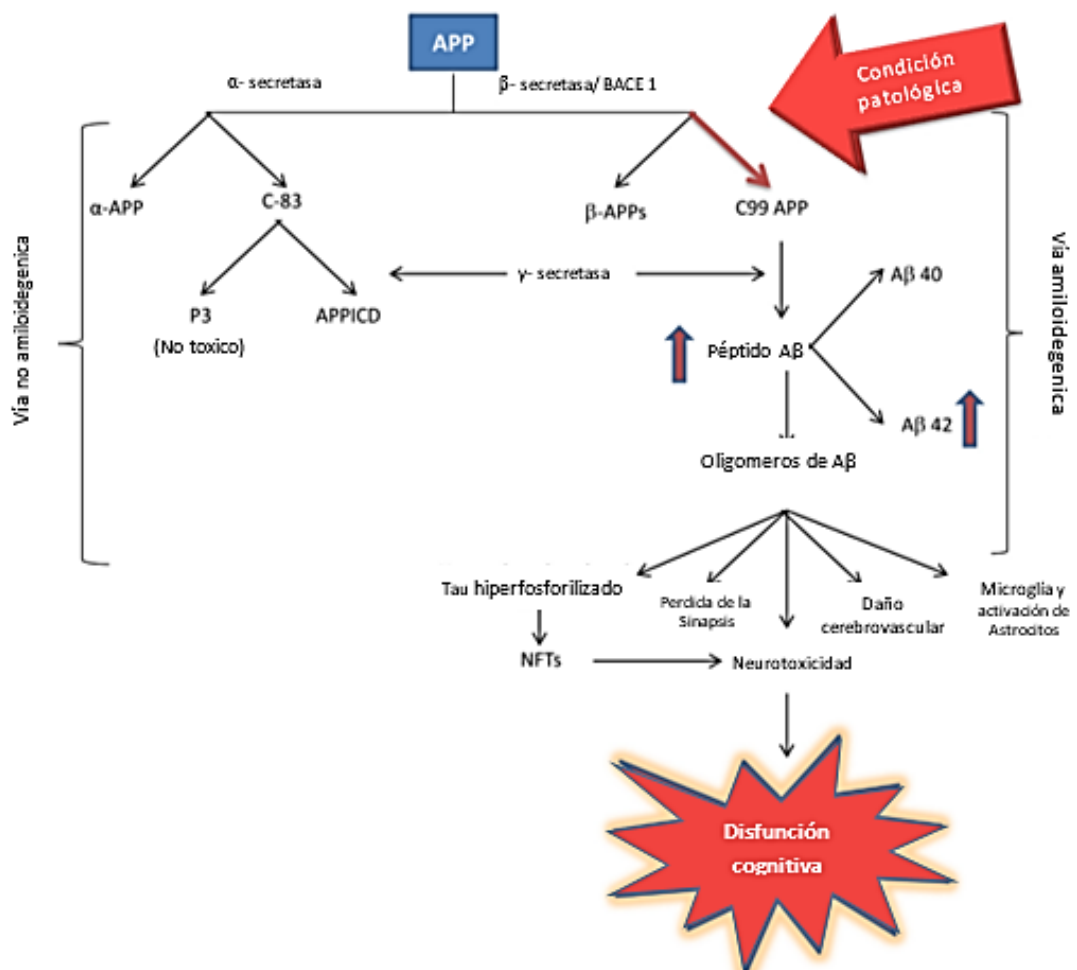


Figura 8: Presentación esquemática de las vías de procesamiento de APP⁸⁶.

El descubrimiento de la primera causa genética específica de EA fue la aparición de una mutación dominante autosómica en el gen APP.⁸⁸

El hecho de que las mutaciones que causan EA en la APP y en las presenilinas 1 (PSEN 1) y 2 (PSEN 2) alteran el procesamiento proteolítico de la APP de una manera que eleva los niveles relativos de los péptidos $A\beta_{1-42}$ se conoce desde hace tiempo.^{89, 90} Una explicación mecanicista clave fue el descubrimiento de que los genes de presenilina codifican el sitio activo de la división intramembrana de la enzima γ -secretasa.^{89, 90}

Estas mutaciones dan como resultado una EA de inicio temprano, autosómica dominante y totalmente penetrante. En la APP, las mutaciones se agrupan alrededor del sitio de escisión de la γ -secretasa, causando un cambio en los aminoácidos adyacentes al sitio de escisión BACE1. Las mutaciones del gen PSEN (que dan lugar a proteínas llamadas presenilinas, PS1 y PS2) alteran predominantemente los aminoácidos en sus nueve dominios transmembrana. El hilo conductor de todas estas mutaciones es que aumentan la producción del $A\beta_{1-42}$ menos soluble y más tóxico en relación con $A\beta_{40}$.⁹¹

Las funciones de las presenilinas aún no se han entendido con claridad, pero en base a la mayoría de las observaciones informativas se encontró que las presenilinas están involucradas en el tráfico de proteínas y la señalización de Notch.^{92, 93}

El mecanismo patogénico de las mutaciones de presenilina que altera el metabolismo de la APP sería responsable de elevar los niveles de péptidos $A\beta$.⁶⁵

2.3.3. APOE

El vínculo entre apoE y EA, y apoE y $A\beta$ en particular, se sugirió por primera vez a principios de la década de 1990, cuando se descubrió que apoE co-localizaba con placas amiloides.⁹⁴

ApoE tiene un papel clave en el metabolismo lipídico dirigiendo su transporte, distribución y distribución de un tipo de tejido o célula a otro a través de receptores ApoE y proteínas asociadas.⁹⁵ Los estudios bioquímicos,

biológicos de células y animales sugieren que ApoE4 puede aumentar la agregación de péptido A β y alterar el aclaramiento de A β en el cerebro que actúa como fuerza motriz para la patogénesis de la EA.⁹⁶

En casi todas las poblaciones, el alelo APOE ϵ 3 está presente en el 50-90% de las personas, mientras que el alelo APOE ϵ 4 y APOE ϵ 2 solo representan el 5-35% y el 1-5% respectivamente.⁹⁷ Se ha identificado que APOE ϵ 4 es un factor de riesgo importante asociado con EA de aparición tardía que los alelos ϵ 3 y ϵ 2.⁹⁸ Los modelos EA de genética y ratón han arrojado luz sobre la frecuencia alélica de APOE en la patogénesis de EA de inicio temprano, pero la gran mayoría de los casos de EA se presentan tardíamente en la vida.⁹⁷

3. RECEPTOR 1 LIGADO A LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD (LRP-1)

3.1. DEFINICIÓN

El receptor 1 ligado a la lipoproteína de baja densidad (LRP-1) es un receptor endocítico perteneciente a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Este receptor se expresa en diversas células, tales como hepatocitos, fibroblastos, células de músculo liso, neuronas, células gliales y astrocitos.⁹⁹

El LRP-1 se sintetiza como una proteína transmembrana glicosilada grande de 600 kDa. Este se transforma en una molécula de dos partes durante su maduración por una furina convertasa. El receptor maduro incluye una cadena α extracelular de 515 kDa y una cadena β de 85 kDa que contiene una extensión extracelular corta. Estas dos subunidades están unidas no covalentemente por medio de las partes extracelulares.¹⁰⁰

El LRP-1 contiene cuatro dominios, donde se unen los ligandos denominados dominio I a IV del N-terminal de la cadena α de LRP-1. La estructura distinta de LRP-1 permite su papel multifacético como transportador de carga, un eliminador multifuncional y un receptor de señalización implicado en la endocitosis de sus ligandos.¹⁰¹ LRP-1 reconoce y está implicado en la endocitosis de más de 40 ligandos diferentes incluyendo apolipoproteína E (apoE), APP y A β .¹⁰² (Figura 9)

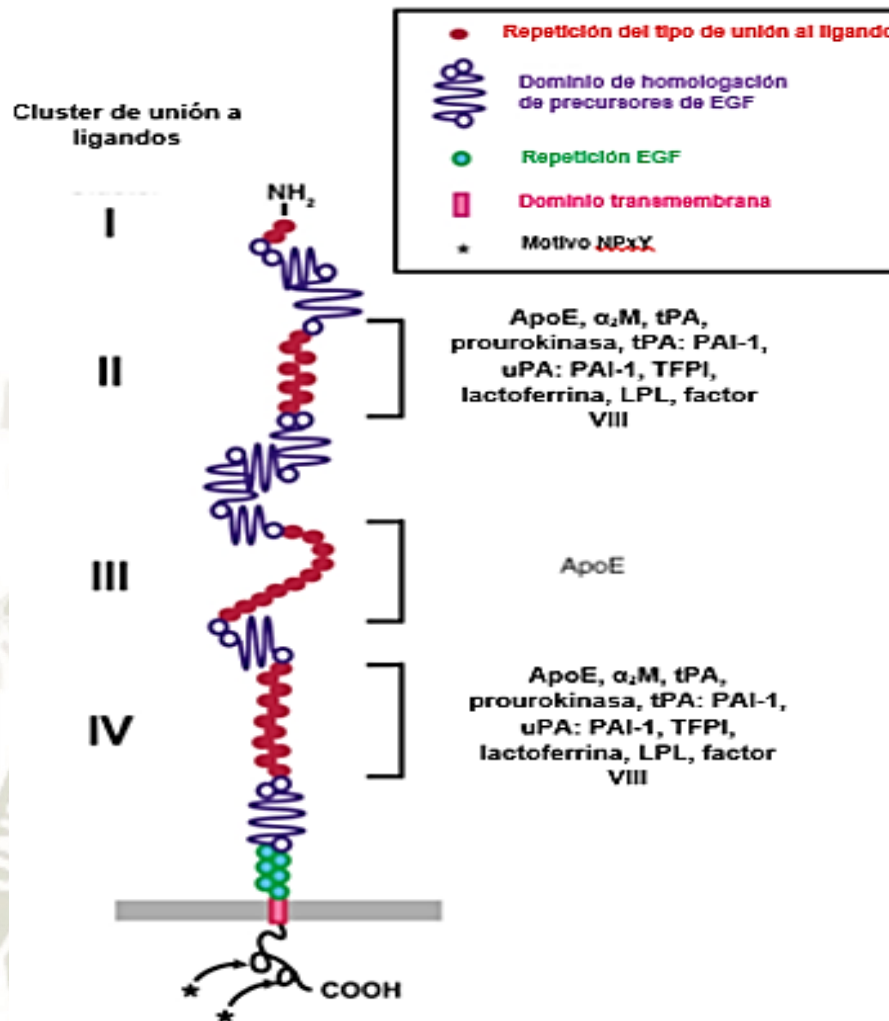


Figura 9: Unión de ligandos del LRP1¹⁰⁰

3.2. RELACIÓN CON EL ALZHEIMER

Si bien algunos estudios genéticos han sugerido que LRP1 está relacionado con EA y la angiopatía amiloide cerebral (CAA), otros han mostrado una asociación débil o nula. Estudios anteriores han demostrado que LRP1 y muchos de sus ligandos se depositan en placas seniles.¹⁰³ Además de regular el aclaramiento de A β del cerebro, se ha demostrado que el dominio C-terminal citoplásmico de LRP1 interactúa con el dominio citoplásmico de APP (proteína precursora de A β) mediante FE65, una proteína adaptadora de LRP1, que a su vez influye en el procesamiento de APP y la generación de A β .¹⁰⁴ También se ha demostrado que LRP1 en neuronas media la captación celular de A β y posiblemente la retención en el cerebro a través de sus ligandos α 2M y apoE.¹⁰⁵

Se ha informado que el receptor 1 ligado a la lipoproteína de baja densidad (LRP1) de la célula está implicada no solo en la endocitosis A β y la degradación cerebral, sino también en la transcitosis A β a través del endotelio cerebral y la posterior eliminación sistémica a través del hígado, bazo y riñones.¹⁰⁶

Además, estudios demostraron que la expresión de LRP1 se reduce en personas mayores y aún más en personas con EA.¹⁰⁹ Estudios recientes sugieren que el transporte a través de la BHE es una ruta de eliminación importante para la A β cerebral.^{107, 108}

LRP1 fisiológicamente existe en dos formas: una forma unida a la superficie celular (LRP1) y una forma soluble truncada (sLRP1, Figura 10). La LRP1 unida a la superficie está compuesta por dos subunidades que incluyen una cadena α extracelular (515 kDa) y una cadena β (85 kDa) que contiene una extensión extracelular corta, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular de 100 aminoácidos.^{109, 111}

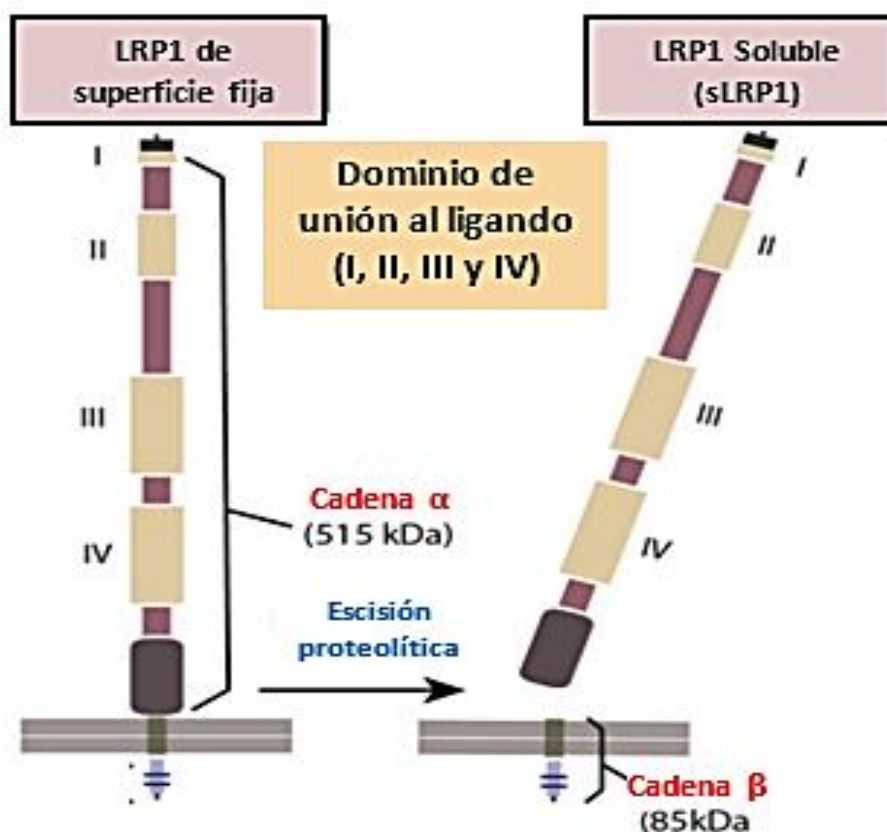


Figura 10: Estructura del LRP-1¹⁰⁹

El dominio extracelular o ectodominio de LRP1 liberado después del desprendimiento es sLRP1, como se describió anteriormente. La forma soluble truncada de LRP1 circula libremente en el plasma y secuestra el A β no unido en la periferia. sLRP1 también es detectable en el fluido cerebroespinal.¹⁰⁹

El papel multisitio del receptor clave de unión a A β , LRP1, ayuda a eliminar el A β sistémico en un mecanismo de eliminación en serie de tres pasos.¹¹¹ (Figura 11)

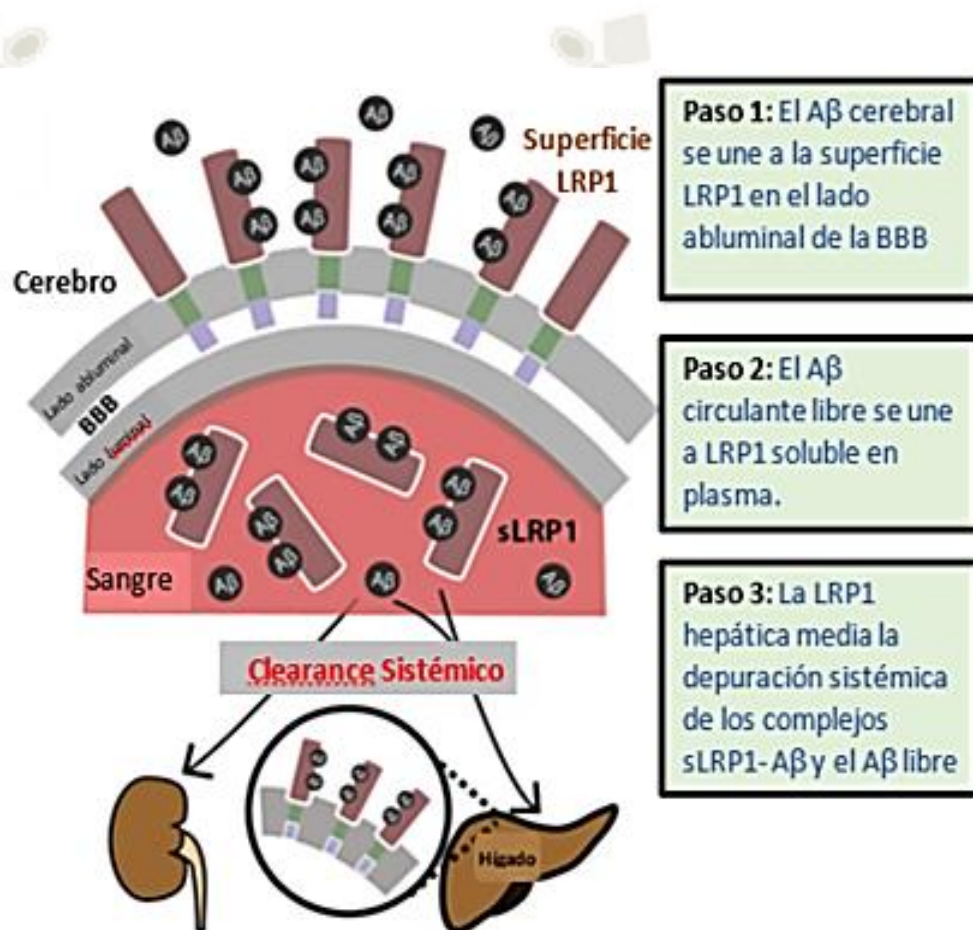


Figura 11: Pasos de la eliminación de A β mediada por LRP1 del cerebro¹⁰⁹

Paso 1 (BBB). En el sitio de la BHE, la superficie LRP1 se expresa en la membrana endotelial que mira al cerebro (abluminal). Esta LRP1 unida a la membrana se une a A β cerebral e inicia rápidamente su eliminación en el lado de la sangre (luminal). El A β radiomarcado y no marcado administrado por vía intracerebral ha aparecido intacto en el plasma, indicando el flujo de salida de A β del cerebro por la LRP1 cerebrovascular.¹¹²

Paso 2 (Plasma). sLRP1 en la periferia contribuye al clearance de A β secuestrando A β libre en circulación. La coimmunoprecipitación de A β unido a sLRP1 en seres humanos neurológicamente normales ha indicado que sLRP1 circulante puede secuestrar 70-90% de A β plasmático, impulsando así el gradiente A β a favor del flujo de salida a través de la BBB. Este A β periférico endógeno creado por sLRP1 promueve la eliminación de A β del cerebro a la circulación.^{113,114}

Paso 3 (Hígado). LRP1 se identificó por primera vez en el hígado, y en el sitio hepático, es responsable de unirse y eliminar A β del sistema. Además del hígado, los complejos sLRP1-A β también se eliminan por el riñón y el bazo.¹¹⁵

4. ANTAGONISTA DEL PPAR γ (T0070907)

La droga T0070907 (Figura 12), usada para investigaciones, a una concentración mayor a 10 μ M es un antagonista específico del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR γ).¹¹⁶

El PPAR γ forma parte de la subfamilia metabólica de receptores nucleares, con una función principal de la diferenciación de los adipocitos, síntesis de triglicéridos y atrapamiento de ácidos grasos.¹¹⁷

En un estudio *in-vitro* se demuestra que la expresión del receptor LRP es regulado por la activación del PPAR γ .¹¹⁸ mientras que en otro estudio se demostró que el uso de la Rosiglitazona (activador del PPAR γ) en células hepáticas aumentan los niveles de expresión del LRP-1.¹¹⁹

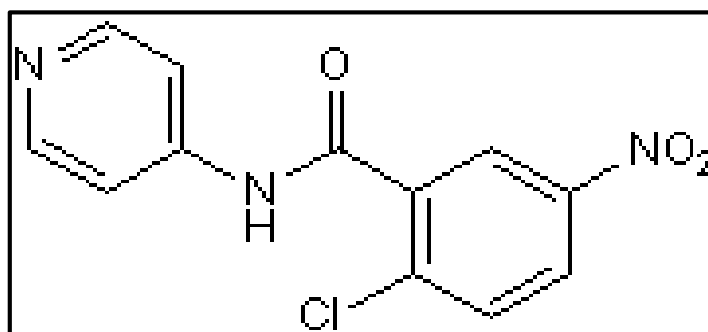


Figura 12: Estructura del T0070907¹⁴⁴

5. BAFILOMICINA A1

La autofagia un proceso de degradación de proteínas intracelular, mediante el cual la célula puede degradar y reciclar componentes citoplasmáticos dentro de los lisosomas, formando así una homeostasis. La fusión de autofagosomas-lisosomas y la acidificación de autolisosomas constituyen etapas tardías en el proceso autofágico necesario para mantener el flujo autofágico funcional y la homeostasis celular.¹²⁰ Ambos pasos son interrumpidos por el inhibidor de V-ATPasa (Bafilomicina A1) (Figura 13), pero los mecanismos que potencialmente los vinculan no son claros.¹²¹

Investigaciones realizadas en los laboratorios del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences se demostró que la Bafilomicina A1 regula los niveles de LRP-1, vía inhibición de la Autofagia. (Rondon Ortiz, 2017)

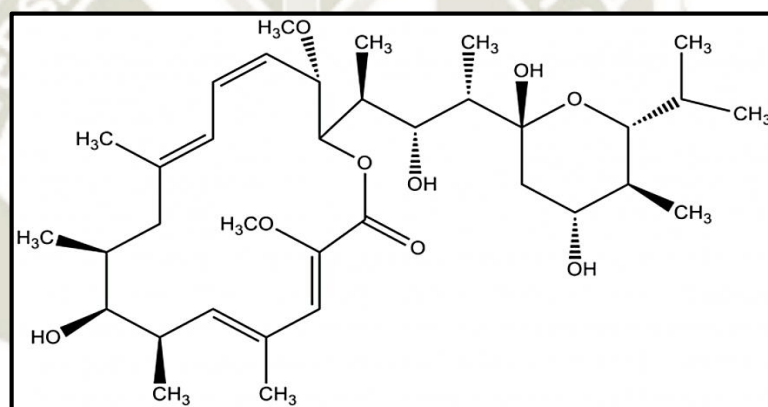


Figura 13: Estructura de la Bafilomicina A1¹⁴⁵

6. ENSAYOS EN LÍNEAS CELULARES

6.1. WESTERN BLOT

La transferencia Western (también denominada inmunotransferencia, porque se usa un anticuerpo para detectar específicamente su antígeno) fue introducida por Towbin et al. En 1979 y ahora es una técnica rutinaria para el análisis de proteínas.¹²² En esta técnica se separan proteínas basándose en el peso molecular, mediante electroforesis en gel. (Figura 14) Estos resultados se transfieren entonces a una membrana que produce una banda para cada proteína. La membrana se incuba entonces con marcadores anticuerpos específicos de la proteína de interés.¹²³

La especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno permite identificar una proteína diana en el medio de una mezcla de proteínas complejas. Western blotting puede producir datos cualitativos y semi-cuantitativos sobre la proteína de interés.¹²⁴

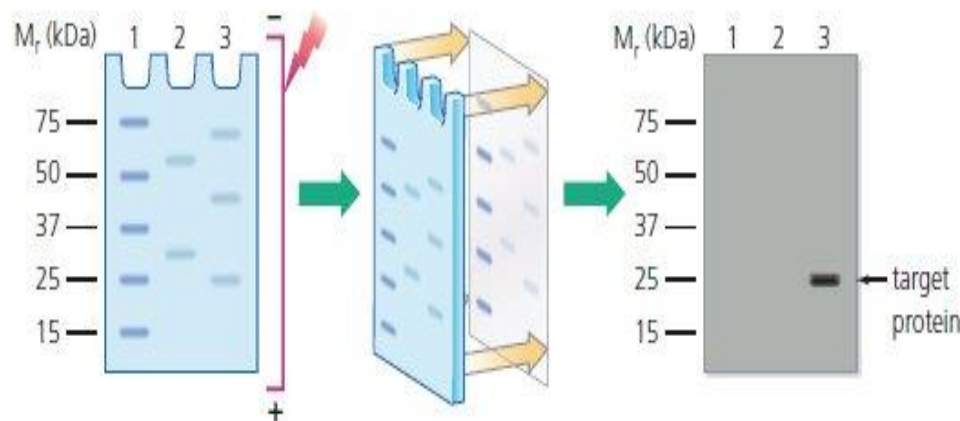
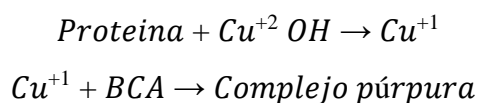


Figura 14: Corrida electroforética en Western Blot¹⁴⁶

6.2. BCA

El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto estable, soluble en agua capaz de formar un intenso complejo púrpura con iones cuprosos (Cu^{1+}) en un ambiente alcalino. Este reactivo constituye la base de un método analítico capaz de controlar el ion cuproso producido en la reacción de la proteína con Cu^{2+} alcalino (reacción de Biuret).¹²⁵

El ensayo BCA se basa principalmente en dos reacciones. Primero, los enlaces peptídicos en la proteína reducen los iones Cu^{+2} del sulfato de cobre (II) a Cu^{+1} (una reacción dependiente de la temperatura). La cantidad de Cu^{+2} reducida es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución. A continuación, dos moléculas de ácido bicinconínico se quelan con cada ion Cu^{+1} , formando un complejo de color púrpura que absorbe fuertemente la luz a una longitud de onda de 562 nm¹²⁵



El color producido a partir de esta reacción es estable y aumenta de manera proporcional en una amplia gama de concentraciones de proteína en aumento.¹²⁵

6.3. INMUNOCITOQUÍMICA

Las técnicas de tinción inmunocitoquímica son comúnmente empleadas por los investigadores en muchos campos de investigación y, en los últimos años, han encontrado su camino en el laboratorio de diagnóstico.¹²⁶ La técnica de inmunocitoquímica se utiliza en la búsqueda de antígenos celulares que van desde aminoácidos y proteínas hasta agentes infecciosos. La técnica comprende dos fases: preparación de slides (fijación de muestras y procesamiento) y etapas evolucionadas para la reacción (en orden: recuperación de antígenos, bloqueo de sitio no específico, bloqueo de peroxidasa endógena, incubación primaria de anticuerpos y empleo de sistemas de detección).¹²⁷ Los métodos de tinción inmunohistoquímica incluyen el uso de anticuerpos marcados con fluoróforo (inmunofluorescencia) y marcados con enzima (inmunoperoxidasa) para identificar proteínas y otras moléculas.¹²⁸

6.4. ELISA

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es ampliamente utilizados como herramientas de diagnóstico en medicina y como medida de control de calidad en diversas industrias; También se utiliza como instrumentos analíticos en la investigación biomédica para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra dada.¹²⁹ ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) es una técnica de ensayo basada en placas diseñada para detectar y cuantificar sustancias tales como péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. En ELISA, un antígeno debe inmovilizarse en una superficie sólida y luego complejarse con un anticuerpo que está unido a una enzima.¹³⁰ La detección se lleva a cabo evaluando la actividad de la enzima conjugada mediante incubación con un sustrato para producir un producto medible. El elemento más crucial de la estrategia de detección es una interacción anticuerpo-antígeno altamente específica.¹³¹



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1. LÍNEA CELULAR HEP-G2

Se utilizó la línea celular Hep-G2 (pasaje 21) adquirida en American Type Culture Collection (ATCC[®], Virginia, EEUU), las cuales fueron proporcionadas por el Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University (MCPHS) e incubadas (VWR[®] symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubators, Models 5.3A and 8.5A) a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂, ubicadas en los laboratorios de farmacología del MCPHS, Boston.

A partir de este pasaje se realizó un nuevo cultivo (pasaje 22), en medio de cultivo Minimum Essential Medium (MEM) Alpha (1X) (GIBCO[®]) para su proliferación y posterior uso.

1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

1.2.1. EQUIPOS

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se utilizaron los siguientes equipos de laboratorio: cabina de seguridad biológica clase 2, tipo A2 (SterilGARD[®], BAKER), contador de viabilidad celular (Nexcelom Bioscience[®] Auto T4), incubadoras de CO₂ (VWR Symphony), centrifugadora (DYNAC III, Clay Adams™), incubadora (VWR™), lector multimodal de microplacas (Synergy HT- BioTek[®]), incubadora de baño seco de la casa Fisher Scientific, cámara de electroforesis (Mini-protean Tetra Cell, BIO-RAD), escáner para Western Blot (Licor c-DiGit[®]), sistema de transferencia (BIO-RAD Trans-Blot[®] Turbo™), microscopio de foco invertido de la casa OLYMPUS CKX31 Japan, micro centrifugador (VWR[®]), sonicador (Symphoni™), vortex (Genie 2, Fisher Scientific), microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600), iluminador de fibra pre-

centrado motorizado (INTENSILIGHTC-HGFIE), refrigerador de la casa Energy Star® a -20°C, refrigerador de la casa REVCO™ a -80° C.

1.2.2. REACTIVOS

Los reactivos utilizados fueron: péptido FAM- $A\beta_{1-42}$ del laboratorio ANASPEC; 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, dimetil sulfóxido (DMSO) fueron obtenidos del laboratorio Sigma-Aldrich®, como medio de cultivo Minimum Essential Medium (MEM) Alpha (1X) (GIBCO®), tripsina/EDTA (0.25%tripsina/0.53mM EDTA), buffer fosfato salino (PBS 1X), penicilina/estreptomicina (1%), suero bovino fetal (FBS), Alcohol 70%, fueron obtenidos de ATCC®. Para el conteo celular se utilizó la solución Azul de Tripán (Sigma-Aldrich®).

Las drogas utilizadas fueron: antagonista específico del receptor (PPAR γ) T0070907 y bafilomicina A1 (Tocris Bioscience).

Para el proceso de lisis celular se empleó el reactivo de extracción de proteínas de mamífero (M-PER), cocktail de inhibidores, EDTA (Thermo Scientific™).

En la cuantificación de proteínas se utilizó kit de ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Fisher Scientific™).

Para el ensayo de Western-Blot: buffer-SDS 4X (BioProducts®), tampón de electroforesis (Tris-Glicina/SDS 10X), tampón de transferencia, marcador (PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder) obtenidos de Thermo Scientific™, anticuerpo monoclonal de conejo LRP-1 (Rabbit mAb anti LRP-1[EPR3724] (ab92544), ABCam®), TBS-Tween 20X (Thermo Scientific™), anticuerpo policlonal de conejo (Goat pAb to rabbit IgG HRP (ab97069), ABCam®), substrato químico luminiscente (Thermo Fisher Scientific®), anticuerpo de β -actina (Anti-beta Actin antibody [AC15] (HRP) (ab49900), ABCam®).

En el Ensayo inmunocitoquímica (ICC): para-formaldehído 4% (PFA) (Sigma-Aldrich®), metanol (MeOH) (Fisher Scientific®), DAPI (Prolong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI) de la casa Life Technologies Corporation y el Kit de Ensayo ELISA (Human AB42 – NOVEX® Life Technologies Corporation).

1.2.3. MATERIAL

Frascos de cultivo celular (25, 75mL), probetas (50, 100mL), tubos de centrifugación y micro centrifugación, pipetas, micro pipetas, multi-pipetas, micro-placas de 96 pocillos, leche en polvo al 5% (BioProducts®), gel SDS-PAGE 7.5%, membrana de nitrocelulosa 0.45 μ m, almohadillas de soporte, papel filtro de Western-Blot de la casa Thermo Fisher Scientific®.

1.3. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacología en *Massachusetts College Pharmacy and Health Sciences University*, Boston, EEUU.

2. MÉTODOS

2.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL PÉPTIDO 5 (6) – CARBOXIFLUORESCÉINA (FAM)-*Beta Amiloide*₁₋₄₂ (*A β* ₁₋₄₂)

El péptido FAM-*A β* ₁₋₄₂ se obtuvo del laboratorio ANASPEC (Figura 15). El contenido del frasco (0.5mg de FAM-*A β* ₁₋₄₂), se reconstituyó con 1030 μ L de 1, 1, 1, 3, 3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), para una mejor disolución del péptido se usó el sonicador (Symphoni™) por 5 minutos. Esta solución se separó en alícuotas de 60 μ L, el solvente se evaporó a sequedad en un equipo de evaporación rotatorio (XCELVAP) bajo las siguientes condiciones: 60 psi de nitrógeno, 3-7 psi (presión de liberación de nitrógeno del equipo), 38°C por 30 minutos. Después de este proceso se obtuvo alícuotas de 6nmol de péptido seco, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para determinar la concentración de FAM-*A β* ₁₋₄₂ más adecuada para trabajar, nos basamos en una investigación anterior, en la cual se comparó dos diferentes tipos de Buffer para lisis celular y diferentes concentraciones de péptido (Mamani Apaza, Cruz Torres, Jakowenko¹³²), en base a ello se decidió trabajar a una concentración de 1000nM de péptido y emplear para la lisis celular el buffer de reactivo de Extracción de Proteína de Mamíferos (M-PER).

Para la preparación del péptido a una concentración de 1000nM, la alícuota de 6nmol se reconstituyó con 5 μ L de dimetilsulfoxido 100% (DMSO) y 995 μ L de Minimum Essential Medium (MEM) Bajo Alpha 1X (MBS) (conteniendo suero fetal bovino 1% y penicilina-estreptomicina 1%) para obtener 6000nM de péptido, a partir de esta concentración se realizó una dilución para obtener 1000nM de FAM- $A\beta_{1-42}$.

Asimismo, la concentración final de DMSO fue 0.5%, debido a que concentraciones altas a esta son citotóxicas causando alteraciones en los resultados.

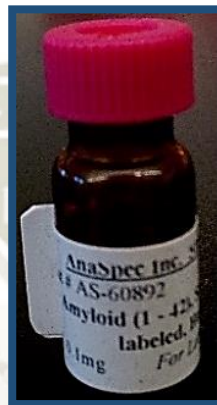


Figura 15: Péptido FAM-Beta Amiloide 1-42

2.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL SCRAMBLED FAM- *Beta* *Amiloide*₁₋₄₂

El Scrambled FAM- $A\beta_{1-42}$, se adquirió del laboratorio ANASPEC, es un péptido con los mismos aminoácidos que el FAM- $A\beta_{1-42}$ pero ubicados en diferente orden. El frasco ámbar en el que vino contenía 0.1mg de FAM- $A\beta_{1-42}$ el cual se reconstituyó con 820 μ L de HFIP, se usó el sonicador (SymphoniTM) por 5 minutos para una mejor disolución del péptido. Al igual que en la preparación anterior, se separó la solución en alícuotas de 60 μ L y se evaporó el solvente a sequedad en un equipo de evaporación rotatorio (XCELVAP) (Figura 16). Obteniendo 1.5nmol de péptido seco en cada alícuota.

Para la preparación del péptido a una concentración de 1000nM se reconstituyó con 5 μ L de DMSO y 995 μ L de MBS para obtener 1500nM de péptido. A partir de ello se preparó el Scrambled FAM- $A\beta_{1-42}$ 1000nM.

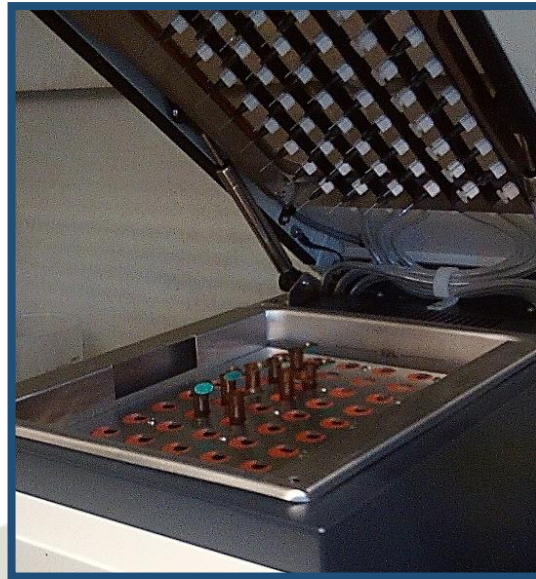


Figura 16: Equipo de evaporación rotatorio XCELVAP

2.3. CULTIVO CELULAR

El proceso de cultivo celular se trabajó en una campana de flujo laminar en condiciones asépticas (Alcohol 70%) para inhibir el crecimiento y proliferación microbiana.

Las células hepáticas (HepG2) se recibieron en el pasaje 21 y a partir de este pasaje se generó uno nuevo; para lo cual, en la cabina de flujo, se desechó el medio de cultivo del frasco en un recipiente aséptico y seguidamente con movimiento ligero se enjuagó 2 veces por un minuto con buffer fosfato salino estéril 1X (PBS) a 37°C, el cual se desechó.

Luego, se agregó 5mL de Tripsina-EDTA (0.25% tripsina/0.53mM EDTA) y se llevó a incubación por 7 minutos a 37°C con 5% de CO₂, para desprender las células adheridas a la base del frasco de cultivo. Posteriormente, el frasco se retiró de la incubadora y se le dió un ligero golpe para desprender el total de las células. Al estar las células desprendidas se agregó 10mL de MEM libre de suero (MLS) (conteniendo Penicilina/Estreptomicina 1%) para detener la reacción de la tripsina. Esta solución se trasladó a un tubo falcon de 50mL y se llevó a centrifugación a 1000rpm por 5 minutos, el sobrenadante se decantó, obteniendo un pellet celular (Figura 17).

El pellet se resuspendió con 1ml de MEM completo (MC) (conteniendo suero fetal bovino 10% y penicilina-estreptomicina 1%) y a partir de esta suspensión se realizó el conteo celular y un nuevo pasaje de acuerdo a la cantidad de células contadas.

Para el nuevo pasaje se llevaron las células a un frasco de incubación de 75mL, agregándole 15 ml de MC e incubadas con 37°C con 5% de CO₂.

Para tener un crecimiento óptimo de las células, se cambió el medio de cultivo con MC fresco cada 3 días, con el fin de evitar la disminución de nutrientes y muerte celular, evidenciándose esta con la flotación de las células.



Figura 17: Pellet de células HepG2

2.4. CONTEO CELULAR

El conteo celular es necesario para establecer una cantidad homogénea al momento de sembrar en placas y realizar un nuevo pasaje. En el cual se debe tener como mínimo un 90% de células viables.

Para la realización de este ensayo, se usó el método de Azul de Tripan, que principalmente se basa en la tinción de células muertas de color azul, diferenciándola de células vivas que son las que no están teñidas, las cuales son las contadas.

Este ensayo se empezó a partir de la suspensión de células que se realizó al momento de hacer un nuevo pasaje, para lo cual se mezcló 50µL de la suspensión

con 50µL de Azul de Tripan en un tubo eppendorf de 1mL; de esta suspensión, previamente homogenizada, se tomó 20 µL y se llevó a una cámara de conteo de viabilidad celular (Cellometer Auto T4) (Figura 18) programado previamente.

Finalmente, el equipo nos brindó la cantidad de células y la viabilidad celular, y a partir de ello se realizó nuevos pasajes celulares y sembrados de células en placas (6 y 12 pocillos) con una cantidad homogénea en cada pocillo.



Figura 18: Equipo de conteo de viabilidad celular

2.5. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LRP-1 EN CÉLULAS Hep-G2.

Para realizar la validación de la expresión de LRP-1 en células Hep-G2 primero se realizó un cultivo celular en 2 placas de 6 pocillos (Figura 19), a una concentración de 5×10^5 células / 2mL. Para obtener esta concentración en cada uno de los pocillos, a partir del conteo de células, se realizó una ecuación de dilución:

Ecuación 1:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$1.365 \cdot 10^7 \text{ células} \cdot X \text{ mL} = \frac{500000 \text{ células}}{2 \text{ mL}} \cdot 30 \text{ mL}$$

$$X = 0.549 \text{ mL}$$

$$x = 549 \mu\text{L}$$

C₁: concentración de células viables en el pasaje celular.

V₁: volumen requerido para alcanzar la nueva concentración.

C₂: concentración de células del cultivo celular nuevo.

V₂: volumen de la nueva concentración.

Este volumen se agregó en un tubo falcon y el volumen restante se completó con MC. La solución se homogenizó y se distribuyó en las placas (2mL por pocillo). Para una homogenización se movió la placa en forma de 8 para evitar acumulación de células en el centro del pocillo. Luego se llevó a incubación con 37°C con 5% de CO₂.

Después de alcanzar ~ 80% de confluencia (después de 48h de incubación), cambiamos de medio a MEM con bajo suero (MBS) para la adaptación de células y disminución de su proliferación. Seguidamente se llevó a incubación por 24h, y luego se procedió a realizar la lisis celular para la determinación de la expresión de LRP-1 en células Hep-G2

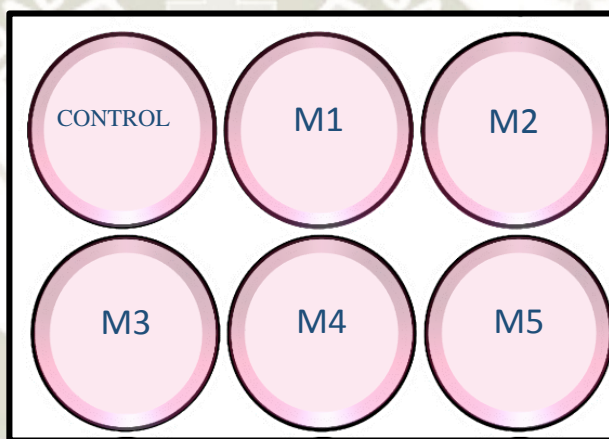


Figura 19: Validación de la expresión de células HepG2

M1, M2, M3, M4, M5: Células HepG2 normales

2.6. PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE SOLUCIONES PARA TRATAMIENTO CELULAR: T0070907 Y BAFILOMICINA A1

2.6.1. PREPARACIÓN DE T0070907

La droga T0070907, a una concentración de 4mM en DMSO al 100%, fue proporcionada por el MCPHS, Boston.

Basándonos en el trabajo realizado por Rondón Ortiz ¹³³, MCPHS (2018), se decidió trabajar a una concentración de 10µM de T0070907. Para la obtención de esta concentración se debe de tener en cuenta también la

concentración de DMSO, la cual debe ser menor o igual a 0.5%, debido a su citotoxicidad.

Para obtener esta concentración se realizó las siguientes ecuaciones de dilución:

Ecuación 2:

$$\begin{aligned}C_1.V_1 &= C_2.V_2 \\4000\mu M.XmL &= 10\mu M.14000\mu L \\X &= 35\mu L\end{aligned}$$

Ecuación 3:

$$\begin{aligned}\frac{35mL}{14000mL}.100 &= \%DMSO \\0.25\% &= \%DMSO\end{aligned}$$

C₁: concentración del T0070907.

V₁: volumen de la concentración del T0070907.

C₂: concentración nueva del T0070907.

V₂: volumen de la nueva concentración.

Por lo que 35µL de T0070907 4mM se colocaron en un tubo falcon y el volumen restante se completó con MBS, para así tener 10µM de T0070907 en 0.25% de DMSO.

Para el grupo control, se agregó 35 µL de DMSO al 100% en un tubo falcon y se completó el volumen con MBS, teniendo al final una concentración de 0.25% de DMSO.

2.6.2. PREPARACIÓN DE BAFILOCINA A1

Al igual que la droga T0070907, la Bafilomicina A1, con una concentración de 4µM en 100% de DMSO, fue proporcionada por MCPHS.

La preparación de esta droga fue similar a la del T0070907, pero en este caso se preparó una concentración de 20nM, que luego se diluirá a 10nM al momento del tratamiento de las células.

Para obtener esta concentración se realizó las siguientes ecuaciones de dilución:

Ecuación 4:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$
$$4000nM.XmL = 20nM.10000\mu L$$
$$X = 50\mu L$$

Ecuación 5:

$$\frac{50mL}{10000ML} \cdot 100 = \%DMSO$$
$$0.5\% = \%DMSO$$

C₁: concentración de la Bafilomicina A1.

V₁: volumen de la concentración de la Bafilomicina A1.

C₂: concentración nueva de la Bafilomicina A1.

V₂: volumen de la nueva concentración.

Por lo que 50 μ L de Bafilomicina A1 4 μ M se colocaron en un tubo falcon y el volumen restante se completó con MBS, para así tener 20nM de Bafilomicina A1 en 0.5% de DMSO.

Para el grupo control, se agregó 50 μ L de DMSO al 100% en un tubo falcon y se completó el volumen con MBS, teniendo al final una concentración de 0.5% de DMSO

2.6.3. ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO (T0070907) SOBRE LAS CÉLULAS Hep-G2 (función sobre el LRP-1).

En este experimento se evaluó la función del T0070907 (antagonista del PPAR γ), sobre el receptor LPR-1 en células HepG2.

Para ello, se realizó un cultivo celular en 2 placas de 6 pocillos con una concentración 5 x 10⁵ células/mL, las placas se dividieron a la mitad para evaluar un control en cada una de ellas (Figura 20). Trascurrido las 48h de incubación se cambió de medio con MBS, para adaptar y disminuir el crecimiento de las células.

A las 24 horas de incubación se eliminó el medio de cultivo de las placas y se añadió 1mL de T0070907 10 μ M (0.25% DMSO) a cada pocillo. Se homogenizó cuidadosamente y se dejó la placa en incubación con 37°C con 5% de CO₂ por 24h.

Con respecto a grupo control solo se agregó MBS con 0.25% de DMSO.

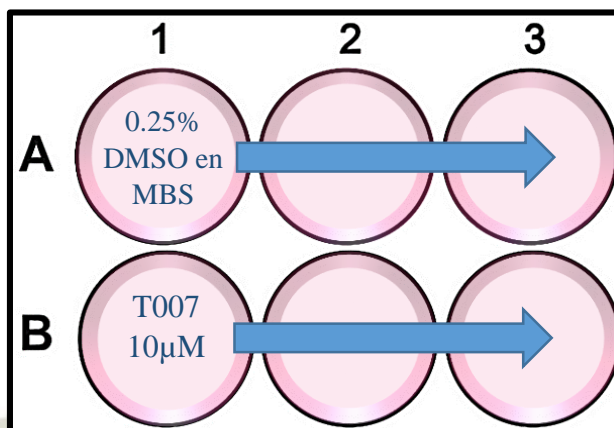


Figura 20: Administración de T0070907 en células HepG2.

A: células control. B: células tratadas con T0070907

2.6.4. ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO (T0070907) SOBRE LAS CÉLULAS Hep-G2 PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE $A\beta_{1-42}$ A DIFERENTES TIEMPOS.

Para este proceso se realizó el cultivo celular en 6 placas de 12 pocillos (Figura 21) con una concentración de $12,5 \times 10^4$ células / mL, cada placa se rotuló como 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h y 6h respectivamente.

Para añadir el tratamiento a cada placa se realizó el mismo procedimiento especificado en el punto 2.6.3 de este capítulo, posteriormente las placas se incubaron por 24h a 37°C con 5% de CO₂.



Figura 21: Placa de 12 pocillos para sembrado se células¹⁴⁷

Cada una de las placas se dividieron en 2, para tener un control en cada una de ellas (Figura 22), a las cuales solo se les añadió MBS con 0.25% de DMSO.

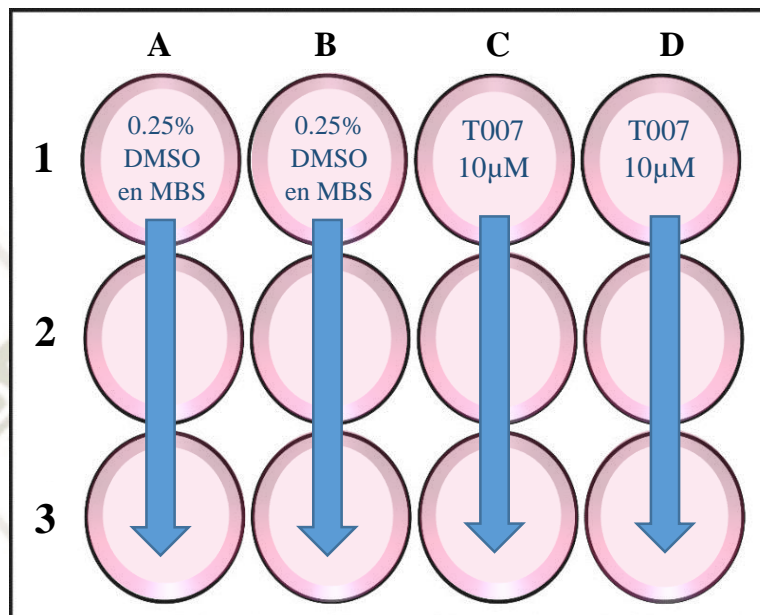


Figura 22: Administración de T0070907 en células HepG2 a diferentes tiempos.

A y B: células control. C y D: células tratadas con T0070907.

2.6.5. ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO (BAFILOMICINA A1) SOBRE LAS CÉLULAS Hep-G2 (Ensayo Inmunocitoquímica (ICC))

En este ensayo se sembró en una placa para inmunocitoquímica, la placa tiene 8 pocillos en forma cuadrangular cada una (Figura 23), en la cual se sembraron células Hep-G2 a una concentración de 2×10^4 células/pozo en 400µL de MBS. Se sembró en MBS para que el crecimiento y proliferación de las células sea lento, debido a que en este ensayo se necesitan pocas células.

Para obtener una buena distribución de las células se resuspendió cuidadosamente al menos 10 veces.

Luego se llevó la placa a incubación por 24h a 37°C con 5% de CO₂.

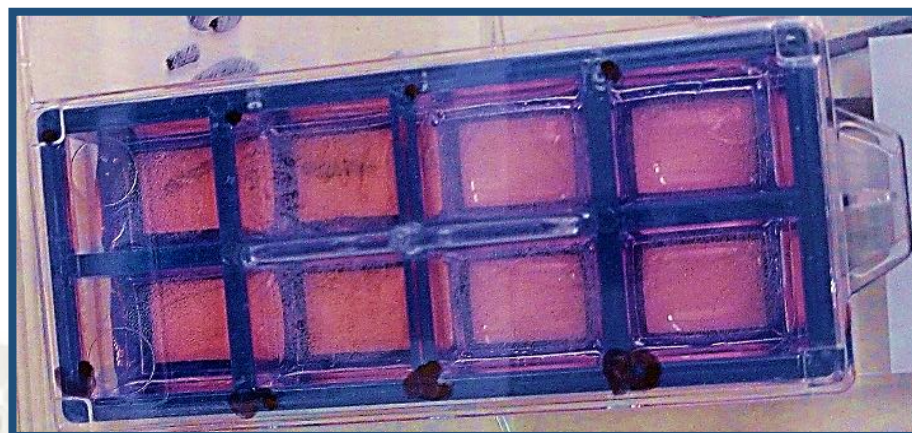


Figura 23: Placa para inmunocitoquímica

Al cumplirse las 24h, se procedió a administrar el tratamiento con Bafilomicina A1 a las células de los dos últimos pocillos, para lo cual, primero se eliminó el MBS de toda la placa, luego se agregó MBS a los 3 primeros pares de pocillos y a los dos últimos se agregó 200 μ L de Bafilomicina A1 a una concentración de 20nM (Figura 24). Finalmente, la placa se llevó a incubación a 37°C con 5% de CO₂ por 3h.

	A	B	C	D
1	0.5% DMSO en MBS	0.5% DMSO en MBS	0.5% DMSO en MBS	BAF 20nM
2	0.5% DMSO en MBS	0.5% DMSO en MBS	0.5% DMSO en MBS	BAF 20nM

Figura 24: Administración de Bafilomicina A1 en células HepG2.

A, B y C: células con MBS. D: células tratadas con Bafilomicina A1.

2.7. ADICIÓN DEL FAM- $A\beta_{1-42}$.

Luego del tratamiento a las células, se procedió a administrar el péptido FAM- $A\beta_{1-42}$. Anteriormente preparamos dicho péptido, que estaba a una concentración de 6000nM y a partir de esta solución stock se procedió a preparar la concentración de 1000nM.

2.7.1. ADICIÓN DEL FAM- $A\beta_{1-42}$ A LAS CÉLULAS TRATADAS CON T0070907.

Las células tratadas con T0070907 en placas de 12 pocillos, rotuladas como 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h y 6h, estaban en incubación por 24h.

Previo a la adición del péptido, media hora antes de que se cumpla el tiempo de incubación, se procedió a la preparación de 25mL de FAM- $A\beta_{1-42}$ a una concentración de 1000nM a partir de la alícuota de 6000nM.

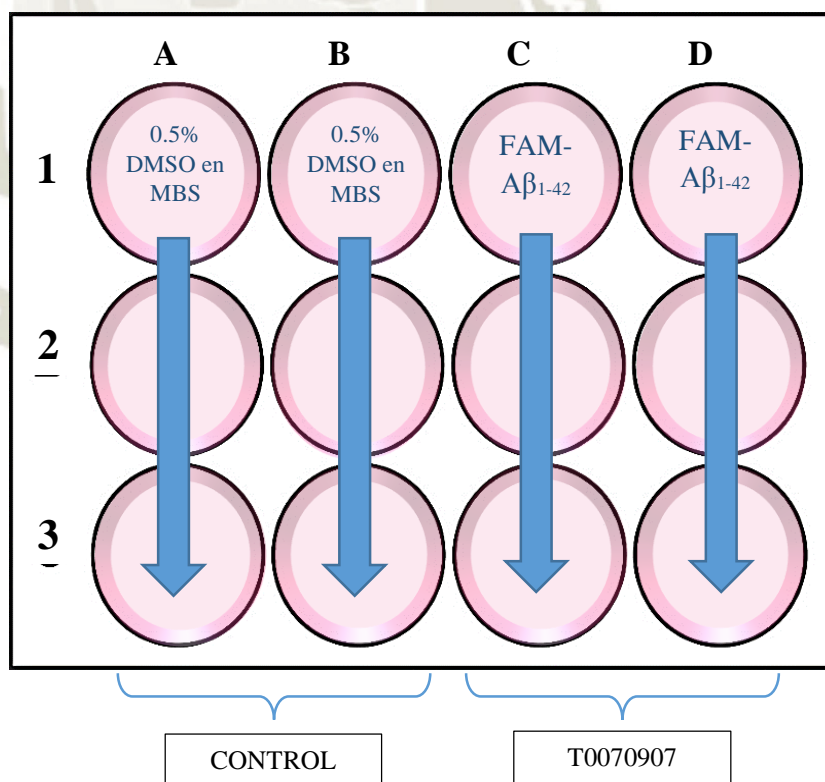


Figura 25: Administración de $A\beta_{1-42}$ en células HepG2 tratadas con T0070907

Al cumplirse el tiempo de 24h, se procedió a eliminar el medio de las placas y luego cuidadosamente se añadió 1mL de péptido a cada pocillo de las 6 placas. Por último, se dejaron en incubación de acuerdo al tiempo correspondiente para cada placa.

A la placa de 0h no se le agregó el péptido y de frente se procedió a su lisis celular, la cual también sirvió como un grupo control.

A los pocillos de cada placa que son los grupos control solo se añadió 1mL de MBS con 0.5% de DMSO. (Figura 25)

2.7.2. ADICIÓN DE FAM- $A\beta_{1-42}$ A LAS CÉLULAS TRATADAS CON BAFILOMICINA A1. (ICC)

Luego del tratamiento de las células en la placa para ICC, se procedió a agregar el péptido FAM- $A\beta_{1-42}$, para ello, media hora antes de ser administrada a las células se preparó el péptido a una concentración de 2000nM a partir de la alícuota de 6000nM.

En este ensayo no se eliminó el MBS ni la Bafilomicina de los pocillos, para no causar estrés a las células y diluir la concentración de péptido y Bafilomicina.

A los pocillos control se agregó 200 μ L de 0.5% de DMSO en MBS, a los dos siguientes se agregaron 200 μ L de scrambled de 2000nM, a los otros dos se añadieron 200 μ L de FAM- $A\beta_{1-42}$ de 2000nM y a los pocillos que se administró Bafilomicina A1, se agregaron 200 μ L de péptido de 2000nM (en la Figura 26 podemos ver el esquema de trabajo). Al finalizar se obtuvo una concentración final de 1000nM de péptido y 10nM de Bafilomicina A1.

Posteriormente dejamos la placa en incubación por una hora para luego preparar a las células que serán vistas y fotografiadas por el microscopio de Fluorescencia.

	Control	Scrambled	FAM-A β ₁₋₄₂	BAF+A β ₁₋₄₂
1	0.5% DMSO en MBS	Scrambled	FAM- A β ₁₋₄₂	FAM- A β ₁₋₄₂
2	0.5% DMSO en MBS	Scrambled	FAM- A β ₁₋₄₂	FAM- A β ₁₋₄₂

Figura 26: Administración de Scrambled-A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₂ a células HepG2

2.8. EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD DEL LRP-1 CON EL SCRAMBLE

FAM-A β ₁₋₄₂.

El scrambled FAM-A β ₁₋₄₂, como se mencionó anteriormente, tiene la misma configuración del FAM-A β ₁₋₄₂ pero con la diferencia que este tiene un diferente orden de aminoácidos que lo componen. Por ello en este ensayo es usado para evaluar la especificidad del receptor LRP-1 para con el péptido A β ₁₋₄₂.

Para esta evaluación, primero se sembraron células en tres placas de 12 pocillos, de los cuales solo se usaron 9 (Figura 27), a una concentración de $12,5 \times 10^4$ células /mL. Al pasar 48h de haber sido incubadas se cambió el medio por MBS para adaptarlas por 24h.

Previo a la adición del Scrambled, media hora antes de pasar 24h de incubación, se procedió a la preparación de 10mL de Scrambled A β ₁₋₄₂ y péptido A β ₁₋₄₂ a una concentración de 1000nM cada una, a partir de las alícuotas de 1500nM y 6000nM respectivamente. Al pasar las 24h de incubación se procedió añadir el Scramble FAM-A β ₁₋₄₂, a tres pozos (1mL/pozo), FAM-A β ₁₋₄₂ a los siguientes tres pozos y la última fila se analizó como control a la cual solo se agregaron 0.5% de DMSO en MBS.

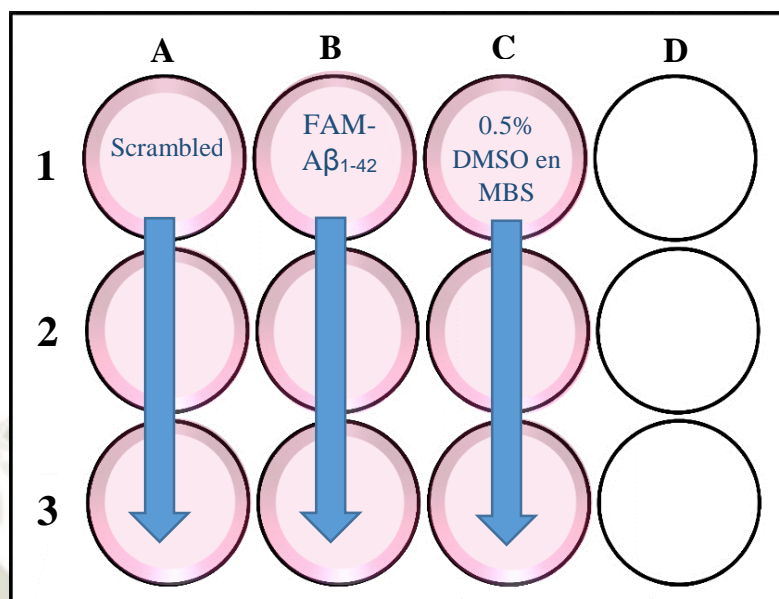


Figura 27: Administración de Scrambled- $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-42}$ a células HepG2.

A: células con Scrambled. B: células con FAM- $A\beta_{1-42}$. C: células control

2.9. LISIS CELULAR

La lisis celular se lleva a cabo con el fin de extraer las proteínas, ácidos nucleicos, etc. que se encuentran dentro de la célula, para posteriormente llevarlos a análisis. Existen diferentes métodos de lisis celular, pero el fundamento principal es el rompimiento de la capa bi-lipídica de la membrana celular.

En este proceso se usó el reactivo de extracción de proteínas de mamífero (M-PER) (Thermo Scientific), que contiene un detergente suave (patentado en tampón de bicina 25 mM (pH 7,6)) no desnaturizante capaz de extraer y solubilizar proteínas.

Para llevar a cabo este ensayo, primero se eliminó los medios de las placas sembradas y se lavaron las células con PBS frío tres veces. Luego, se añadió M-PER, que fue preparado previamente con EDTA e inhibidores de la proteasa, estos reactivos se añadieron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Al estar las células presentes con el Buffer se realizó el *scrapping* para desprenderlas del fondo de cada pocillo. Las células de cada pocillo se pusieron en tubos eppendorf que seguidamente se centrifugaron a 14000 r.p.m por 7 minutos, luego se separó el sobrenadante del pellet los que posteriormente fueron analizados.

2.9.1. EXTRACCIÓN DE LRP-1 DE LA MEMBRANA CELULAR.

Este es un proceso de lisis celular diferente, donde se separaron las proteínas de membrana de las proteínas del citosol. En el cual usamos el buffer de lisis MEM-PER, que está constituido por dos tipos de Buffers (Buffer 1° y 2°), donde el buffer 1° separa las proteínas del citosol y el Buffer 2° separa las proteínas de membrana. Para iniciar este proceso primero se prepararon los buffers, donde se mezcló 50 μ L de EDTA y 50 μ L de inhibidores con 5mL de buffer (esto se realizó para cada buffer por separado).

Se empezó raspando la placa para separar las células del fondo. El medio y las células se llevaron a un tubo falcon y se centrifugaron a 500 r.p.m por 5min, luego se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 3mL de la solución de lavado MEM-PER, esta solución se llevó a centrifugación a 1000 r.p.m por 10min.

Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 1mL de solución de lavado MEMPER y se llevó a un tubo eppendorf para ser centrifugado nuevamente a 1000r.p.m por 5min, luego se decantó el sobrenadante y se agregó 750 μ L del buffer 1° para resuspender el pellet, se mezcló bien y se llevó a incubación por 10min a 4°C.

Pasado este tiempo centrifugamos la suspensión a 1000r.p.m por 5min. El sobrenadante se separó y se guardó en otro tubo eppendorf, etiquetado como proteínas del citosol.

El pellet se resuspendió con 500 μ L del Buffer 2° y se incubó por 30min a 4°C. Luego, se centrifugó por última vez a 1000r.p.m por 5min y finalmente se separó las proteínas de membrana que estaban en el sobrenadante a un tubo eppendorf.

2.10. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LRP-1

2.10.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (BCA)

El proceso de cuantificación de proteínas, usando el ácido bicincinamico (BCA), se realizó previamente al realizar un Western Blot para poder calcular

la cantidad de volumen de muestra que se usara para la corrida electroforética, dependiendo de la concentración de proteínas totales presentes en las células.

2.10.1.1. CURVA DE CALIBRACION

En cada proceso realizamos una curva de calibración, para lo cual primero se preparó una solución stock de albumina de suero bovino a 2mg/mL diluido en Buffer de Fosfato Salino (PBS) 1X. A partir de esta solución stock se prepararon las soluciones estándares a diferentes concentraciones (0, 125, 250, 500, 1000 y 2000 μ g/mL) con las cuales se realizó la curva de calibración. Luego, estas soluciones se colocaron en una placa de 92 pocillos (20 μ L/pocillo).

Previo a la medición se preparó el reactivo de trabajo que conformaban dos soluciones (A y B) en una relación (50:1), esta solución se añadió a cada pocillo (200 μ L/pocillo) relación (1:100). La placa se incubó con movimiento leve por 30s a una temperatura de 37°C, para posteriormente realizar su lectura en el espectrómetro.

2.10.1.2. MUESTRA

Con el sobrenadante obtenido de la lisis celular, se prepararon soluciones diluidas con PBS 1X en una relación de o (1:10). Este proceso se realizó a las diferentes muestras tratadas y de control.

Al igual como con las soluciones estándares, se agregó 200 μ L del reactivo de trabajo a cada pocillo y se dejó en incubación y movimiento leve por 30s, para luego ser leídas por el espectrómetro.

En cada proceso se realizó la medida de la curva de calibración como la medida de las muestras.

2.10.2. WESTERN BLOT

A partir de la concentración de proteínas totales presentes en las células, obtenida en el BCA, se realizaron cálculos para hallar la cantidad de volumen

de muestra que se requiere para la preparación de la mezcla: muestra, PBS 1X y agente reductor (SDS) 4X, dando un volumen final de 100 μ L en un tubo eppendorf. Posteriormente se incubó la mezcla entre 95-97°C por 5 minutos para la desnaturalización de las proteínas.

2.10.2.1. ELECTROFORESIS

En la cámara de electroforesis (Figura 28) fue colocado el Gel SDS-PAGE 7.5% (Gel de poliacrilamida), a dicha cámara se vertió 500mL de Buffer de corrida 1X (Tris-Glicine SDS Buffer).

Luego de que las muestras estuvieran en incubación por 5 minutos se procedió a cargar de 40 a 50 μ L de mezcla en los pocillos del gel SDS-PAGE, de acuerdo a la concentración de proteínas que se obtuvo anteriormente. Conjuntamente con las mezclas, en un pocillo aparte, se colocó 5 μ L de marcador de peso molecular (LADDER). Cerramos la cámara con los electrodos correspondientes y se dejó correr las muestras a 125 V durante 50 minutos. Obteniéndose así la separación así las proteínas por su peso molecular.

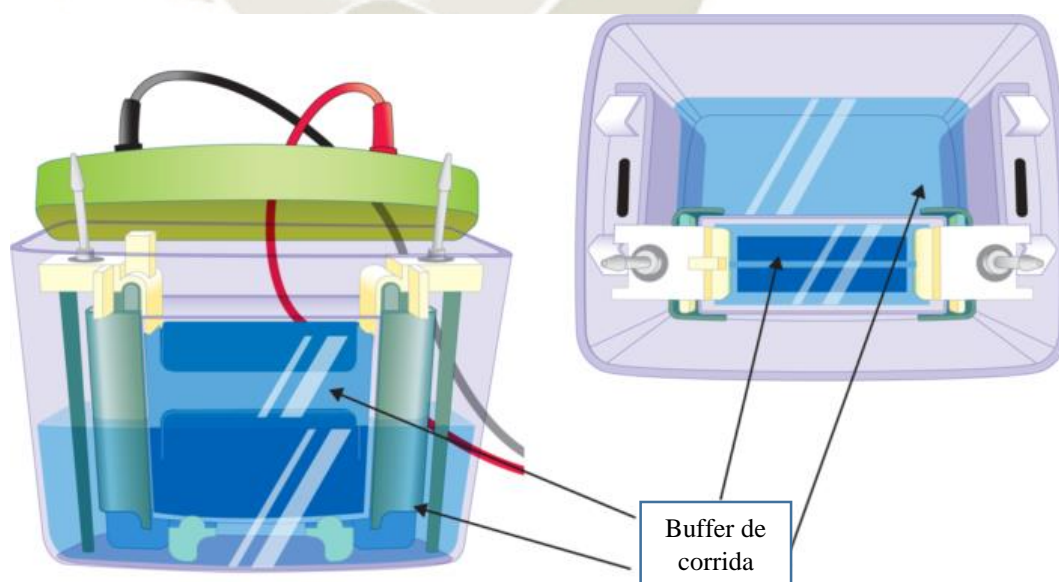


Figura 28: Camara de Electroforesis vertical.¹⁴⁸

2.10.2.2. ELECTROTRANSFERENCIA

Esta técnica es usada para transferir las proteínas del Gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa. Para lo cual, al finalizar la corrida electroforética, cuidadosamente se sacó el gel de la cámara para hacer un sándwich (papel filtro, gel, membrana, papel filtro) sumergidos en buffer de transferencia, el sándwich se colocó en un sistema de transferencia (Trans-Blot® Turbo™) con el lado de la membrana hacia abajo y con ayuda de un rodillo se sacaron las burbujas. El sistema se programó a 1.3A, 25V por 7 minutos. (Figura 29)

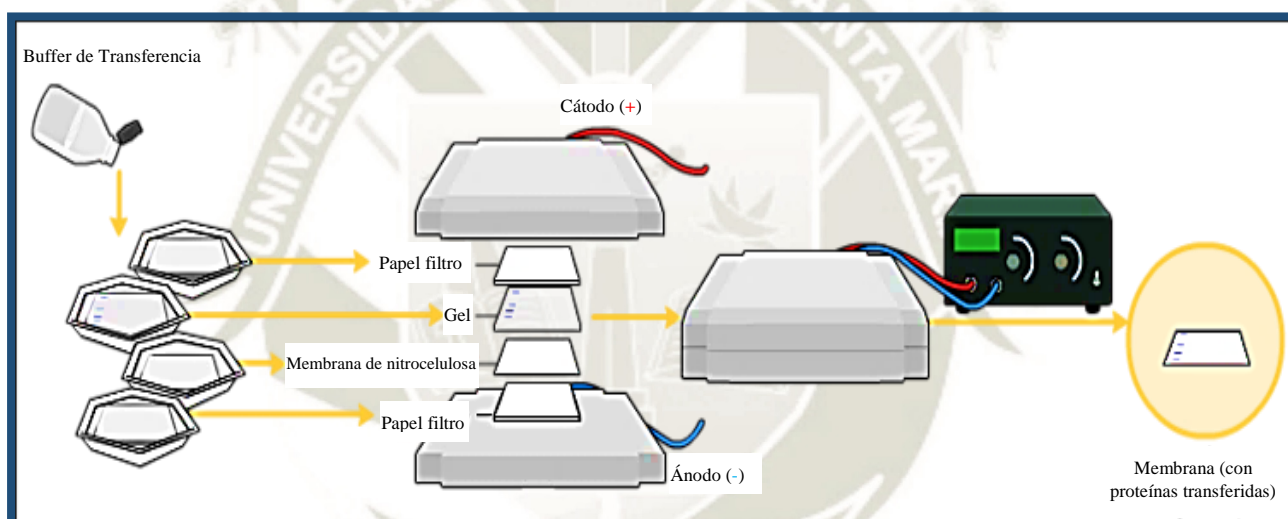


Figura 29: Electrotransferencia de proteínas¹⁴⁹

2.10.2.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Al realizar la electroforesis, se procedió a trabajar con la membrana, la cual se colocó en un pequeño casete, se lavó con PBS 1X y se tiñó con Rojo Ponceau para ver si las muestras corrieron bien. (Figura 30).

Luego, se lavó 3 veces con PBS 1X y se agregó leche al 5%, dejándose en rotación por 1 hora a temperatura ambiente, esto se realizó para bloquear la membrana y evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Pasado el tiempo de bloqueo se agregó el anti-

LRP-1 (Rabbit mAb anti LRP-1), el cual fue preparado previamente con leche en una relación (1:10000), se dejó en incubación a 4°C por 12 horas.



Figura 30: Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau

Pasada las 12h, se decantó el anticuerpo y se lavó la membrana con TBS-t 1X 3 veces por 5min cada una. Terminado esto, se adicionó el anticuerpo secundario (Goat pAb anti-rabbit), el cual se preparó previamente con leche en una relación (1:2000). Se dejó en rotación el casete a temperatura ambiente durante 1 hora.

Al pasar la hora se decantó el anticuerpo y se lavó la membrana con TBS-t 1X 3 veces por 5min cada una, seguidamente se añadió el luminol, el sustrato, que fue preparado con peroxidasa en una relación (1:1), se dejó en rotación por 5min y luego se procedió a leer la membrana en el Escáner Blotting (C-Blot DiGit®) (Figura 31)

Como control se usó la beta-actina, que ayuda a determinar si las muestras se han cargado por igual en todos los pocillos y confirma la transferencia efectiva de proteínas durante la transferencia de Western Blot, para ello, luego de ser leída la membrana, esta se retiró del scanner, se eliminó el sustrato y se lavó con TBS-t. Luego de esto se agregó el anti-b-actin, que fue previamente diluido con leche (1:10000), se dejó en reposo por 1h. Al finalizar se añadió el sustrato y se leyó en el scanner.

Para la evaluación de la expresión del receptor LRP-1 las muestras se analizaron por western blot, y las imágenes se procesaron a través del programa Image Studio Lite versión 5.2.

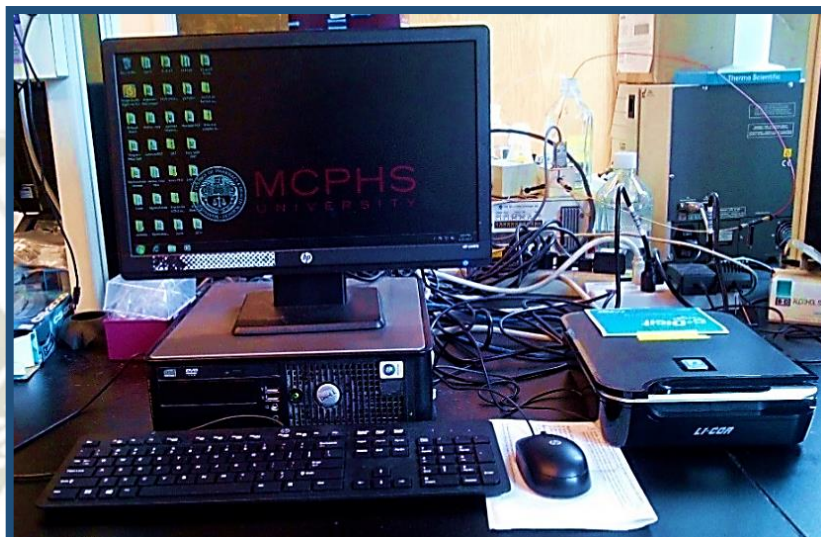


Figura 31: Escaner Blotting (C-Blot Digit®)

2.11. CAPTACIÓN DEL PÉPTIDO FAM- $A\beta_{1-42}$ POR EL LRP-1.

2.11.1. CAPTACIÓN DEL PÉPTIDO FAM- $A\beta_{1-42}$ POR EL LRP-1 MEDIANTE EL ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

El péptido $A\beta_{1-42}$ al estar unido con la molécula de 5,6 carboxifluoresceína absorbe y emite fluorescencia a 494nm y 521nm respectivamente, la cual será medida usando el ensayo Fluorescencia. Para este proceso el lisado de las células se realizó en tubos eppendorf color ámbar y en un ambiente oscuro, para evitar que el fluoroforo de la muestra emita fluorescencia y de un falso positivo. El sobrenadante se separó del lisado celular, del cual se tomaron 200 μ L de cada muestra para ser colocadas en pocillos de una placa oscura (Figura 32), que luego se llevó al lector multimodal de microplacas para la medición de la fluorescencia.



Figura 32: Placa oscura para fluorescencia

Este método se realizó para la determinación de la cantidad de péptido internalizado en células Hep-G2.

2.11.2. CAPTACIÓN DEL PÉPTIDO FAM- $A\beta_{1-42}$ POR EL LRP-1 MEDIANTE ICC (ENSAYO DE INMUNOCITOQUÍMICA)

El método de ICC como se mencionó anteriormente, es un método para diagnóstico, mediante la tinción de la unión antígeno-anticuerpo además del núcleo de las células.

	Control	Scrambled	FAM- $A\beta_{1-42}$	BAF+ $A\beta_{1-42}$
1	0.5% DMSO en LSM	Scrambled	FAM- $A\beta_{1-42}$	FAM- $A\beta_{1-42}$
2	0.5% DMSO en LSM	Scrambled	FAM- $A\beta_{1-42}$	FAM- $A\beta_{1-42}$

Figura 33: Fijación con Metanol y Paraformaldehído

1: Metanol, 2: Paraformaldehído

El primer lugar, como primer paso a las células sembradas y tratadas se les realizó la fijación con 400 μL de para-formaldehído 4% (PAF) y metanol (MeOH), estos se dejaron en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se lavaron las células con 5mL de PBS frío por tres veces, cuidadosamente. Seguido a ello, las células se permeabilizaron con 400 μL de 0.1 Triton-X en PBS por 10 minutos. (Figura 33)

Como segundo paso se realizó el bloqueo que es para evitar la interferencia de receptores inespecíficos. Para ello, se lavó las células 3 veces con 5mL de PBS cuidadosamente y luego se bloquearon con 200 μL de buffer de bloqueo (4% Albumina, 10% goat serum, 0.3 M glicina en PBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente.

Como tercer paso, se realizó la inmunotinción, donde se diluyó el anticuerpo del LRP-1 a una concentración de 1:100 en 1%Albumina/PBS-T. Luego de lavar otra vez con 5mL de PBS, se añadió a las células 200 μL del preparado del anticuerpo y se cubrió con parafilm dejándolo en incubación a 4°C por 12 horas.

Después de la incubación, se lavaron las células con 5mL de PBS y se adicionaron 200 μL de la solución del segundo anticuerpo (Alexa-fluor 488), que fue preparada previamente con 1% BSA/PBS-T en una relación 1:400. Se dejó la placa a temperatura ambiente cubriéndose con parafilm en oscuridad por 1 hora.

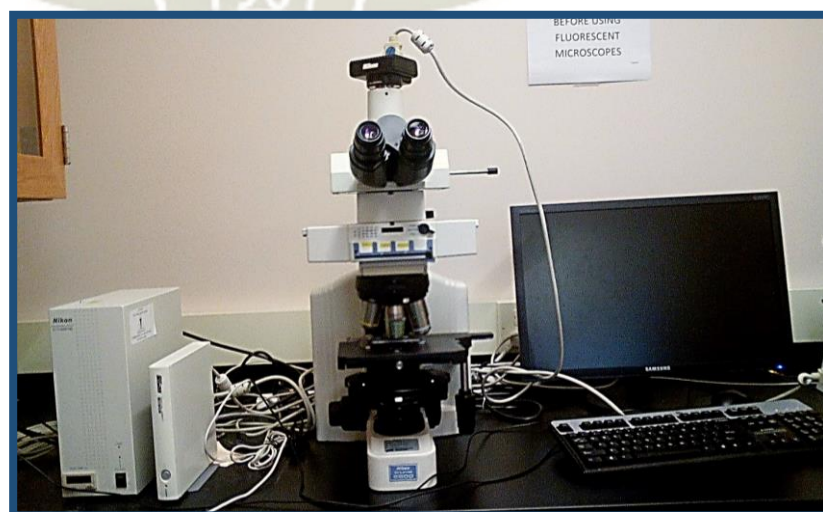
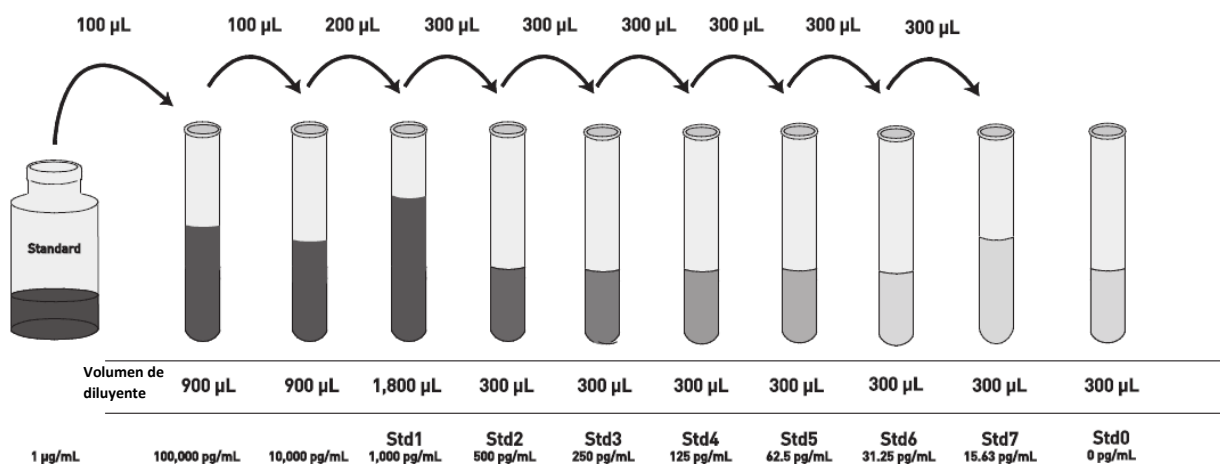


Figura 34: Microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600)

Finalmente, como último paso se realizó la contra coloración, donde se removió el anticuerpo y se lavó tres veces con PBS para añadir el DAPI; cubrimos la placa con una lámina sellando los bordes con pintauñas y luego poder leerlo en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) (Figura 34).

2.11.3. ESPECIFICIDAD DEL PÉPTIDO FAM-A β ₁₋₄₂ POR EL LRP-1 MEDIANTE EL ENSAYO DE ELISA

Para comenzar este ensayo, se realizó la dilución del estándar de A β ₁₋₄₂ Humano, por consiguiente, se reconstituyó este a 1 μ g/mL con el buffer de dilución estándar. A partir de este se realizó las diferentes diluciones (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 y 0 μ g/mL) con buffer de solución estándar como muestra en el diagrama, mezclando generosamente entre cada paso.



Fuente: Human A β ₄₂ ELISA Kit Product Information Sheet

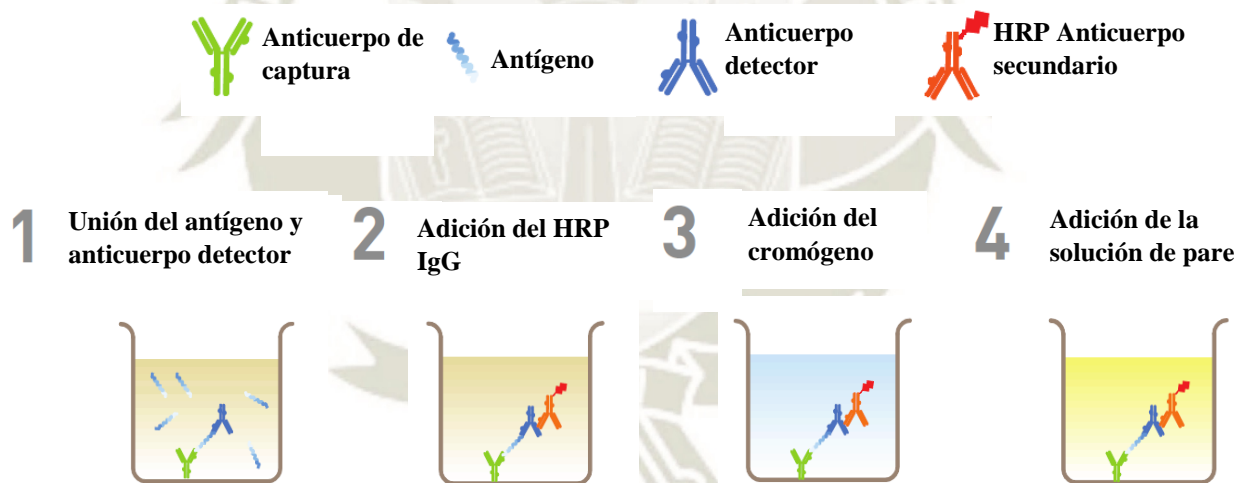
Hecho esto se procedió a realizar el ELISA, en el cual primero se agregó 50 μ L de standard, muestra y control (por triplicado) en diferentes pocillos de la placa que contiene el anticuerpo específico de A β ₁₋₄₂. Luego, se agregó 50 μ L de Anticuerpo A β ₁₋₄₂ humano de detección a cada pocillo, se cubrió la placa con una cubierta adhesiva y se dejó en incubación y movimiento leve a temperatura ambiente por 3 horas. Pasado este tiempo, se aspiró la solución y se lavó los pocillos 4 veces con Buffer de lavado 1X.

Seguidamente se agregaron 100µL de Anticuerpo de Conejo IgG Horseradish Peroxidase (HRP) a cada pocillo, que se preparó previamente (10µL Anti-Rabbit IgG HRP (100X) en 1mL de diluyente de HRP). Se cubrió la placa con adhesivo y se dejó en incubación por 30min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se aspiró la solución y se lavó los pocillos 4 veces con Buffer de lavado 1X.

Al terminar el lavado, se agregó 100µL del cromógeno a cada pocillo (Tetrametilbencidina (TMB)), la solución cambio a azul. Luego se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 30min.

Finalmente, se añadió 100µL de solución de pare a cada pocillo, se cubrió la placa, se mezcló y la solución cambio de color azul a amarillo. En el diagrama podemos observar el proceso de ELISA que se realizó.

Las absorbancias de los estándares, muestras y controles se leyeron a 450nm en un espectrofotómetro.



Fuente: Human Aβ42 ELISA Kit Product Information Sheet

2.12. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los resultados se expresaron como Media \pm SEM. Para los procesos de significancia estadística se usaron el T-test no pareado y el Análisis de varianza ANOVA de una sola vía con el test de Dunnet para realizar las comparaciones múltiples, a una $p < 0,05$. El programa estadístico utilizado para el análisis de la base de datos y elaboración del registro fue GraphPad Prism 6 XML.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CULTIVO CELULAR

Las células de cáncer de hígado (HepG2, ATCC) se cultivaron en frascos con MC a partir del pasaje 21 e incubadas a 37°C con 5% de CO₂, diariamente se observaron en el microscopio invertido (Olympus), objetivo 40X, para controlar el crecimiento óptimo de las células.

Cada vez que se observaba un cambio de coloración del medio (de rojo a naranja), el medio se desechaba y se cambiaba con MC fresco, para evitar la disminución de nutrientes y acumulación de desechos que afectan el crecimiento óptimo de las células, este proceso se realizaba de preferencia cada tres días. En el caso de no cambiar el medio, las células morían formando acumulaciones flotantes. (Clusters). (Figura 35)

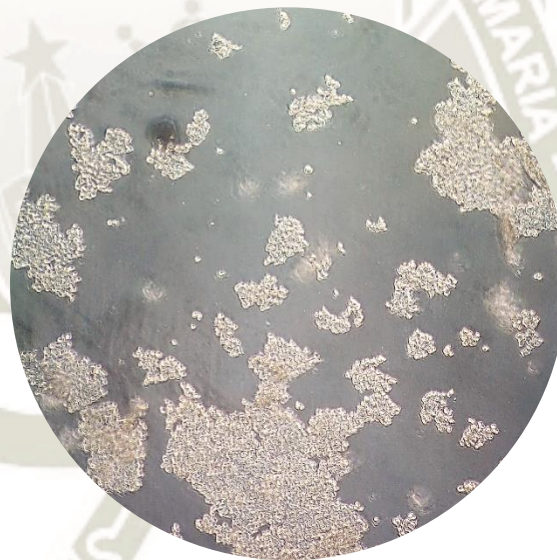


Figura 35: Células de cáncer de hígado (HepG2) muertas, flotando y formando clusters, vista capturada por el microscopio invertido (Olympus)

También se observó y controló la confluencia celular (cantidad de células adheridas a la superficie de frasco) y cuando se evidenciaba una confluencia mayor al 90% se realizaba un nuevo pasaje.

Antes de realizar nuevos pasajes y poder proceder al desarrollo del estudio se realizó el conteo celular, en el cual se pudo observar que hubo un óptimo desarrollo de la línea celular (Figura 36) con una viabilidad del 97.24% y una cantidad de células promedio

de 9.01×10^6 . Esto debido a las condiciones adecuadas que se brindó a las células, además del uso de MEM Completo conteniendo 10% de suero fetal bovino lo que permitió el rápido crecimiento de las células.

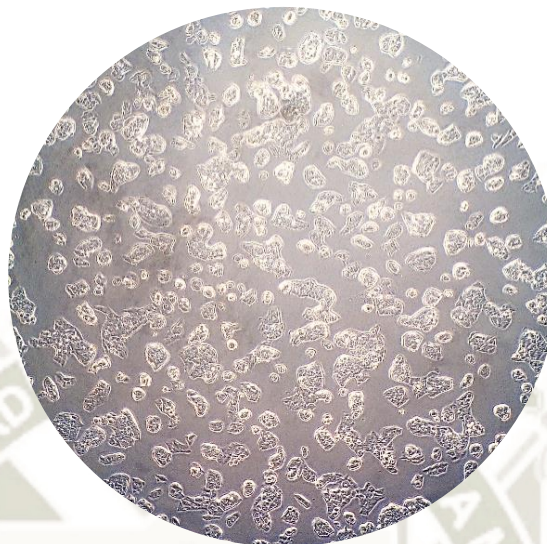


Figura 36: Células de cáncer de hígado (HepG2, ATCC) al tercer día de sembradas, con una confluencia más del 90%, vista capturada por el microscopio invertido (Olympus)

2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación se realizó en el lector de microplatos Synergy a una longitud de onda de 562nm por triplicado. Como se mencionó en el capítulo de materiales y métodos se utilizaron 5 estándares de albumina y un blanco para la realizar la curva de calibración. Con la media de las absorbancias obtenidas se realizó la curva de calibración (Figura 37). Las absorbancias netas se pueden observar en el ANEXO I

Una vez obtenida la curva de calibración se realizó la medida de las absorbancias de las muestras, la media de estas se reemplazó en la ecuación 6, obtenida de la curva de calibración, para obtener la concentración de proteínas totales presentes en las células HepG2.

Ecuación 6:

$$y = 0.0004x + 0.0136$$

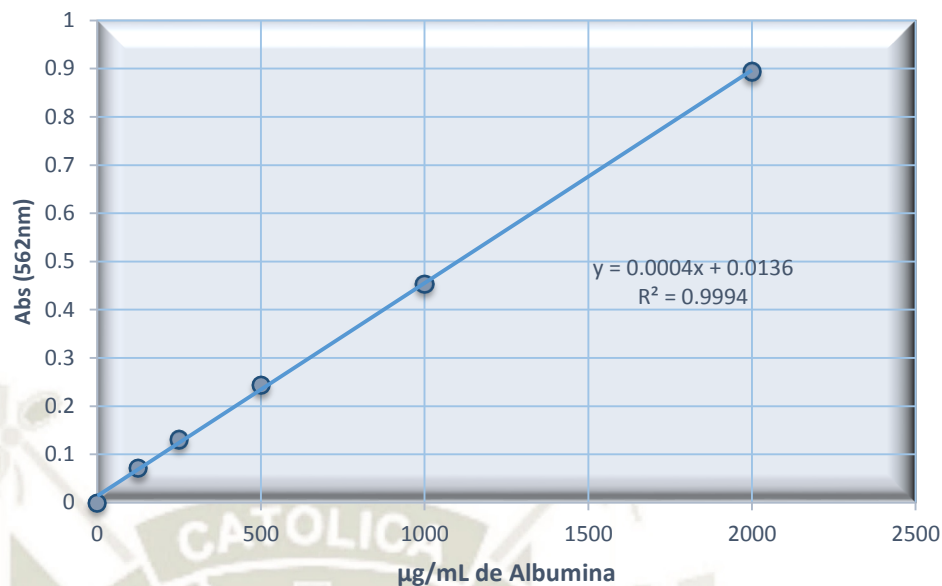


Figura 37: Curva de Calibración de Albumina de Suero Bovino

El color purpura formado (Figura 38) es producto de la quelación de las dos moléculas del BCA con el ion cuproso, las cuales darán una absorbancia que será medida a 562nm. En base a la curva de calibración se a calculó la cantidad de proteína existente en cada muestra.

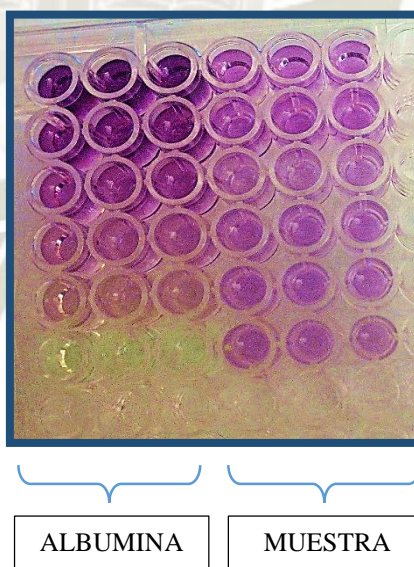


Figura 38: Pocillos con concentraciones de albúmina de 0, 125, 250, 500, 1000 y 2000µg/mL y muestra, por triplicado para la curva de calibración y cuantificación de proteínas.

3. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LRP-1 EN CÉLULAS HepG2

Tal como se indicó en el capítulo de materiales y métodos, para la validación de la expresión de LRP-1 se realizó la cuantificación de proteínas mediante BCA y posteriormente Western Blot.

Luego de realizar la curva de calibración, se realizó la medida de las absorbancias de las muestras en el microplate synergy. A partir de la media de estas, se realizó la cuantificación de proteínas totales presentes en las células HepG2 mediante una extrapolación de los datos de la curva de calibración realizada con albumina (Figura 37), las absorbancias netas y concentraciones calculadas se pueden observar en el ANEXO II y III.

Con la concentración de proteínas calculada, se procedió a realizar cálculos para determinar el volumen de muestra a usar en la mezcla de 100mL (SDS, PBS 1X y muestra), de los cuales se tomaron 40 μ L (con una concentración de 10 μ g de proteínas) que se colocaron en los pozos de gel para el Western Blot..

Luego de ser leída la membrana en el scanner LI-COR, se obtuvo la densitometría de las bandas del LRP-1 (85 kDa) y β -Actina (41kDa) (Figura 39) las cuales se pueden observar en el ANEXO IV, de acuerdo a la media FC obtenido (Tabla 6).

Con la densitometría de bandas obtenida se realizó el gráfico y cálculos estadísticos (Figura 40). La primera muestra se tomó como un control, para la comparación con las demás.

En la Figura 40 se verificó la existencia del receptor LRP-1 en las células HepG2, y comparándolo con el marcador de peso molecular (LADDER) usado, se observó que la fracción de receptor de 85kDa es la identificada. Además, también se confirma que no hay diferencia significativa entre ellas teniendo un $p > 0.05$ y se comprueba la cantidad de receptor existente en las células HepG2.

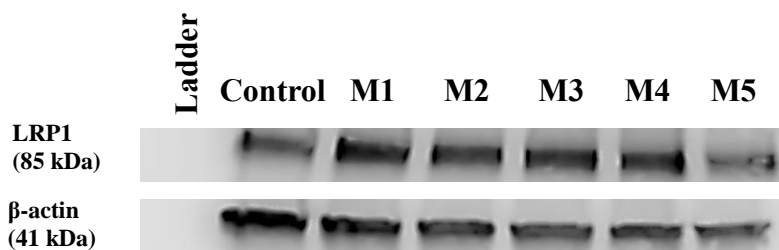


Figura 39: Bandas de LRP-1 en células HepG2. Western Blot.

Control, M1, M2, M3, M4, M5: células HepG2 normales.

Tabla 6: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2

	CONTROL	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5
Promedio	1.00000	1.02183	1.04040	1.00812	0.99716	0.90545
Desviación Estándar	-----	0.09564	0.14757	0.05592	0.08566	0.15381

Fuente: Elaboración propia

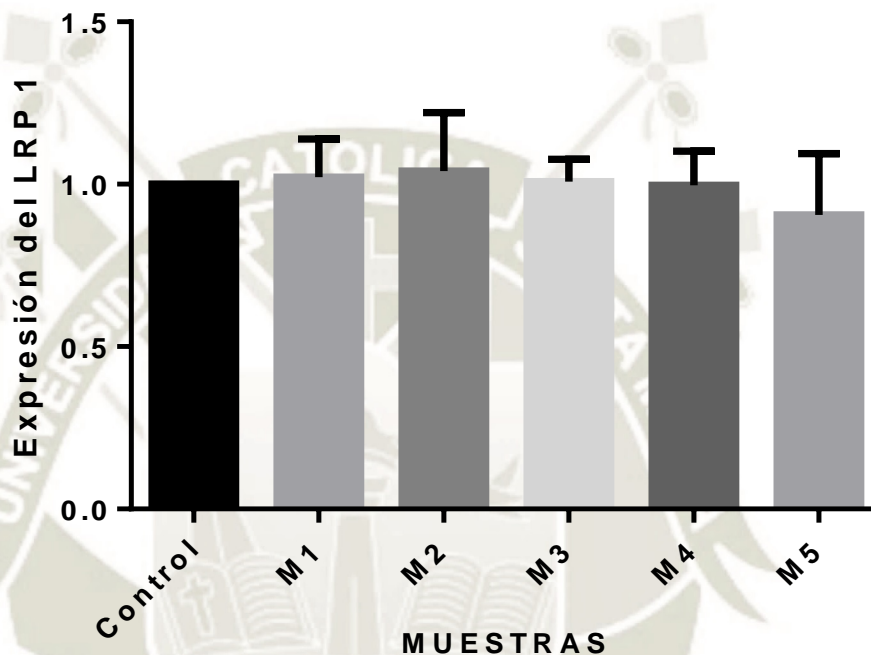


Figura 40: Niveles de expresión del LRP-1 en células HepG2. Control, M1, M2, M3, M4, M5: células HepG2 normales. Los cálculos estadísticos se realizaron en el programa Graph Pad Prism 6 (ns = $p > 0.05$ n= 3)

En el marco teórico se habló acerca del LRP-1 donde nos dice se expresa en diversas células, tales como hepatocitos, fibroblastos, células de músculo liso, neuronas, células gliales y astrocitos.⁹⁹

Un estudio realizado por Jae Hoon Moon y colaboradores acerca de la regulación positiva de LRP-1 hepática por rosiglitazona¹¹⁸, así como también un estudio de regulación de LRP1 como mecanismo de actividad antiaterogénica¹³⁴, fueron realizados en líneas celulares HepG2 demostrando la presencia del receptor en células hepáticas G2.

4. EXPRESIÓN DEL LRP1 DESPUÉS DEL ANTAGONISMO DEL PPAR γ .

Mediante el método de cuantificación de proteínas, obtuvimos las absorbancias de las muestras, de las cuales a partir de su extrapolación se obtuvo la concentración de proteínas totales presentes en las células HepG2, las absorbancias y concentraciones netas las podemos observar en el ANEXO V y VI.

Luego de realizar los cálculos para el volumen de muestra que se usó en el Western Blot, y ser leída la membrana por el scanner LI-COR, se obtuvieron la densitometría de las bandas del LRP-1 (85 kDa) y β -Actina (41 kDa) (Figura 41) las cuales se pueden observar en el ANEXO VII, de acuerdo a la media FC obtenido (Tabla 7).

Con la densitometría de bandas obtenida, se procedió a realizar el grafico y cálculos estadísticos (Figura 42). Las células control se consideraron en relación a 1, para luego comparar si hay disminución o aumento de la expresión de LRP-1 en células tratadas con T0070907 por 24h.

Como resultado en este proceso en la Figura 42 se ve que hay diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre las células tratadas y las células control. Se demuestra que la droga T0070907 a una concentración de 10 μ M, disminuye considerablemente la expresión de LRP-1 en células HepG2.



Figura 41: Bandas de LRP-1 en células HepG2 tratadas con T0070907. Western Blot

Tabla 7: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2

	CONTROL	T0070907
Promedio	1.00000	0.23562
Desviación Estándar	0.17772	0.02595

Fuente: Elaboración propia

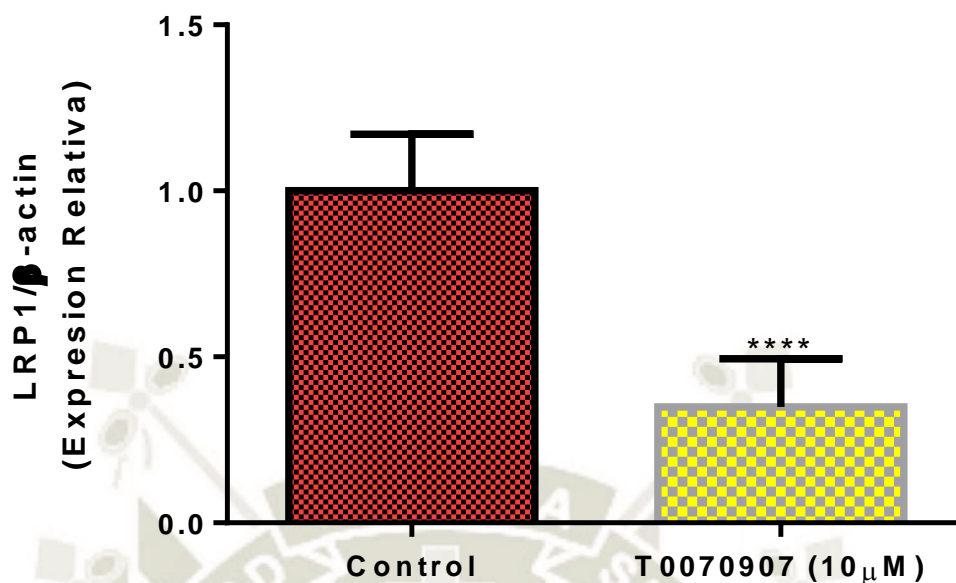


Figura 42: Niveles de expresión del LRP-1 en células HepG2 control y tratadas con T0070907. Se realizó un T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6. (**** $p < 0.0001$; $n=3$)

Los PPAR son factores transcripcionales activados por ligandos que influyen en la expresión o la actividad de diversos genes que afectan los procesos, incluida la homeostasis de la glucosa, el metabolismo energético y la inflamación. Por lo tanto, se ha informado que los agonistas de PPAR proporcionan efectos neuroprotectores contra enfermedades neurodegenerativas, que incluyen EA y EP.¹³⁵

Dentro de los PPARs, el PPAR γ tiene un papel fundamental en la regulación del LRP-1 debido a la presencia del elemento de respuesta del proliferador de peroxisoma (PPRE) en la región promotora de LRP1.¹¹⁷

En el capítulo del marco teórico se da a conocer la droga T0070907, un antagonista del PPAR γ . Un estudio sobre la Rosiglitazona para facilitar la degradación lisosomal del LRP-1 en células HepG2 realizado por el Magister Alejandro Rondón Ortiz¹³³ en el mismo laboratorio, comprueba y sustenta que el T0070907 a una concentración de 10 μ M disminuye la expresión de LRP-1 en células HepG2.

5. CAPTACIÓN DEL PÉPTIDO FAM- $A\beta_{1-42}$.

5.1. CAPTACIÓN DE FAM- $A\beta_{1-42}$ A DIFERENTES TIEMPOS TRATADAS CON T0070907

Luego de ser probada el efecto del T0070907 de disminución de la expresión del LRP-1 en células hepáticas, se procedió a realizar la medida de la captación de FAM- $A\beta_{1-42}$ en células HepG2 que fueron tratadas con la droga por 24h.

El $A\beta_{1-42}$ al estar unido a la molécula de FAM, absorbe y emite fluorescencia a 494nm y 521nm respectivamente, que fue medida usando la técnica de Espectrometría de Fluorescencia.

Al ser leída la placa en el lector multimodal de microplacas, se obtuvieron las unidades de fluorescencia relativa (RFU) del péptido FAM- $A\beta_{1-42}$ presente en los 200 μ L (ANEXO VIII) que pertenecen a los tiempos de 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h y 6h de las células control y tratadas con T0070907.

Luego de obtener las RFU, se procedió a realizar la cuantificación de proteínas, y con las absorbancias proporcionadas se realizó una extrapolación de datos para el cálculo de la concentración media de proteínas totales presentes en los 200 μ L de muestra, las concentraciones y absorbancias netas se observan en el ANEXO IX y X.

Con la concentración de proteínas calculada, se procedió a realizar cálculos para hallar la cantidad de fluorescencia emitida que hay en un miligramo de proteína, para luego hacer una relación entre el péptido y la cantidad de proteína total presente en las células HepG2. Las RFU por miligramo de proteína neta se pueden ver en el ANEXO XI.

En la Figura 43 se ilustra que las células que se trataron con T0070907, tienen mayor captación de péptido que el control en cada tiempo, un resultado contrario a lo esperado. Como se observó en el proceso anterior, se comprobó que la droga T0070907 si disminuye considerablemente el receptor implicado para la captación del péptido $A\beta_{1-42}$, pero a pesar de ello hubo mayor captación en las células tratadas.

Debido a este resultado se decidió realizar una evaluación de la cantidad de receptor LRP-1 presentes en la membrana y el citosol de células HepG2 tratadas con T0070907, para evaluar la causa del resultado contrario a lo esperado.

Se realizó un T-test a cada punto de tiempo donde todos tienen un $p < 0.05$ a excepción del tiempo de 6h donde no hubo diferencia significativa entre el control y células tratadas.

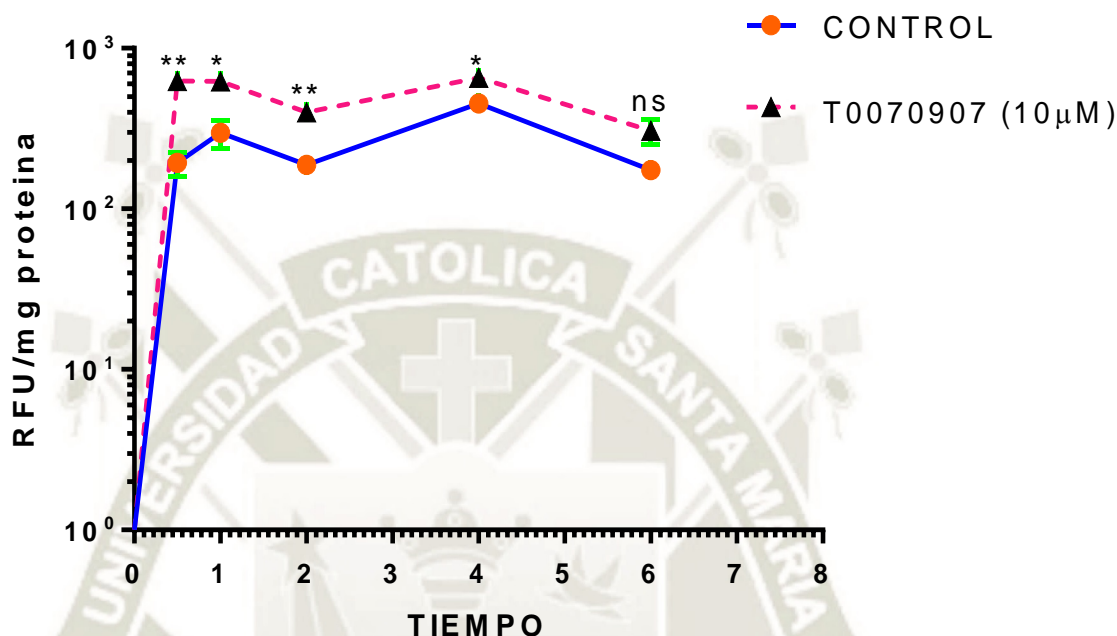


Figura 43: Captación de $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 a diferentes tiempos. Se realizó un T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=3$)

5.1.1. EXPRESIÓN DE LRP-1

Mediante el BCA se obtuvieron las absorbancias de las muestras, de las cuales a partir de su extrapolación se obtuvo la concentración de proteínas totales presentes en las células HepG2, las concentraciones y absorbancias netas las podemos observar en el ANEXO IX y X. Con estos datos procedimos al cálculo de volumen de muestra que se usó para el desarrollo del Western Blot.

Después de ser leída la membrana, se obtuvieron la densitometría de bandas de LRP-1 (85 kDa) y β (41 kDa) (Figura 44), las cuales se pueden observar en el ANEXO XII, de acuerdo a la media FC obtenido (Tabla 8). Las células

control se consideraron en relación a 1, pudiendo así comparar si hay disminución o aumento de la expresión de LRP-1 en células tratadas con T0070907 en los tiempos de 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h y 6h.

Como observamos en la Figura 45, las células tratadas de 0h, 1h, 2h, 4h y 6h presentan una disminución significativa del receptor LRP-1 en comparación al control. En cambio, el tiempo de 0.5h no presenta diferencia significativa.

Con este resultado se comprobó que la droga si disminuyo la expresión del receptor LRP-1 en las células HepG2, pero a la vez hubo el cuestionamiento del porque hubo más péptido en las células tratadas. Debido a ello, se procedió a evaluar la expresión del receptor LRP-1 en la membrana y en el citosol, y ver qué fue lo que paso en las células.

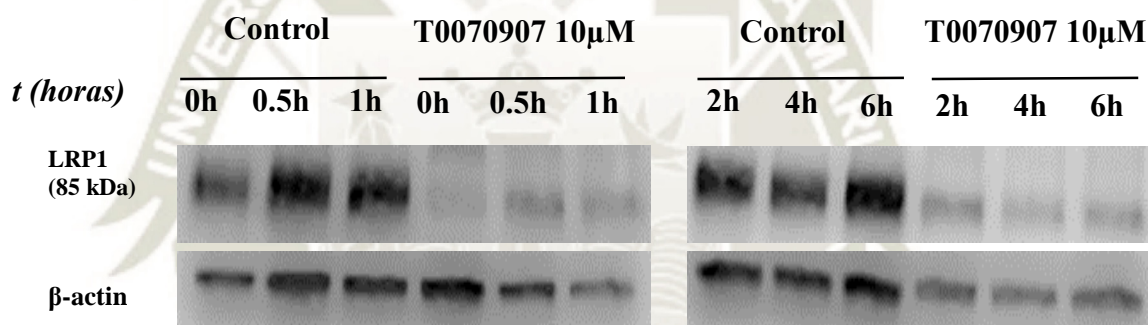


Figura 44: Bandas de LRP-1 en células HepG2 tratadas con T0070907 a diferentes tiempos. Western Blot

Tabla 8: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2

	Control		T0070907	
	Promedio	D. E	Promedio	D. E
0h	1.000	0.000	0.158	0.046
30min	1.000	0.000	0.823	0.086
1h	1.000	0.000	0.466	0.156
2h	1.000	0.000	0.592	0.077
4h	1.000	0.000	0.408	0.090
6h	1.000	0.000	0.360	0.072

Fuente: Elaboración propia

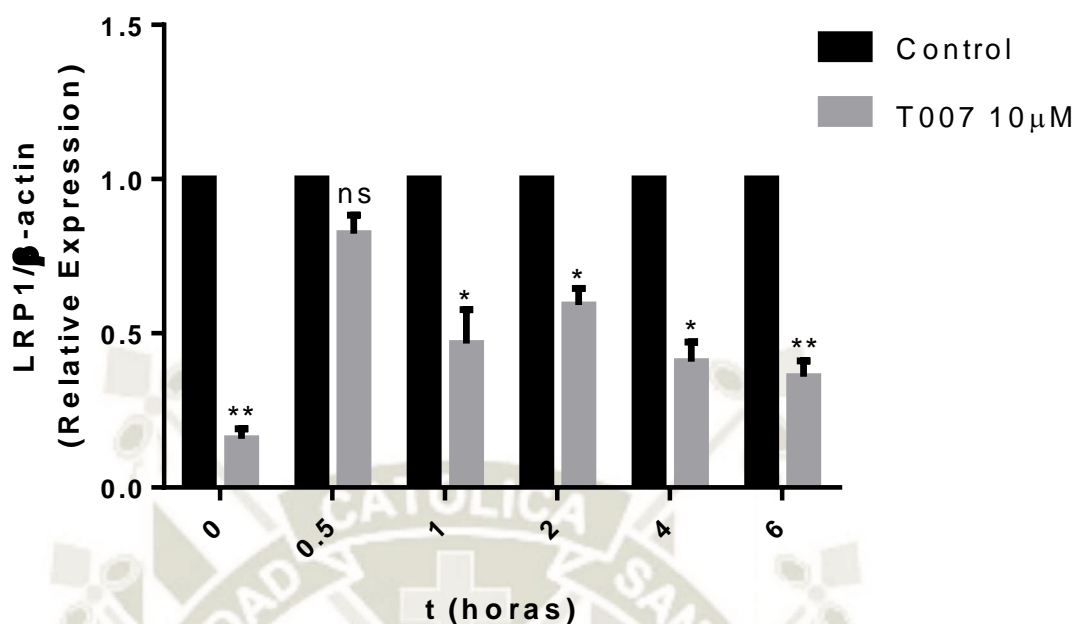


Figura 45: Niveles de expresión de LRP-1 en células HepG2 control y tratadas con T0070907. Se realizó un T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, $n=3$)

5.1.2. EXPRESIÓN DE LRP-1 EN MEMBRANA Y EN CITOSOL

Dado el resultado anterior, se decidió evaluar el efecto que tiene el T0070907 para con el receptor LRP-1 en membrana y citosol de células HepG2. Para ello se usó un buffer distinto (MEM-PER). Al tener las proteínas de membrana y de citosol, se llevaron a cuantificación de proteínas, obteniendo así las absorbancias, que a partir de su extrapolación se calcularon la concentración de proteínas presentes en membrana y en citosol de células HepG2, las absorbancias y concentraciones netas las podemos observar en el ANEXO XIII y XIV. Teniendo estos datos procedimos al cálculo de volumen de muestra que se usó para el Western Blot.

Al ser leída la membrana por el escáner, obtuvimos la densitometría de bandas de LRP-1 (85 kDa) y β (41 kDa) (Figura 46).

Al observar la Figura 46 nos damos cuenta que el T0070907 si disminuye las proteínas en citosol comparado con el control, pero en la membrana la expresión del receptor es casi igual al control, por lo que podemos decir que

la droga si disminuye la expresión del receptor LRP-1 en citosol pero no en membrana.

Este resultado se realizó de forma cualitativa para conocer el porqué del resultado negativo anterior.

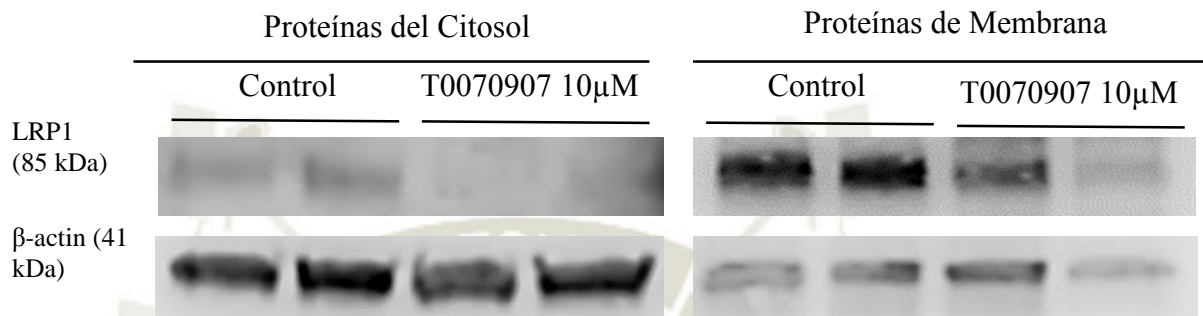


Figura 46: Bandas de LRP-1 en Citosol y Membrana de células HepG2. Western Blot

En el capítulo de materiales y métodos se mencionó que el LRP-1 es un receptor transmembrana que incluye una cadena α extracelular de 515 kDa y una cadena β de 85 kDa que contiene una extensión extracelular corta, el dominio transmembrana único y un dominio intracitoplásmico de 100 aminoácidos (DIC).¹⁰⁰

En este estudio realizado por primera vez se probó que la droga T0070907 disminuye la expresión del receptor que se encuentra en el citoplasma, pero no disminuye la cadena que se encuentra en la membrana.

5.2. CAPTACIÓN DE FAM- $A\beta_{1-42}$ TRATADAS CON BAFILOMICINA A1

Para la medición de la captación de FAM- $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 en células hepáticas tratadas con Bafilomicina A1, se realizó el método de inmunocitoquímica

Luego de que las células pasaran por los procesos de fijación, bloqueo, inmunotinción y contracoloración, se llevó la placa para la vista al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600), dándonos este las diferentes vistas pertenecientes al FAM- $A\beta_{1-42}$, LRP-1, DAPI y Merge (combinación de todas las vistas).

Se tomaron 3 fotos de cada vista pertenecientes a diferentes células. En la Figura 47 podemos observar las vistas de las células que se fijaron con Metanol (MeOH) y

en la Figura 48 observamos las vistas de las células que se fijaron con Paraformaldehído (PAF).

Haciendo una comparación cualitativa entre las imágenes de la Figura 47, se observan que las células que se trataron con Bafilomicina A1 presentan mayor intensidad del color rojo ($A\beta_{1-42}$), comparadas con las células control. Además, en las imágenes del Merge, la cantidad de $A\beta_{1-42}$ que fue captado por el LRP-1 se ve en la combinación de los colores verde y rojo dando el color amarillo. Como resultado cualitativo se ve en las imágenes que las células que se trataron con Bafilomicina A1 presentan mayor intensidad de color amarillo dentro de la célula, que las células control. Cabe recordar que las células control fueron las que no contenían al péptido (control) y las que contenían solo al péptido ($A\beta_{1-42}$)

En la Figura 48 se observa lo mismo que en la Figura 47, pero en este presentan menos intensidad de color.

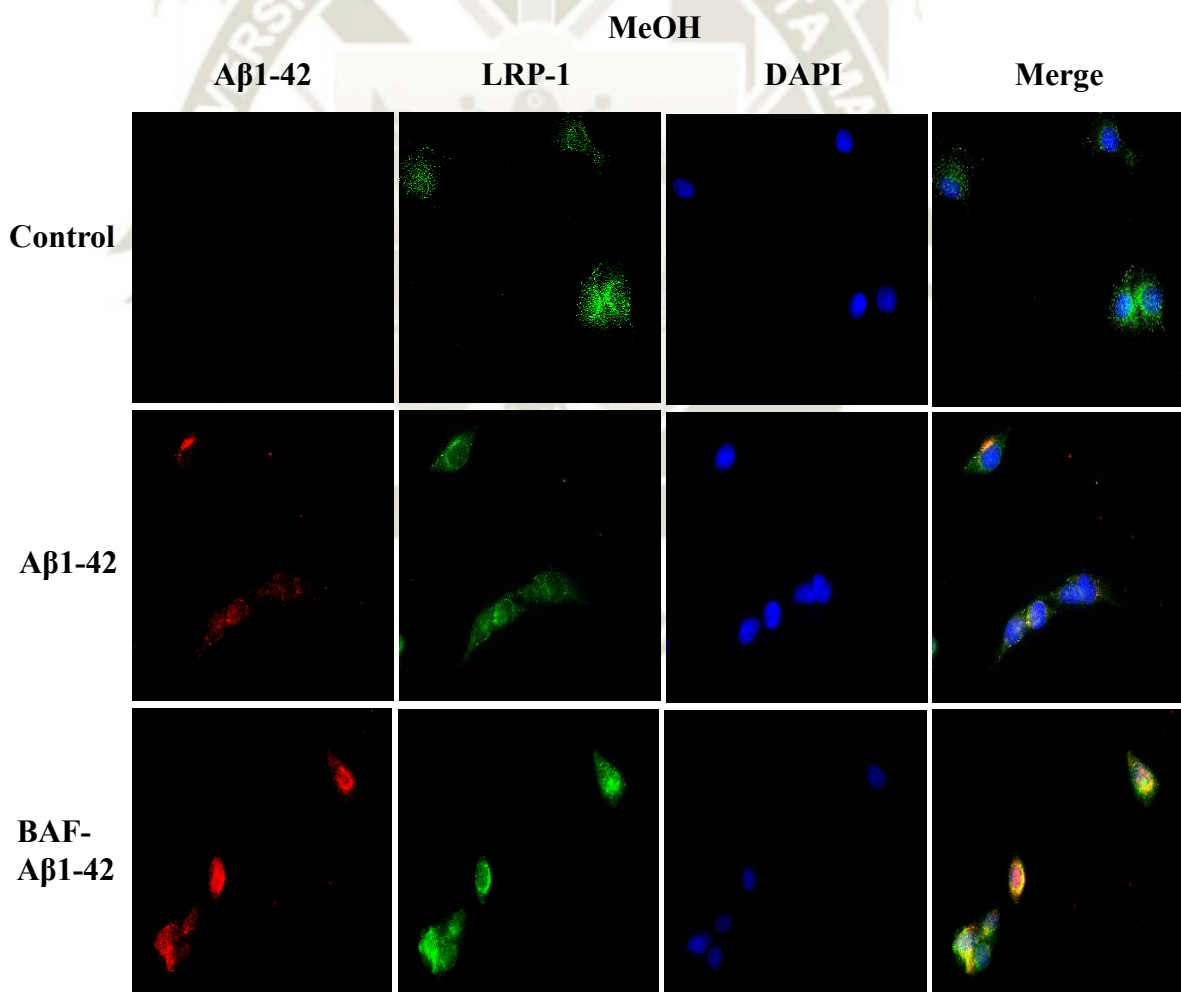


Figura 47: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) perteneciente al FAM-A β 1-42, LRP-1, DAPI y Merge, de células control y tratado con Bafilomicina A1. Fijadas con Metanol.

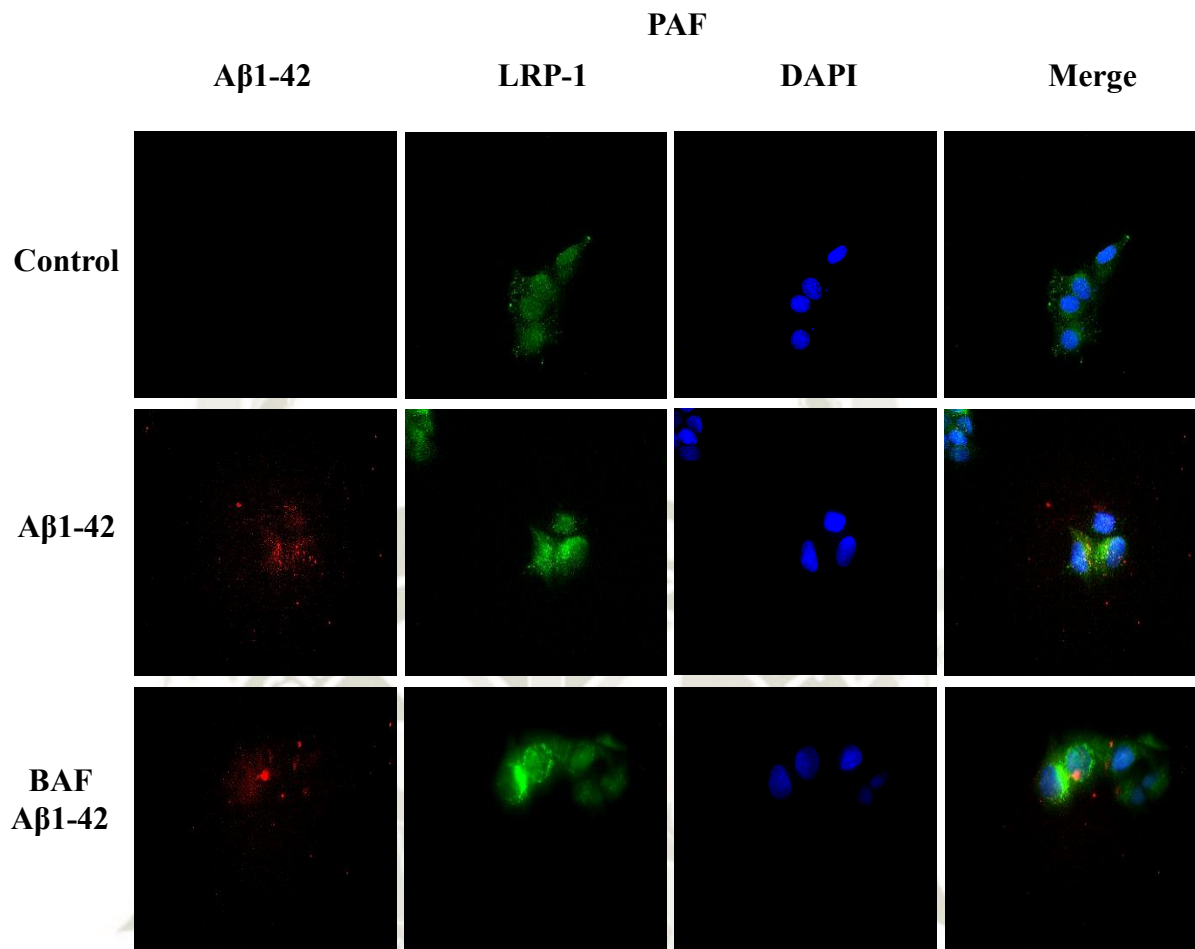


Figura 48: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) pertenecientes al FAM- $A\beta_{1-42}$, LRP-1, DAPI y Merge, de células control y tratadas con Bafilomicina A1. Fijadas con Paraformaldehído.

Para una evaluación cuantitativa, se realizó la medida del área que ocupaba el $A\beta_{1-42}$ dentro del LRP-1 de la célula (lo rojo dentro de lo verde), es decir, se midió el área del color amarillo en el Merge y este se comparó con el área de LRP-1. Dándonos la cantidad de $A\beta_{1-42}$ captada por el receptor LRP-1. En la Tabla 9 vemos las áreas calculadas, de las cuales se sacó el porcentaje de $A\beta_{1-42}$ que fue captado por el LRP-1 en células HepG2 (Tabla 9). Con estos datos se realizó el grafico y cálculos estadísticos (Figura 49). Las áreas fueron medidas con el programa Image J Fiji.

En la Figura 49 podemos ver que las células que se trataron con Bafilomicina A1, fijadas con MeOH y PAF, presentan mayor captación de $A\beta_{1-42}$ que las células control, presentando una gran diferencia significativa entre ambas. Dando por probado que la Bafilomicina previene la degradación lisosomal de LRP-1 y permite mayor captación de este péptido por este receptor en células hepáticas.

Tabla 9: Áreas de A β 1-42 y LRP-1 en células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1

MEOH				
ÁREA	Aβ1-42		BAF-Ab 1-42	
	Aβ1-42	LRP-1	Aβ1-42	LRP-1
		2461.00	24336.00	6350.00
	9950.00	92787.00	23305.00	55791.00
	5172.00	42693.00	18336.00	44532.00

PAF				
ÁREA	Aβ1-42		BAF-Ab 1-42	
	Aβ1-42	LRP-1	Aβ1-42	LRP-1
		2392.00	42222.00	4144.00
	3748.00	70923.00	10937.00	100989.00
	4140.00	76681.00	4392.00	40249.00

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10: Porcentaje de A β 1-42 captado por el LRP-1 en células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1.

	Porcentaje Aβ%	
	Aβ1-42	BAF-Ab 1-42
MEOH	10.11	34.63
	10.72	41.77
	12.11	41.17
Promedio	10.98	39.19
Desviación Estándar	1.03	3.96

	Porcentaje Aβ%	
	Aβ1-42	BAF-Ab 1-42
PAF	5.67	11.74
	5.28	10.83
	5.40	9.75
Promedio	5.45	10.77
Desviación Estándar	0.20	0.99

Fuente: Elaboración propia

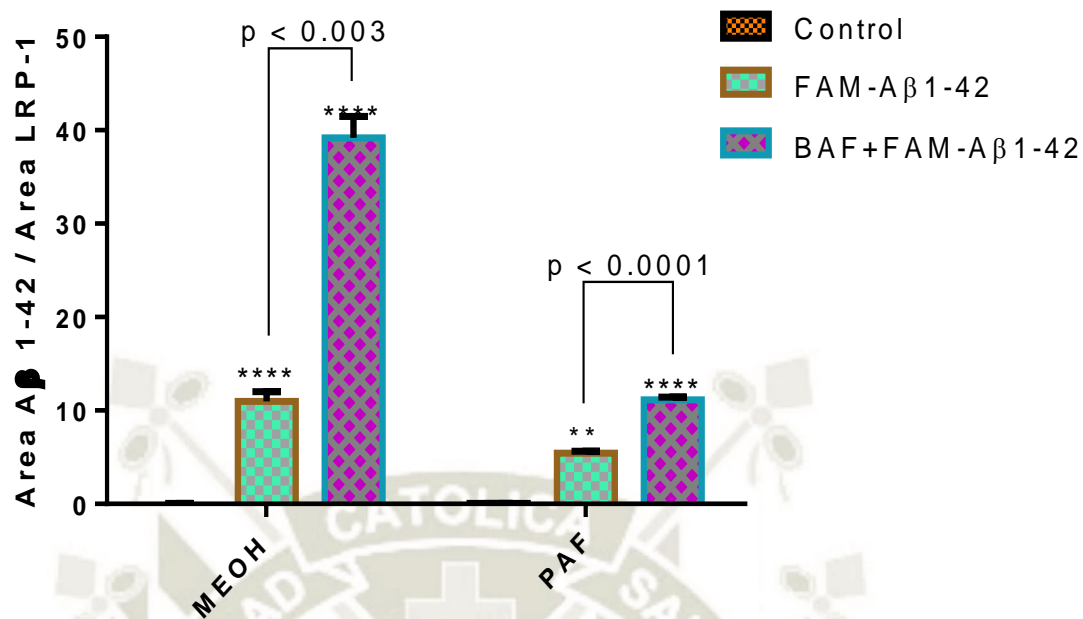


Figura 49: Captación de Aβ₁₋₄₂ por el LRP-1 en células tratadas con Bafilomicina A1 por 3h. Se realizó un T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6. (** p<0.001, **** p<0.0001, n=3)

Mobina Alemi y colaboradores realizaron un estudio similar con el método de inmunocitoquímica usando células cerebrales y el péptido FAM- Aβ₁₋₄₂ verificando la expresión del receptor LRP-1 en estas células y asegurando el transporte de Aβ a través de la monocapa de células¹³⁵.

Alejandro Rondón y colaboradores usaron el mismo método, pero en células HepG2 para la demostración de que concentraciones altas de Rosiglitazona disminuyen los niveles de LRP-1, demostrando también otro mecanismo que reduce el LRP-1¹³³.

Para la evaluación semicuantitativa se usó el programa Image J que también fue usado por Hong Mu y colaboradores en un estudio de identificación de biomarcadores para el carcinoma hepatocelular.¹³⁶

Con todos estos resultados podemos decir que las células hepáticas si tienen una gran captación de péptido Aβ₁₋₄₂ por el receptor LRP-1. Además, se da como afirmación que la captación del péptido es un proceso dependiente del receptor LRP-1 en células hepáticas, debido a que su captación aumento gracias a la inhibición lisosomal del LRP-1 usando la Bafilomicina.

En contraste con nuestros resultados, estudios previos demuestran que el LRP-1 localizado en las células hepáticas se une y se escinde sistémicamente a A β circulante. Los niveles reducidos de LRP1 hepática se asocian con una disminución del aclaramiento de A β periférica en ratas ancianas.¹³⁷ En los monos ardilla ancianos, la eliminación sistémica de A β también se reduce y se asocia con un aumento en los niveles de A β en el cerebro. Además del hígado, los complejos libres sLRP1-A β y A β se eliminan a través de los riñones.¹³⁸ Recientemente, también se ha demostrado que el hígado es una fuente importante de A β y puede regular los niveles de A β en el cerebro.^{139, 140}

6. ESPECIFICIDAD DEL EL PÉPTIDO *Beta Amiloide (A β 1-42)* PARA LRP-1

6.1. ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

En este proceso se quiso determinar la especificidad del receptor LRP-1 para con el péptido A β ₁₋₄₂ mediante el Ensayo de Inmunofluorescencia. Para ello, se usó el Scrambled A β ₁₋₄₂ que tiene los mismos aminoácidos que el péptido A β ₁₋₄₂ pero estos están en diferente orden. En el capítulo de materiales y métodos se mencionó que el Scrambled también está unido a la molécula de fluorescencia FAM, la cual absorbe y emite fluorescencia a 494nm y 521nm respectivamente por ello usamos este método.

Al ser leída la placa oscura por el lector multimodal de microplacas, se obtuvieron las RFU del péptido FAM-A β ₁₋₄₂ presente en los 200 μ L de las células control, células con Scrambled A β ₁₋₄₂ y células con A β ₁₋₄₂ (ANEXO XVII).

Luego de tener las RFU, se continuó a realizar la cuantificación de proteínas, y con las absorbancias proporcionadas se realizó una extrapolación de datos para el cálculo de la concentración media de proteínas totales presentes en los 200 μ L de muestra, las absorbancias y concentraciones netas se observan en el ANEXO XVIII y XIX.

Teniendo la concentración de proteínas totales presentes en las células HepG2, se procedió a realizar cálculos para hallar la cantidad de fluorescencia emitida que hay en un miligramo de proteína para luego hacer una relación entre el péptido y la cantidad de proteína total presente en las células HepG2 (RFU/mg proteína). Las RFU por miligramo de proteína neta se pueden ver en el ANEXO XX.

En la Figura 50 podemos ver que las células que estuvieron presentes con el Scrambled FAM- $A\beta_{1-42}$ y con el FAM- $A\beta_{1-42}$ comparadas con el control presentan una diferencia significativa. Lo cual afirma que las células hepáticas tienen gran captación por este péptido.

Además, en la Figura 50 también observamos que las células que estuvieron con Scrambled $A\beta_{1-42}$ comparadas con las células que estuvieron con $A\beta_{1-42}$ presentan una gran diferencia significativa

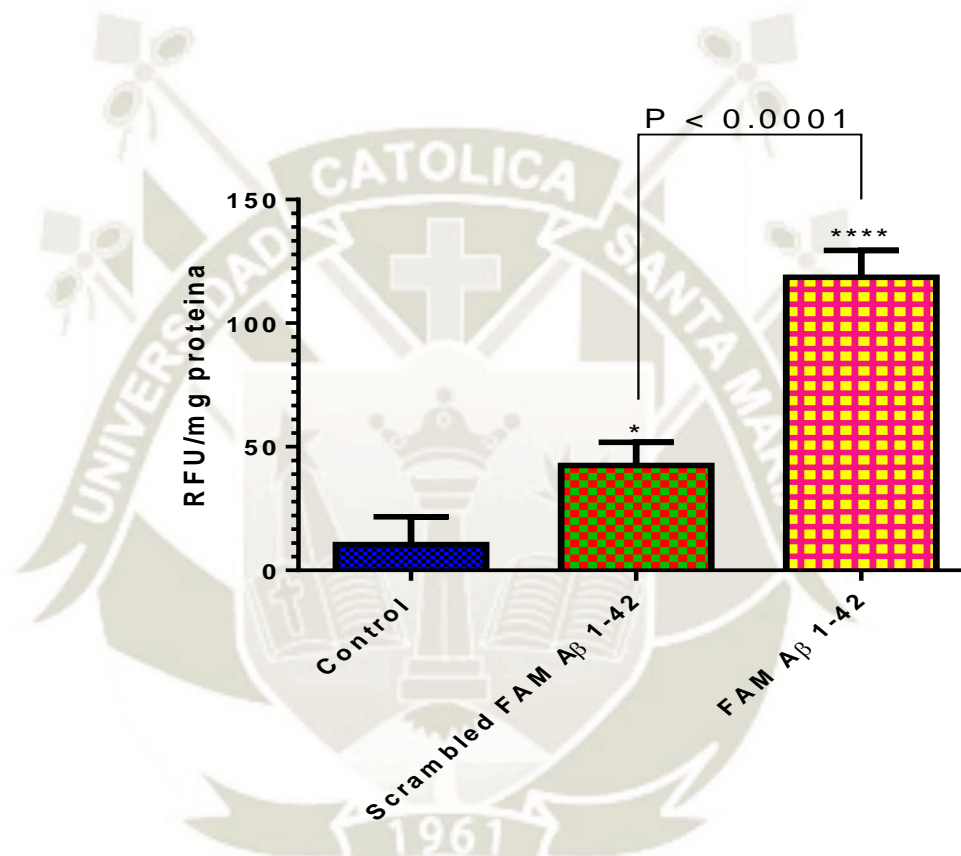


Figura 50: Captación del $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 en células HepG2, comparadas con el Scrambled $A\beta_{1-42}$, para la evaluación de la especificidad del LRP-1. Se realizó un análisis de varianza de una vía y T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6. (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, $n = 3$)

6.2. ELISA

Otro método usado para la determinación de la especificidad del LRP-1 para con el péptido $A\beta_{1-42}$ fue el ELISA, con el cual se determinó cantidad captada del péptido por el LRP-1 (pg/ μ g de proteína).

Como se vio en el capítulo de materiales y métodos, en este proceso primero se realizó la curva de calibración con los estándares de Hu- $A\beta_{1-42}$ (Figura 51), en el cual se generó un gráfico con un algoritmo de 4 parámetros, para proporcionar la mejor curva.

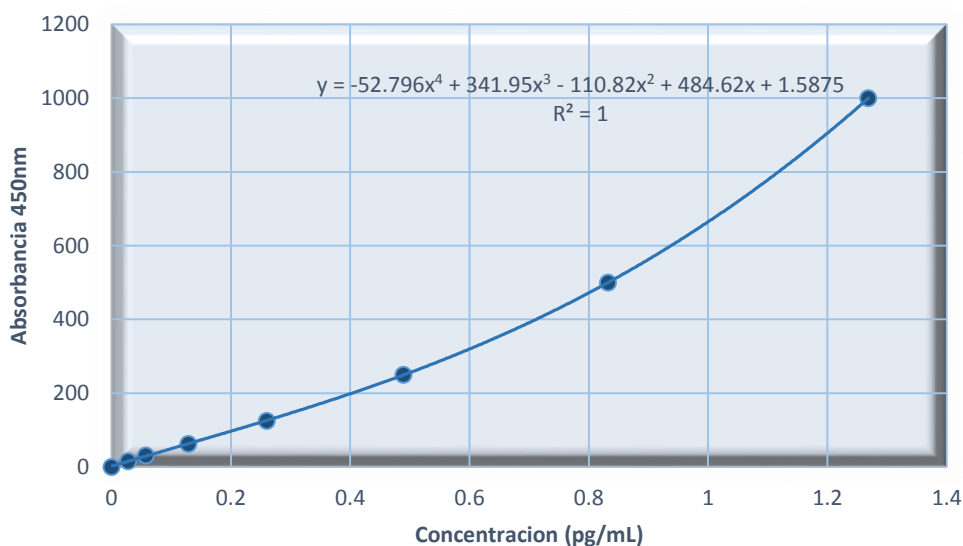


Figura 51: Curva de Calibración de Estándares de Hu- $A\beta_{1-42}$

Luego de realizar la curva de calibración, se procedió a la lectura de la placa con las muestras por el espectrofotómetro a 450nm; con las absorbancias obtenidas se realizó una extrapolación de datos a partir de la curva de calibración para determinar la concentración de péptido que hay en cada pocillo de la placa. Las absorbancias y concentraciones netas la podemos ver en el ANEXO XXI y XXII.

Seguidamente, procedimos a realizar cuantificación de proteínas, y con las absorbancias proporcionadas se realizó una extrapolación de datos para el cálculo de la concentración media de proteínas totales presentes en las células HepG2, las concentraciones y absorbancias netas se observan en el ANEXO XXIII y XXIV.

Teniendo estas concentraciones, se procedió a realizar cálculos para hallar la cantidad de péptido que hay en un microgramo de proteína ($\text{pg}/\mu\text{g}$) y poder hacer una relación entre el péptido y la cantidad de proteína total presente en las células

HepG2. En la Tabla 11 se observó la media de picogramos de péptido por microgramo de proteína, con las cuales se realizó el gráfico y cálculos estadísticos (Figura 52). Los picogramos de péptido por microgramo de proteína netas se pueden ver en el ANEXO XXV.

En la figura 52 se observa que las células que estuvieron con el péptido FAM- $A\beta_{1-42}$ presentan una gran diferencia significativa comparada con las células control y células con Scrambled FAM- $A\beta_{1-42}$.

Tabla 11: Concentración de péptido $A\beta_{1-42}$ por microgramo de proteína en células HepG2 control, scrambled y $A\beta_{1-42}$

	$A\beta_{1-42}$ pg/ μ g		
	Control	Scrambled	$A\beta_{1-42}$
Promedio	0.0145	0.0768	5.4818
Desviación Estándar	0.0033	0.0556	0.4254

Fuente: Elaboración propia

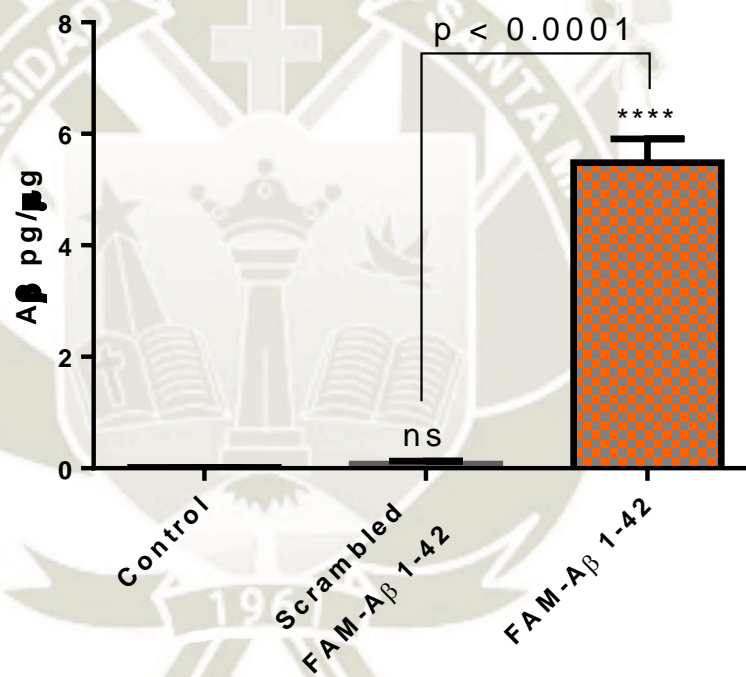


Figura 52: Captación del $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 en células HepG2, comparadas con el Scrambled $A\beta_{1-42}$, para la evaluación de la especificidad del LRP-1. Se realizó un análisis de varianza de una vía y T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6. (**** $p < 0.0001$, $n=3$)

Numerosos estudios revisados acerca del Alzheimer trabajados en células cerebrales, demostraron la captación del péptido $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 usando el método ELISA e inmunofluorescencia^{106, 107, 141}, con el cual se pudo hallar cuantitativamente la cantidad de péptido captado por la célula. Comparándolo con nuestro resultado trabajado en células hepáticas se comprueba la captación del péptido por el receptor LRP-1.

6.3. INMUNOCITOQUÍMICA

Para la determinación de la especificidad del receptor LRP-1 en células HepG2 se realizó también el método de inmunocitoquímica.

Luego de que las células pasaran por los procesos de fijación, bloqueo, inmunotinción y contracoloración, se llevó la placa para la vista al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600), dándonos este las diferentes vistas pertenecientes al FAM- $A\beta_{1-42}$, LRP-1, DAPI y Merge (combinación de todas las vistas)

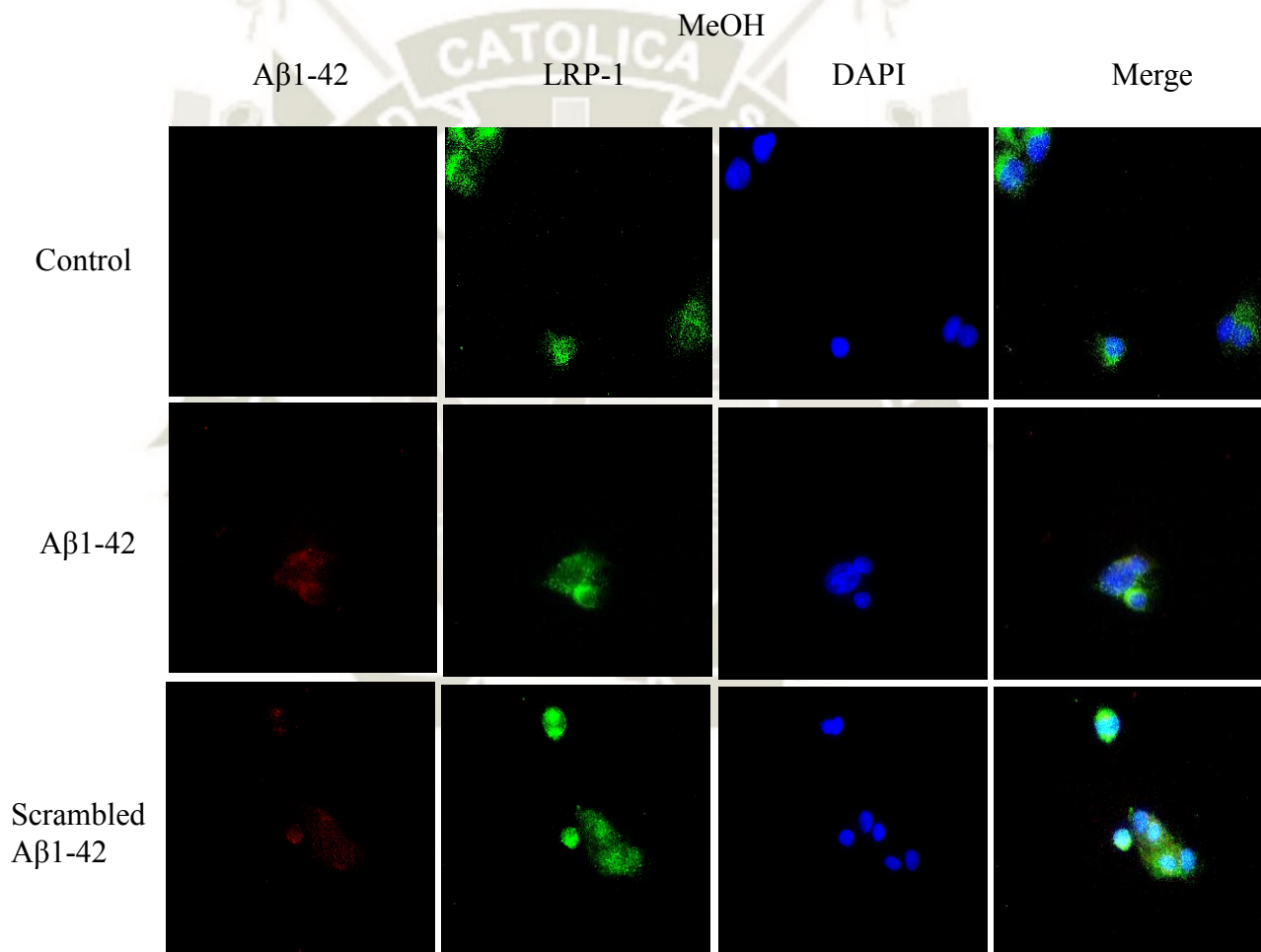


Figura 53: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) pertenecientes al FAM- $A\beta_{1-42}$, LRP-1, DAPI y Merge, de células control, scrambled y $A\beta_{1-42}$. Fijadas con Metanol

Se tomaron 3 fotos de cada vista pertenecientes a diferentes células. En la Figura 53 podemos observar las vistas de las células que se fijaron con MeOH y en la Figura 54 observamos las vistas de las células que se fijaron con PAF.

Haciendo una comparación cualitativa entre las imágenes de la Figura 53, podemos ver que las células que estuvieron presentes con el péptido FAM- $A\beta_{1-42}$ presentan mayor intensidad de color rojo ($A\beta_{1-42}$) comparadas con las células control.

Además, en las imágenes del Merge, la cantidad de $A\beta_{1-42}$ que fue captado por el LRP-1 se ve en la combinación de los colores verde y rojo dando el color amarillo. Como resultado cualitativo se ve en las imágenes que las células que estuvieron presentes con el Scrambled FAM- $A\beta_{1-42}$ presentan menos intensidad de color amarillo dentro de la célula, que las células que estuvieron presentes con el FAM- $A\beta_{1-42}$. En la Figura 54 se observa lo mismo que en la figura 53, pero en este presentan menos intensidad de color.

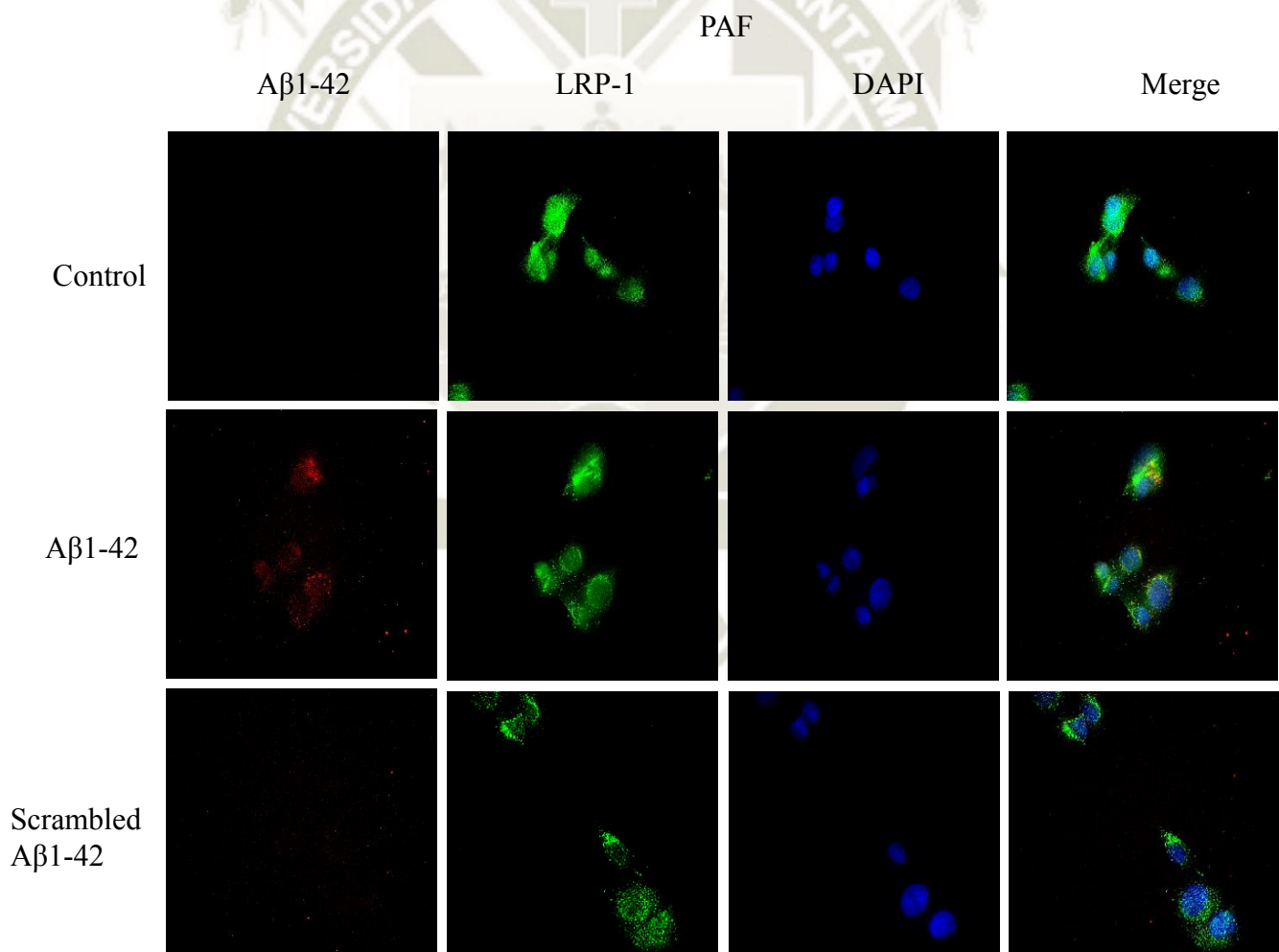


Figura 54: Vistas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) pertenecientes al FAM- $A\beta_{1-42}$, LRP-1, DAPI y Merge, de células control scrambled y $A\beta_{1-42}$. Fijadas con Paraformaldehído.

Para una evaluación cuantitativa, al igual que en la captación con Bafilomicina A1, se realizó la medida del área que ocupaba el $A\beta_{1-42}$ dentro del LRP-1 de la célula (lo rojo dentro de lo verde), es decir, se midió el área del color amarillo en el Merge y este se comparó con el área de LRP-1. Dándonos la cantidad de $A\beta_{1-42}$ captada por el receptor LRP-1. En la Tabla 12 se observa la media de áreas calculadas, de las cuales se sacó el porcentaje de $A\beta_{1-42}$ que fue captado por el LRP-1 en células HepG2 (Tabla 13). Con estos datos se realizó el grafico y cálculos estadísticos (Figura 55), las áreas netas las podemos en el ANEXO XXVI y XXVII. Las áreas fueron medidas con el programa ImageJ Fiji.

En la Figura 55 podemos observar que las células que estuvieron presentes con el FAM- $A\beta_{1-42}$, fijadas con MeOH y PAF, presentan mayor captación de $A\beta_{1-42}$ que las células control y con Scrambled- FAM- $A\beta_{1-42}$, presentando una gran diferencia significativa entre estas.

Además, las células con Scrambled no presentan diferencia significativa comparada con el control. Pero si comparadas con las que estuvieron con FAM- $A\beta_{1-42}$.

Tabla 12: Áreas de $A\beta_{1-42}$ y LRP-1 en células HepG2 con Scrambled y $A\beta_{1-42}$

MEOH					
		$A\beta_{1-42}$		Scrambled-Ab 1-42	
		$A\beta_{1-42}$	LRP-1	$A\beta_{1-42}$	LRP-1
ÁREA		2461.00	28826.00	205.00	22808.00
		9950.00	92787.00	253.00	44494.00
		5172.00	42693.00	238.00	28611.00

PAF					
		$A\beta_{1-42}$		Scrambled-Ab 1-42	
		$A\beta_{1-42}$	LRP-1	$A\beta_{1-42}$	LRP-1
ÁREA		2392.00	42222.00	412.00	41567.00
		3748.00	70923.00	339.00	39456.00
		4140.00	76681.00	128.00	15365.00

Fuente: Elaboración propia

Tabla 13: Porcentaje de A β 1-42 captado por el LRP-1 en células HepG2 con scrambled y A β 1-42

	Porcentaje A β %	
	A β 1-42	Scrambled-Ab 1-42
MEOH	10.11	0.90
	10.72	0.57
	12.11	0.83
Promedio	10.98	0.77
Desviación Estándar	1.03	0.17

	Porcentaje A β %	
	A β 1-42	Scrambled-Ab 1-42
PAF	5.67	0.99
	5.28	0.86
	5.40	0.83
Promedio	5.45	0.82
Desviación Estándar	0.20	0.49

Fuente: Elaboración propia

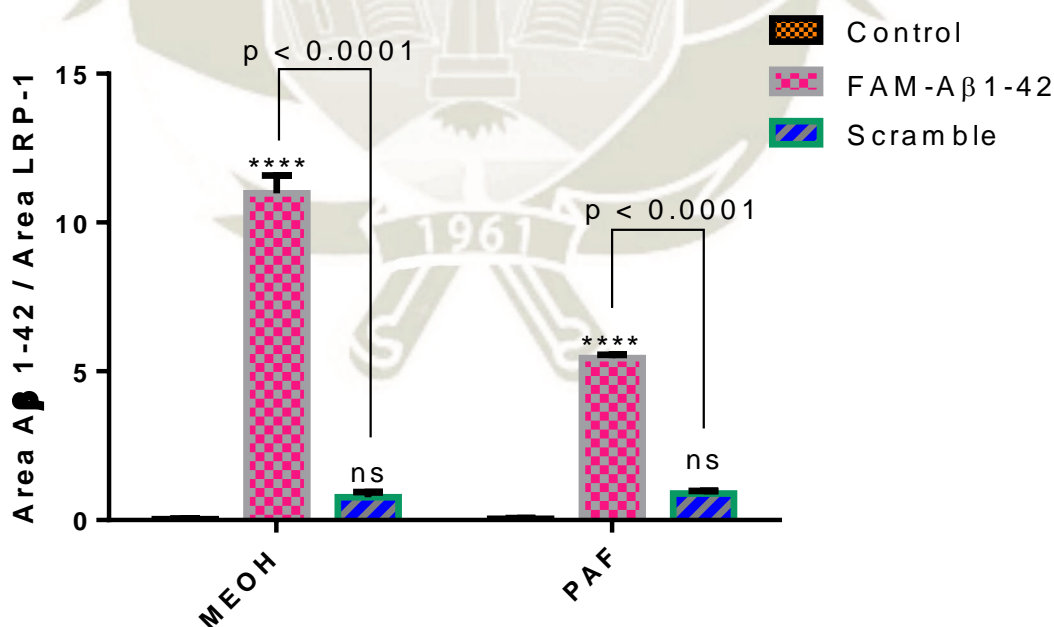


Figura 55: Especificidad del A β 1-42 por el LRP-1 en células HepG2, comparadas con el Scrambled A β 1-42. Se realizó un T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6. (ns > 0.05, **** p<0.0001, n=3)

Con todos estos resultados podemos afirmar que el receptor LRP-1 en las células hepáticas es específico para el péptido $A\beta_{1-42}$. A pesar que se usó un péptido con los mismos aminoácidos, pero estos en diferente orden, el receptor solo captó al $A\beta_{1-42}$, probando así su especificidad para con este péptido.

En contraste con nuestros resultados, en un estudio de Shaked y colaboradores realizaron la evaluación de la unión de $A\beta_{1-42}$ al APP usando Scrambled $A\beta_{1-42}$ demostrando uniones inespecíficas¹⁴². Comparado con nuestro estudio que se evaluó la especificidad del $A\beta_{1-42}$ por el LRP-1 usando Scrambled FAM- $A\beta_{1-42}$ se demostró que si es específico al receptor LRP-1.

Por otro lado, este es el primer estudio usando el método de inmunocitoquímica para la evaluación de unión específica del péptido $A\beta_{1-42}$.

6.4. EXPRESIÓN DE LRP-1

Mediante el BCA se obtuvieron las absorbancias de las muestras, de las cuales a partir de su extrapolación se obtuvo la concentración media de proteínas totales presentes en las células HepG2, las absorbancias y concentraciones netas se observan en el ANEXO XVIII y XIX. Con estos datos se procedió al cálculo de volumen de muestra que se usó para el desarrollo del Western Blot.

Después de ser leída la membrana, se obtuvo la densitometría de bandas de LRP-1 (85 kDa) y β (41 kDa) (Figura 56), las cuales se pueden observar en el ANEXO XXVIII, de acuerdo a la media FC obtenido (Tabla 14). Las células control fueron consideradas en relación a 1 para la comparación con las demás.

En la Figura 57 podemos ver que las células con Scrambled-FAM- $A\beta_{1-42}$ y FAM- $A\beta_{1-42}$ no presentan diferencia significativa del receptor LRP-1 en comparación al control.

Con este resultado se pudo comprobar que las células estuvieron en condiciones iguales para la captación del péptido $A\beta_{1-42}$, demostrando la especificidad del receptor LRP-1 hacia el péptido $A\beta_{1-42}$.

En un estudio de Anja Brenn y colaboradores, usaron el péptido $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{42-1}$ para la evaluación de la reducción de niveles de mRNA de LRP-1, presentando una disminución de niveles de LRP-1 en células con $A\beta_{1-42}$ y niveles normales de LRP-1

en células con $A\beta_{42-1}$ comparadas con el control, confirmando un efecto reductor de $A\beta$ sobre la expresión de LRP1¹⁴³.

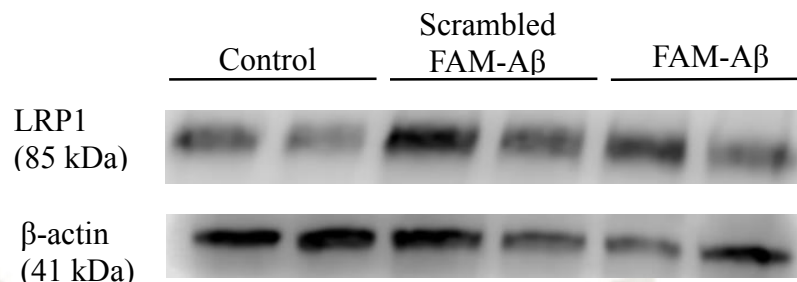


Figura 56: Bandas de LRP-1 en células HepG2. Western Blot

Tabla 14: Niveles de LRP-1 expresados en células HepG2

	Control	Scrambled	Aβ ₁₋₄₂
Promedio	1.014	1.423	1.554
Desviación Estándar	0.389	0.292	0.871

Fuente: Elaboración propia

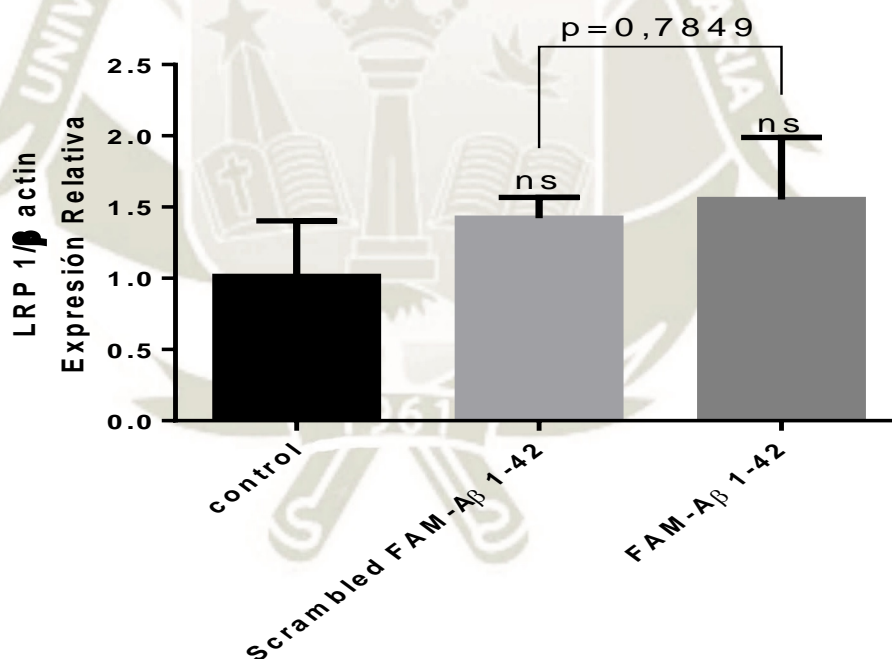


Figura 57: Niveles de expresión de LRP-1 en células HepG2 control, con $A\beta_{1-42}$ y con Scrambled $A\beta_{1-42}$. Se realizó análisis de varianza de una sola vía y T-test no pareado como análisis estadístico realizado en el programa Graph Pad Prism 6.

(ns $p > 0.05$, $n = 3$)



CONCLUSIONES

1. El T0070907 10 μ M disminuye considerablemente los niveles de LRP-1 en células HepG2.
2. Las células tratadas con T0070907 presentaron mayor captación de A β ₁₋₄₂ que las células control, esto debido a que el receptor LRP-1 de la membrana no fue afectado por la droga y es probable que aumente la captación del péptido en células HepG2.
3. La Bafilomicina A1, por su inhibición de la degradación lisosomal, favorece la captación del péptido A β ₁₋₄₂.
4. La captación del péptido A β ₁₋₄₂ es un proceso dependiente del receptor LRP-1 en células HepG2.
5. El receptor LRP-1 en células HepG2 es específico para el péptido A β ₁₋₄₂



SUGERENCIAS

1. Se sugiere hacer más estudios con la droga T0070907, con respecto a su efecto en la disminución del LRP-1 y captación de $A\beta_{1-42}$.
2. Se propone realizar estudios más a profundo con la Bafilomicina A1 como posible tratamiento preventivo de la progresión del Alzheimer.
3. Se plantea realizar el mismo estudio en células cerebrales.



REFERENCIAS

4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. –

1. Castro, Martinez Ana. La enfermedad de Alzheimer: bases moleculares y aproximaciones terapéuticas. Instituto de química médica (csic) [citado en abr 2018] Disponible:<http://www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/intereshtml/alzheimer/alzheimer.htm>
2. Korolev, I. (2014). Alzheimer's disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*, 4 (Fall), 24–33. Retrieved from <http://msrj.chm.msu.edu/wp-content/uploads/2014/12/Fall-2014-AlzheimersDisease.pdf>
3. Alzheimer's Society. (2014). What is Alzheimer's disease? Alzheimer's Society, (July). Retrieved from: https://www.alzheimers.org.uk/info/20007/types_of_dementia/2/alzheimers_disease
4. Alzheimer's Association. (2017). 2017 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement*, 13, 325–373. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.001>
5. Mao, H., Lockyer, P., Li, L., Ballantyne, C. M., Patterson, C., Xie, L., & Pi, X. (2017). Endothelial LRP1 regulates metabolic responses by acting as a co-activator of PPAR α . *Nature Communications*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms14960>
6. Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic B V. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: The role, regulation and restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci*. 2015;7(JUL): 1-12.doi: 10.3389/fnagi.2015.00136.
7. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, et al. Modulation of amyloid β -protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor – related protein pathway. 2000; 106 (9):1159-1166.
8. Serra-Mestres, J. (1998). Depresión y enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurológica*, 1 (1):34-46.
9. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol Reports*. 2015;67 (2):195-203. doi:10.1016/j.pharep.2014.09.004.
10. Alzheimer Society Canada. "Alzheimer's disease." *Alzheimer.ca*. <http://www.alzheimer.ca/en/Aboutdementia/Alzheimer-s-disease> (accessed November 2, 2017).

11. Alzheimer (maladie d') Une maladie neurodégénérative de mieux en mieux comprise. INSERM La science pour la santé – From science to health <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/alzheimer-maladie>
12. Asociacion Peruana de Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias <http://www.alzheimerperu.org/> APEAD
13. Toledano, A., Álvarez, M. I., López-Rodríguez, A. B., Toledano-Díaz, A., & Fernández-Verdecia, C. I. (2012). Does Alzheimer's disease exist in all primates? Alzheimer pathology in non-human primates and its pathophysiological implications (I). *Neurología (English Edition)*, 27(6), 354–369. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2012.07.002>
14. Estructura del cerebro con Alzheimer. Instituto internacional de melatonina Disponible en: <http://www.iimel.es/enfermedad-de-alzheimer>
15. States, U., & Alzheimer, A. (1906). Alzheimer's Disease. Retrieved from: https://www.alz.org/alzheimers-dementia/research_progress/milestones
16. Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., & Monge-Bonilla, C. (2017). Molecular pathogenesis of alzheimer's disease: An update. *Annals of Neurosciences*, 24(1), 46–54. Retrieved from: <https://doi.org/10.1159/000464422>
17. Alzheimer A: Über einen eigenartigen schweren erkrankungsprozeß der hirnrinckle. *Neurol Cent* 1906; 25: 1134. Retrieved from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.664.1065&rep=rep1&type=pdf>
18. Korolev, I. (2014). Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*, 4 (Fall), 24–33. Retrieved from <http://msrj.chm.msu.edu/wp-content/uploads/2014/12/Fall-2014-Alzheimers-Disease.pdf>
19. Diseño de placas seniles por Alois Alzheimer. *Fuente: Maurer k, Volk s, Gerbaldo h. Auguste D and Alzheimer's disease. Lancet.* 1997; 349(9064): 1546-9.
20. Alzheimer: Konrad Maurer, Ulrike Maurer. La vida de un médico y la historia de una enfermedad. Ediciones Díaz de Santos, 2006 - 323 pages. Pag 263. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=dIcS97Q1dYkC&dq=En+1910,+Emil+Krae>

- pelin+denomin%C3%B3+C2%ABenfermedad+de+Alzheimer%C2%BB&hl=fr
&source=gbs_navlinks_s
21. Korolev, I. (2014). Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*, 4 (Fall), 24–33. Retrieved from <http://msrj.chm.msu.edu/wp-content/uploads/2014/12/Fall-2014-Alzheimers-Disease.pdf>
 22. Salawu FK, Umar JT, Olokoba AB. Alzheimers disease: A review of recent developments. *Ann Afr Med*. 2011;10 (2):73-79. doi:Export Date 16 July 2013\rSource Scopus.
 23. M. Niedowicz D, T. Nelson P, Paul Murphy M. Alzheimer's Disease: Pathological Mechanisms and Recent Insights. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(4):674-684. doi:10.2174/157015911798376181.
 24. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1-18. doi:10.1016/j.npep.2015.06.008.
 25. Huang, Y and Mucke L. Cell, Volume 148, Issue 6, 1204-1222 *Fuente: APEX BIO*
Disponible en: <https://www.apexbt.com/alzheimer>
 26. International D. Informe Mundial sobre el Alzheimer 2015 El Impacto Global de la Demencia. 2015.
 27. Custodio N, García A, Montesinos R, Escobar J, Bendezú L. Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú: estudio puerta a puerta TT - Dementia prevalence in a Lima, Peru urban community: door-to-door study. *An la Fac Med*. 2008;69(4) :233-238. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v69n4/a03v69n4.pdf>.
 28. Ministerio de salud (MINSA) [citado en abr 2018] Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/?op=51¬a=6920>
 29. Casos de demencia en el Mundo se triplicaran en 2050. *Fuente: Alzheimer's Disease International*. Disponible en: <https://cdn01.am.infobae.com/adjuntos/163/infografia/011/806/0011806520.jpg?00-00-00-00-00-00>

30. Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015. London, UK. *Alzheimer's Dis Int.* 2015:87. Retrieved from <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>.
31. Instituto Nacional de Ciencias Neurologicas (INCN). Disponible en: <http://www.incn.gob.pe/index.php/menu-estadi/481-estadisticas-2017>
32. Boada, M. (1992). Organizacional model for care and attention of people with demencia in Catalonia. En: Boada, M., Antoine Selmes, M. (eds.). La enfermedad de
33. Alzheimer y otras demencias afines a debate. 4th Conference Systed 91.
34. Fundación Alzheimer España. Barcelona, 1992; 51- 69.
35. Maladie d'Alzheimer. ameli.fr pour les assurés. [citado en may 2018] Disponible en: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/maladie-alzheimer/comprendre-maladie-alzheimer>
36. APEAD Asociación Peruana de Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias [citado en may 2018] Disponible en: <http://www.alzheimerperu.org/factores-riesgo-para-demencias-alzheimer.html>
37. Brossard, A. (2012). pour le DIPLÔME D'ÉTAT par Rôle du pharmacien d'officine dans la prise en charge des patients cancéreux et l'
38. Storck, S. E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J. N., Schubert, N., Spiezio, A. Di, ... Pietrzik, C. U. (2015). Endothelial LRP1 transports amyloid- β 1 – 42 across the blood-brain barrier. *Journal of Clinical Investigation*, 126(21), 1–14. Retrieved from: <https://doi.org/10.1172/JCI81108DS1>
39. Bird, T. D. (2009). Genetic Aspects of Alzheimer Disease. *Health Care*, 10(4), 231–239. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31816b64dc>.Genetic
40. De la Vega, R. y Zambrano, A. *Alzheimer* [en línea]. Circunvalación del Hipocampo, octubre 2013 [Consulta: 4 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.hipocampo.org/alzheimer.asp>
41. Lahiri, D. K., Greig, N. H., Pappolla, M. A., & Sambamurti, K. (2016). Pathways and their Role in Alzheimer's Disease, 12(1), 32–46.
42. Flórez Jesús. Enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. *Revista Síndrome de Down* 2010. Disponible en: <http://www.downcantabria.com/revistapdf/105/63-76.pdf>.

43. Enfermedad de Alzheimer. Clínica, diagnóstico y neuropatología NUEVOS HORIZONTES DE LA RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA Vol. 3 Nos.1 y 2 Enero-Diciembre 2004 Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDREVISTA=55&IDARTICULO=1846&IDPUBLICACION=300&NOMBRE=Plasticidad%20y%20Restauraci%F3n%20Neurol%F3gica>
44. Las fronteras entre el envejecimiento cognitivo normal y la enfermedad de Alzheimer. Revista médica de Uruguay (2003) Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902003000100002
45. Factores de riesgo y protectores para la enfermedad del Alzheimer. Fuente: Revista médica de Uruguay (2012) Disponible en: <http://www.um.edu.uy/docs/alzheimer.pdf>
46. Matters, E. D. (n.d.). 10 WARNING SIGNS OF ALZHEIMER'S DISEASE. (2017)
47. Lu Angelica. Seniors Living with Alzheimer's Disease and Dementia: The Promise of App Technology. [citado may 2018] Retrieved from: <https://scholar.uwindsor.ca/cgi/viewcontent.cgi?article=1014&context=major-papers>
48. Signos de la Enfermedad del Alzheimer a lo largo de cada etapa. Fuente: University of Windsor Scholarship at UWindsor
49. Diagnosticar enfermedad de Alzheimer: cómo se diagnostica la enfermedad de Alzheimer. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048075>
50. Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 20052010. J Neuropathol Exp Neurol 2012; 71: 26673. doi: 10.1097/
51. Korolev I. Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Med Student Res J.* 2014;4(Fall):24-33. Retrieved from: <http://msrj.chm.msu.edu/wp-content/uploads/2014/12/Fall-2014-Alzheimers-Disease.pdf>.
52. Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y de demencia. Alzheimer's Association Retrieved from: https://www.alz.org/documents/greaterillinois/Diagnosis_.pdf

53. Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer. Asociación Peruana de Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. (EA) Disponible en: <https://www.alzheimerperu.org/diagnostico-enfermedad-de-alzheimer.html>
54. Criterios clínicos para probable demencia EA. Fuente: Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. Disponible en: <http://msrj.chm.msu.edu/wp-content/uploads/2014/12/Fall-2014-Alzheimers-Disease.pdf>
55. Tratamiento del Alzheimer. Alzheimer's association. Disponible en: <https://www.alz.org/espanol/treatment/tratamientos.asp>
56. Tratamiento de la Enfermedad del ALZHEIMER. Asociación Peruana de Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. (EA) Disponible en: <https://www.alzheimerperu.org/tratamientos-enfermedad-alzheimer.html>
57. Alzheimer's disease. NHS.UK homepage Your health, your choices. Retrieved from: <https://www.nhs.uk/conditions/alzheimers-disease/treatment/>
58. Ministerio de salud. Informe técnicos para tratamiento de enfermedad neurológicas. Digemid / MINSA. Disponible en: http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/ESEMOTS/11_Evaluacion/9_informes_neuologicas/INFORME_ALZHEIMER.pdf
59. Indicaciones aprobadas para EA. Fuente: Ministerio de Salud MINSA. Disponible en: http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/ESEMOTS/11_Evaluacion/9_informes_neuologicas/INFORME_ALZHEIMER.pdf
60. Contestabile, A., 2011. The history of the cholinergic hypothesis. Behav. Brain Res. 221, 334–340.
61. Terry AV Jr, Buccafusco JJ: The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. J Pharmacol Exp Ther 2003; 306: 821– 827.
62. Schaeffer EL, Gattaz WF: Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. Psychopharmacology (Berl) 2008; 198: 1–27.
63. Davies, P., Maloney, A.J.F., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet 2, 1403
64. Lleo, A., Greenberg, S.M., Growdon, J.H., 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. Annu. Rev.Med. 57, 513–533.

65. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):1–23.
66. Jameson, L.; Frey, T.; Zeeberg, B.; Dalldorf, F.; Caplow, M. Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 1980, 19, 2472–2479. [CrossRef] [PubMed]
67. Mandelkow E. Tau in Alzheimer ' s disease. 1998;8924(98):425–7.
68. Wischik, C.M.; Crowther, R.A.; Stewart, M.; Roth, M. Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 1985, 100, 1905–1912. [CrossRef] [PubMed]
69. Laferla FM. Amyloid- β and tau in Alzheimer ' s disease. 2008;27544.
70. Armstrong RA. A critical analysis of the ' amyloid cascade hypothesis . ' 2014;52(3):211–25.
71. Evin, G.,Weidemann, A., 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23, 1285–1297.
72. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* [Internet]. 2015;52:1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
73. Reitz C. Alzheimer ' s Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis : A Critical Review. 2012;2012.
74. J. A. Hardy and G. A. Higgins, "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis," *Science*, vol. 256, no. 5054, pp. 184–185, 1992.
75. Evin, G.,Weidemann, A., 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23, 1285–1297.
76. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* [Internet]. 2002;297(5580):353–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130773>
77. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV: Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; 8: 16–30.
78. Bates K a, Verdile G, Li Q-X, Ames D, Hudson P, Masters CL, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2009;14(5):469–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794889>

79. Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplows DB. Mutations Associated with a Locus for Familial Alzheimer ' s Disease Result in Alternative Processing of Amyloid P-Protein Precursor *. 1994;
80. M. Niedowicz D, T. Nelson P, Paul Murphy M. Alzheimer's Disease: Pathological Mechanisms and Recent Insights. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(4):674–84.
81. Neve RL, Mcphie DL, Chen Y. Alzheimer ' s disease : a dysfunction of the amyloid precursor protein 1. 2000;886:54–66.
82. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer ' s disease. *Mol Brain* [Internet]. 2011;4(1):3. Available from: <http://www.molecularbrain.com/content/4/1/3>
83. Richard J. O'Brien¹ and Philip C. Wong. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease (NIH Public Access). 2011;1987:185–204.
84. Zinser EG, Hartmann T, Grimm MOW. Amyloid beta-protein and lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2007;1768(8):1991–2001. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273607000636>
85. T. Iwatsubo, A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, Y. Ihara, Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end- specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43), *Neuron* 13 (1994) 45–53.
86. R.C. von Rotz, B.M. Kohli, J. Bosset, M. Meier, T. Suzuki, R.M. Nitsch, U. Konietzko, The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor, *J. Cell Sci*. 117 (2004) 4435–4448.
87. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W et al (1996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 2: 864 – 870
88. Selkoe DJ, Hardy J, Selkoe D, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer ' s disease at 25 years. 2016;1–14.
89. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Gundula G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391: 387 – 390

90. Shen J, Kelleher RJ 3rd. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:403–9. [PubMed: 17197420]
91. L'Hernault, S.W., Arduengo, P.M., 1992. Mutation of a putative sperm membrane protein in *Caenorhabditis elegans* prevents spermdifferentiation but not its associated meiotic divisions. *J. Cell Biol.* 119, 55–68.
92. Li, X., Greenwald, I., 1996. Membrane topology of the *C. elegans* SEL-12 presenilin. *Neuron* 17, 1015–1021.
93. Huynh T V, Davis AA, Ulrich JD, Holtzman DM. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease : The influence of apoE on amyloid- β and other amyloidogenic proteins.
94. Mahley, R.W., 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622–630.
95. Ma, J., Yee, A., Brewer Jr., H.B., Das, S., Potter, H., 1994. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta- protein into filaments. *Nature* 372, 92–94
96. Weisgraber, K.H., Rall Jr., S.C., Mahley, R.W., 1981. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine–arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J. Biol. Chem.* 256, 9077–9083.
97. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
98. Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Cell Tissue Distribution of the 2-macroglobulin receptor / low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. 1992:375-376.
99. Emonard H, Théret L, Bennasroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: Make the point. *Pathol Biol.* 2014;62(2):84-90. doi:10.1016/j.patbio.2014.02.002.
100. Lillis AP, Duyn LB Van, Murphy-ullrich JE, Dudley K. The low density lipoprotein receptor-related protein 1: Unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. 2009;88(3):887-918. doi:10.1152/physrev.00033.2007.
101. Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic B V. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: The role, regulation and

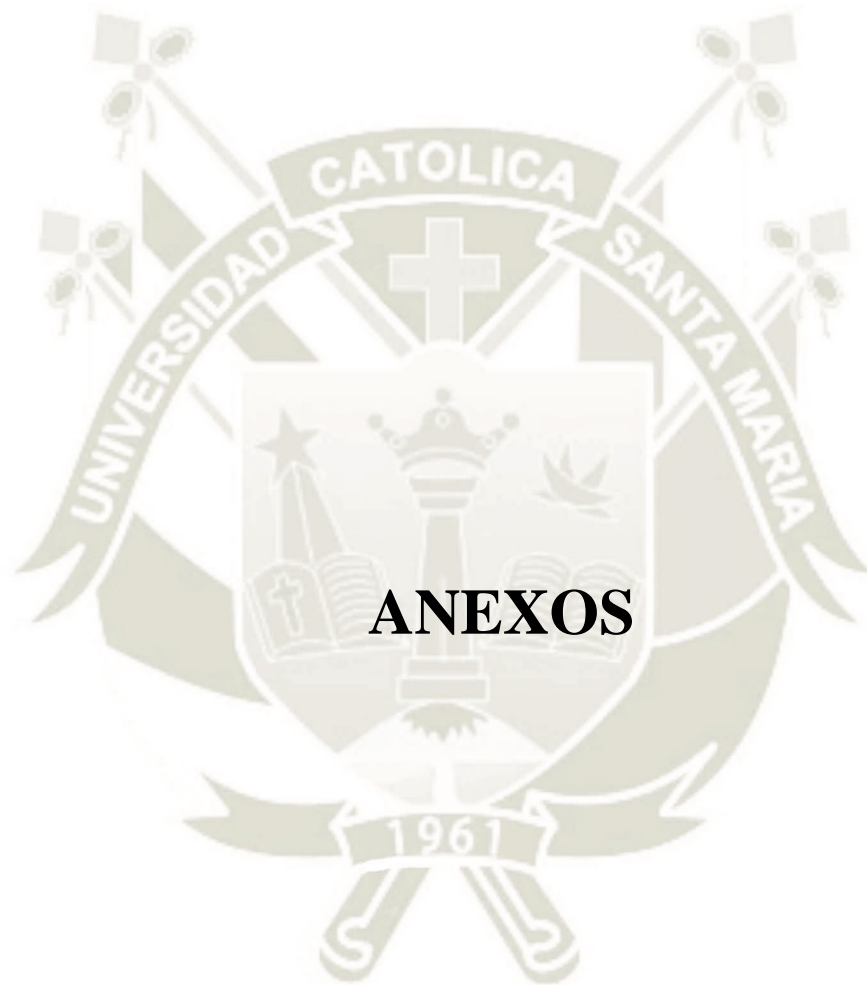
- restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci.* 2015;7(JUL):1-12. doi:10.3389/fnagi.2015.00136.
102. Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ, Katzman R. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997; 49:56–61. [PubMed: 9222170]
 103. Narita M, Holtzman DM, Schwartz AL, Bu G. Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem.* 1997; 69:1904–1911. [PubMed: 9349534]
 104. Abhay P. Sagarea, Rashid Deaneb, and Berislav V. Zlokovic. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological A β homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities. 2012: 136(1): 94–105.
 105. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Spiezio A Di, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- β 1 – 42 across the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 2015;126(21):1–14.
 106. Kang DE, et al. Modulation of amyloid β -protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest.* 2000;106(9):1159–1166.
 107. Kanekiyo T, Cirrito JR, Liu C-C, Shinohara M, Li J, Schuler DR, et al. Neuronal Clearance of Amyloid- β by Endocytic Receptor LRP1. *J Neurosci* [Internet]. 2013;33(49):19276–83. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3487-13.2013>
 108. Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic B V. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: The role, regulation and restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci.* 2015;7(JUL):1–12.
 109. Emonard, H., Théret, L., Bennisroune, A. H., and Dedieu, S. (2014). Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol. Biol. (Paris)* 62, 84–90. doi: 10.1016/j.patbio.2014.02.002
 110. Sagare, A. P., Bell, R. D., Srivastava, A., Sengillo, J. D., Singh, I., Nishida, Y., et al. (2013a). A lipoprotein receptor cluster IV mutant preferentially binds amyloid- β and regulates its clearance from the mouse brain. *J. Biol. Chem.* 288, 15154–15166. doi: 10.1074/jbc.m112.439570

111. Zlokovic, B. V., Deane, R., Sagare, A. P., Bell, R. D., and Winkler, E. A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain. *J. Neurochem.* 115, 1077–1089. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07002.
112. Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., et al. (2004). LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms. *Neuron* 43, 333–344. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.017
113. Sagare, A., Deane, R., Bell, R. D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., et al. (2007). Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat. Med.* 13, 1029–1031. doi: 10.1038/nm1635
114. Tamaki, C., Ohtsuki, S., Iwatsubo, T., Hashimoto, T., Yamada, K., Yabuki, C., et al. (2006). Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver. *Pharm. Res.* 23, 1407–1416. doi: 10.1007/s11095-006-0208-7
115. Lee G, Elwood F, McNally J, et al. T0070907, a Selective Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ , Functions as an Antagonist of Biochemical and Cellular Activities *. 2002;277(22):19649-19657. doi:10.1074/jbc.M200743200.
116. Semple RK, Chatterjee VKK, Rahilly SO. Review series PPAR γ and human metabolic disease. 2006;116(3):581-589. doi: 10.1172/JCI28003.taglandin.
117. Gauthier A, Vassiliou G, Benoist F, Mcpherson R. Adipocyte Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Gene Expression and Function Is Regulated by Peroxisome Proliferator- activated Receptor γ *. 2003;278(14):11945-11953. doi:10.1074/jbc.M212989200.
118. Moon JH, Kim HJ, Kim HM, et al. Upregulation of hepatic LRP1 by rosiglitazone : a possible novel mechanism of the beneficial effect of thiazolidinediones on atherogenic dyslipidemia. 2004:165-174. doi:10.1530/JME-12-0119.
119. Mizushima N, Komatsu M. Review Autophagy : Renovation of Cells and Tissues. *Cell.* 2011;147(4):728-741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
120. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. 2010;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697.Autophagy.
121. Mauvezin C, Neufeld TP. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent

- autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2015;11(8):1437-1438. doi:10.1080/15548627.2015.1066957.
122. Towbin H, Staehelint T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. 1979;76(9):4350-4354.
123. Mahmood T, Yang P. Western Blot : Technique , Theory , and Trouble Shooting. 2012;4(9). doi:10.4103/1947-2714.100998.
124. Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol*. 2016;133(9):1-3. doi:10.1038/jid.2013.287.
125. P.K.Smith, Abstract of Measurement of protein using bicinchoninic acid [en línea]. USA: Elsevier science direct. [fecha de acceso 25 de mayo del 2017]. URL disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269785904427?via%3Dihub>
126. Myers JD. Development and application of immunocytochemical staining techniques: A review. *Diagn Cytopathol*. 1989;5(3):318-330. doi:10.1002/dc.2840050317.
127. Matos LL De, Trufelli DC, Graciela M, Matos L De. Biomarker Insights Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. :9-20.
128. Kabiraj A, Gupta J, Khaitan T, Bhattacharya PT. PRINCIPLE AND TECHNIQUES OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY – A REVIEW. 2015;6(2):5204-5210.
129. Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol*. 2016;133(9):1-3. doi:10.1038/jid.2013.287.
130. Elisa ROF. immunosorbent assay (ELISA) *. 1976;54:129-139.
131. Overview of ELISA [en línea]. USA: Thermo Fisher Scientific. [fecha de acceso 15 de julio del 2017]. URL disponible en: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>
132. Apaza LMM, Torres PSC, Jakowenko N, Ortiz ANR, Pino-figueroa A. Optimización y comparación de los Buffer de lisis M-PER y SDS para la obtención del péptido

- internalizado Amiloide beta 1-42 en células Hepáticas G2 (HepG2), 2017 (Mayo).1-3.
133. Rondón-ortiz AN, Cardenas CLL, Martínez-málaga J, Gonzales-urday AL, Gugnani KS, Böhlke M, et al. High Concentrations of Rosiglitazone Reduce mRNA and Protein Levels of LRP1 in HepG2 Cells. 2017;8(November):1–12.
 134. Moon JH, Kang SB, Park JS, Lee BW, Kang ES, Ahn CW, et al. Up-regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein 1: A possible novel mechanism of antiatherogenic activity of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor: Atorvastatin and hepatic LRP1 expression. *Metabolism*. 2011;60(7):930–40.
 135. Alemi M, Gaiteiro C, Ribeiro CA, Santos LM, Gomes JR, Oliveira SM, et al. Transthyretin participates in beta- amyloid transport from the brain to the liver- involvement of the low- density lipoprotein receptor-related protein 1 ? *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016;(December 2015):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20164>
 136. Mu H, Lin K, Zhao H, Xing S, Li C, Liu F, et al. Identification of biomarkers for hepatocellular carcinoma by semiquantitative immunocytochemistry. 2014;20(19):5826–38.
 137. Zolezzi JM, Santos MJ, Bast??as-Candia S, Pinto C, Godoy JA, Inestrosa NC. PPARs in the central nervous system: Roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biol Rev*. 2017;
 138. Tamaki C, Ohtsuki S, Iwatsubo T, Hashimoto T, Yamada K, Yabuki C, Terasaki T. Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver. *Pharm Res*. 2006; 23:1407–1416. [PubMed: 16779710]
 139. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, et al. Clearance of amyloid- β by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med* [Internet]. 2007 Aug 12;13:1029. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1635>
 140. Sutcliffe JG, Hedlund PB, Thomas EA, Bloom FE, Hilbush BS. Peripheral Reduction of b -Amyloid Is Sufficient To Reduce Brain b -Amyloid : Implications for Alzheimer ' s Disease. 2011;814(November 2010):808–14.
 141. Moon JH, Kim HJ, Yang AH, Kim HM, Lee B-W, Kang ES, et al. The effect of rosiglitazone on LRP1 expression and amyloid β uptake in human brain

- microvascular endothelial cells: a possible role of a low-dose thiazolidinedione for dementia treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2012;15(1):135–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22040807>
142. Shaked, G.M. & Kummer, Markus & Lu, D.C. & Galvan, Veronica & Bredesen, D.E. & Koo, Edward. (2006). A induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 20. 1254-6. 10.1096/fj.05-5032fje.
143. Liu C, Hu J, Zhao N, Wang XJ, Wang N, Cirrito XJR, et al. Astrocytic LRP1 Mediates Brain A β Clearance and Impacts Amyloid Deposition. 2017;37(15):4023–31.
144. TOCRIS a bio-technique-brand. Bafilomycin A1. Disponible en: <https://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=2352#.WXHowIgrI2w>
145. TOCRIS a bio-technique-brand. T0070907. Disponible en: <https://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=138569#.WXHoh4grI2w>
146. BIO-RAD. Introduction to Western Blotting. Disponible en: <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blotting-immunoblotting-introduction.html>
147. Sembrado Celular. Disponible en: www.consalud.es
148. Biología molecular ,2e. Disponible en: www.accessmedicina.com
149. Abyntec. Western blot transfer.png. Disponible en: <http://www.abyntek.com/guia-para-solucionar-problemas-en-western-blot/>



ANEXO I

ABSORBACIAS DE ALBÚMINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

	Albúmina ($\mu\text{g/mL}$)					
	2000	1000	500	250	125	0
ABSORBANCIA	0.954	0.489	0.313	0.205	0.145	0.073
	0.948	0.536	0.307	0.202	0.142	0.072
	1.001	0.558	0.330	0.205	0.145	0.075
Promedio	0.968	0.528	0.317	0.204	0.144	0.073
Desviación estándar	0.029	0.035	0.012	0.002	0.002	0.002

ANEXO II

ABSORBANCIAS DE PROTEÍNAS TOTALES EN CÉLULAS HepG2

	Control	M1	M2	M3	M4	M5
ABSORBANCIA	0.115	0.128	0.115	0.123	0.111	0.125
	0.118	0.127	0.107	0.123	0.115	0.129
	0.120	0.129	0.115	0.122	0.112	0.125
Promedio	0.118	0.128	0.112	0.123	0.113	0.126
Desviación Estándar	0.003	0.001	0.005	0.001	0.002	0.002

ANEXO III

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN CÉLULAS HepG2

	Control	M1	M2	M3	M4	M5
CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	273.500	278.500	286.000	253.500	253.500	243.500
	273.500	288.500	283.500	261.000	261.000	253.500
	271.000	278.500	288.500	266.000	253.500	246.000
Promedio	272.667	281.833	286.000	260.167	256.000	247.667
Desviación Estándar	1.443	5.774	2.500	6.292	4.330	5.204

ANEXO IV

DENSITOMETRÍA DE BANDAS DE LRP-1 EN CÉLULAS HepG2

	CONTROL	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5
LRP-1	139811.50	188781.38	142318.50	163214.50	156724.63	137859.75
	92070.63	44627.06	101783.38	83981.00	94148.75	76327.75
	119146.19	45964.31	127325.75	108397.81	111045.25	116797.13
β-Actina	89906.844	135784.250	108129.938	112501.438	114549.125	124741.250
	70563.563	30425.813	64790.313	60324.656	66693.281	63658.844
	90194.281	33223.219	90010.438	80096.625	81633.063	81360.500
	1.00000	0.89405	0.84638	0.93293	0.87982	0.71069
	1.00000	1.12413	1.20400	1.06695	1.08191	0.91893
	1.00000	1.04732	1.07083	1.02448	1.02975	1.08672
Promedio	1.00000	1.02183	1.04040	1.00812	0.99716	0.90545
Desviación estándar	0.00000	0.09564	0.14757	0.05592	0.08566	0.15381

ANEXO V

**ABSORBANCIAS DE PROTEÍNAS TOTALES EN CÉLULAS HepG2 TRATADAS
CON T0070907**

	Control	T0070907
ABSORBANCIAS	0.333	0.221
	0.310	0.217
	0.322	0.230
	0.229	0.227
	0.305	0.217
	0.318	0.217
	0.390	0.227
	0.322	0.267
	0.388	0.259
	Promedio	0.324
Desviación Estándar	0.048	0.019

ANEXO VI

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN CÉLULAS HepG2
TRATADAS CON T0070907

	Control	T0070907
	357.94	171.28
	319.61	164.61
	339.61	186.28
	336.28	181.28
	311.28	164.61
	332.94	164.61
	303.67	181.28
	339.06	149.92
	301.17	187.33
Promedio	326.84	172.35
Desviación Estándar	19.03	12.56

ANEXO VII

DENSITOMETRÍA DE BANDAS DE LRP-1 EN CÉLULAS HepG2 TRATADAS CON T0070907

	CONTROL	T0070907
LRP-1	88544.56	29037.88
	86933.13	32585.25
	114733.81	36920.06
	306006.13	47085.75
	232058.75	46746.25
	202852.25	66401.31
β-Actina	469379.75	426155.38
	462872.25	296833.38
	467913.63	338001.63
	566026.25	493889.88
	573930.00	499728.50
	565305.75	561223.88
	0.91035	0.32883
	0.90635	0.52976
	1.18330	0.52713
	1.24396	0.21937
	0.93036	0.21524
	0.82568	0.27224
Promedio	1.00000	0.23562
Desviación Estándar	0.17772	0.02595

ANEXO VIII

UNIDADES DE FLUORESCENCIA RELATIVA EN CÉLULAS HepG2 CONTROL Y TRATADAS CON T0070907

0h		0.5h		1h		2h		4h		6h	
Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907
0	2	20	66	31	21	16	13	25	47	27	16
1	1	23	54	34	57	29	22	29	52	32	22
1	4	29	50	55	110	33	57	36	24	30	14

ANEXO IX

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN CÉLULAS HepG2 CONTROL Y TRATADAS CON T0070907

PROTEÍNA mg/mL

	0h		0.5h		1h		2h		4h		6h	
	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907
CONCENTRACION	0.111	0.154	0.120	0.092	0.117	0.072	0.150	0.096	0.117	0.082	0.167	0.083
	0.113	0.093	0.151	0.090	0.088	0.081	0.137	0.088	0.099	0.079	0.165	0.087
	0.100	0.134	0.112	0.094	0.096	0.078	0.174	0.094	0.119	0.081	0.177	0.087
Promedio	0.108	0.127	0.128	0.092	0.100	0.077	0.153	0.093	0.111	0.081	0.170	0.086
Desviación Estándar	0.007	0.031	0.021	0.002	0.015	0.005	0.019	0.004	0.011	0.001	0.007	0.002

ANEXO X

ABSORBANCIAS DE PROTEÍNAS TOTALES EN CÉLULAS HepG2 CONTROL Y TRATADAS CON T0070907

	0h		0.5h		1h		2h		4h		6h	
	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907
ABSORBANCIAS	0.183	0.241	0.195	0.158	0.192	0.131	0.238	0.167	0.194	0.147	0.261	0.149
	0.186	0.159	0.237	0.155	0.153	0.144	0.220	0.156	0.170	0.144	0.258	0.154
	0.169	0.215	0.185	0.161	0.163	0.140	0.271	0.164	0.197	0.146	0.275	0.154
Promedio	0.179	0.205	0.206	0.158	0.169	0.138	0.243	0.162	0.187	0.146	0.265	0.152
Desviación Estándar	0.009	0.042	0.028	0.003	0.020	0.006	0.026	0.006	0.015	0.002	0.009	0.003

ANEXO XI

UNIDADES DE FLUORESCENCIA RELATIVA POR MILIGRAMO DE PROTEÍNA EN CÉLULAS HepG2

RFU/mg de proteína

	Control						T0070907					
	0h	0.5h	1h	2h	4h	6h	0h	0.5h	1h	2h	4h	6h
	0.000	166.980	317.136	187.683	416.138	170.616	0.000	721.114	595.745	419.355	574.748	374.269
	0.000	152.041	386.254	187.260	473.469	174.863	0.000	601.504	571.230	435.644	655.944	345.098
	0.000	241.557	187.593	189.356	466.019	176.731	0.000	530.363	703.487	342.768	732.824	200.717
Promedio	0.000	186.859	296.994	188.100	451.876	174.070	0.000	617.661	623.487	399.256	654.506	306.695
Desviación estándar	0.000	47.955	100.850	1.108	31.173	3.133	0.000	96.396	70.358	49.593	79.048	92.931

ANEXO XII

DENSITOMETRÍA DE BANDAS DE LRP-1 EN CÉLULAS HepG2 TRATADAS CON T0070907 A DIFERENTES TIEMPOS

	0h		0.5h		1h		2h		4h		6h	
	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907	Control	T0070907
LRP-1	32657.75	6506.38	45420.81	13840.63	43759.94	8506.75	61995.13	14368.31	53094.91	11584.22	66362.22	12658.83
	57475.78	1481.42	26384.19	12570.94	29653.00	18470.92	67018.00	9801.00	60193.25	31459.25	67234.00	32389.75
β-Actin	59259.06	132234.63	109532.94	69386.56	102110.44	34424.13	17705.66	74482.44	6089.39	48710.97	4359.19	71298.13
	172654.56	1335.85	137513.88	3807.75	196183.13	3548.39	65085.69	47141.38	63358.00	70150.69	36284.06	56641.75
Promedio	1.00	0.13	1.00	0.88	1.00	0.36	1.00	0.54	1.00	0.34	1.00	0.41
	1.00	0.19	1.00	0.76	1.00	0.58	1.00	0.65	1.00	0.47	1.00	0.31
Desviación Estándar	1.00	0.16	1.00	0.82	1.00	0.47	1.00	0.59	1.00	0.41	1.00	0.36
	0.00	0.05	0.00	0.09	0.00	0.16	0.00	0.08	0.00	0.09	0.00	0.07

ANEXO XIII

ABSORBANCIAS DE PROTEÍNAS PRESENTES EN CITOSOL Y MEMBRANA DE CÉLULAS HepG2 TRATADAS CON T0070907

	Citosol		Membrana	
	Control	T0070907	Control	T0070907
Absorbancias	0.254	0.227	0.390	0.311
	0.245	0.233	0.362	0.306
	0.236	0.224	0.371	0.304
Promedio	0.245	0.228	0.374	0.307
Desviación Estándar	0.009	0.005	0.014	0.004

ANEXO XIV

**CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES PRESENTES EN CITOSOL Y
MEMBRANA EN CÉLULAS HepG2 TRATADAS CON T0070907**

	Citosol		Membrana	
	Control	T0070907	Control	T0070907
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	164.167	130.417	334.167	235.417
	152.917	137.917	299.167	229.167
	141.667	126.667	310.417	226.667
Promedio	152.917	131.667	314.583	230.417
Desviación Estándar	11.250	5.728	17.868	4.507

ANEXO XV

**ÁREA DE $A\beta_{1-42}$ Y LRP-1 EN CÉLULAS HepG2 TRATADAS CON
BAFILOMICINA, (ICC) FIJADAS CON METANOL**

	$A\beta_{1-42}$		BAF-Ab 1-42	
	$A\beta_{1-42}$	LRP-1	$A\beta_{1-42}$	LRP-1
ÁREA	2461.00	24336.00	6350.00	18335.00
	9950.00	92787.00	23305.00	55791.00
	5172.00	42693.00	18336.00	44532.00

ANEXO XVI

**ÁREA DE $A\beta_{1-42}$ Y LRP-1 EN CÉLULAS HepG2 TRATADAS CON
BAFILOMICINA, (ICC) FIJADAS CON PARAFORMALDEHIDO**

	$A\beta_{1-42}$		BAF-Ab 1-42	
	$A\beta_{1-42}$	LRP-1	$A\beta_{1-42}$	LRP-1
ÁREA	2392.00	42222.00	4144.00	35305.00
	3748.00	70923.00	10937.00	100989.00
	4140.00	76681.00	4392.00	40249.00

ANEXO XVII

**UNIDADES DE FLUORESCENCIA RELATIVA DE CÉLULAS HepG2
CONTROL, SCRAMBLED Y A β 1-42**

Control	Scrambled	A β 1-42
0	0	2
1	2	2
1	1	3
0	0	9
1	3	8
2	4	12
0	2	6
1	4	6
2	3	7

ANEXO XVIII

**ABSORBANCIAS DE PROTEÍNAS TOTALES DE CÉLULAS HepG2 CONTROL,
SCRAMBLED Y A β 1-42**

	Control	Scrambled	A β 1-42
	0.2007	0.1127	0.0983
	0.1383	0.1010	0.0950
	0.1703	0.0870	0.1010
	0.1493	0.1893	0.1607
ABSORBANCIA	0.2017	0.1523	0.1433
	0.1513	0.1477	0.1623
	0.3450	0.1743	0.1397
	0.3257	0.1963	0.1777
	0.3497	0.1530	0.1570
Promedio	0.23	0.15	0.14
Desviación Estándar	0.09	0.04	0.03

ANEXO XIX

**CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE CÉLULAS HepG2
CONTROL, SCRAMBLED Y A β 1-42**

	PROTEÍNA mg/mL		
	Control	Scrambled	Aβ1-42
	0.0307	0.0111	0.0079
	0.0168	0.0085	0.0072
	0.0239	0.0054	0.0085
	0.0193	0.0282	0.0218
CONCENTRACIÓN	0.0309	0.0199	0.0179
	0.0197	0.0189	0.0222
	0.0628	0.0248	0.0171
	0.0585	0.0297	0.0256
	0.0638	0.0201	0.0210
Promedio	0.0363	0.0185	0.0166
Desviación Estándar	0.0197	0.0086	0.0070

ANEXO XX

**UNIDADES DE FLUORESCENCIA RELATIVA POR MILIGRAMO DE
PROTEÍNA EN CÉLULAS HepG2 CONTROL, SCRAMBLED Y A β 1-42**

	RFU/mg de proteína		
	Control	Scrambled	Aβ1-42
	0.0000	0.0000	83.9552
	19.8063	78.1250	92.5926
	13.9233	61.4754	117.1875
	0.0000	0.0000	137.6615
	10.7862	50.1486	148.6375
	33.8092	70.5329	180.4813
	0.0000	26.8496	116.7820
	5.7020	44.8654	78.2155
	10.4505	49.7788	111.2288
Promedio	10.50	42.42	118.53
Desviación Estándar	11.16	28.26	32.91

ANEXO XXI

**ABSORBANCIA DE PÉPTIDO A β 1-42 PRESENTE EN CÉLULAS HepG2
CONTROL, SCRAMBLED Y A β 1-42**

	Control	Scrambled	Aβ1-42
ABSORBANCIA	0.0025	0.0045	1.2575
	0.0025	0.0060	1.2330
	0.0005	0.0120	1.1945
Promedio	0.0018	0.0075	1.2283
Desviación Estándar	0.0012	0.0040	0.0318

ANEXO XXII

**CONCENTRACIÓN PÉPTIDO A β 1-42 POR MILILITRO DE MUESTRA EN
CÉLULAS HepG2 CONTROL, SCRAMBLED Y A β 1-42**

	PROTEÍNA pg/mL		
	Control	Scrambled	Aβ1-42
CONCENTRACIÓN	2.7984	3.7661	983.7039
	2.7984	4.4913	949.6101
	1.8298	7.3876	897.6624
Promedio	2.4755	5.2150	943.6588
Desviación Estándar	0.5592	1.9161	43.3284

ANEXO XXIII

**ABSORBANCIA DE PROTEÍNAS TOTALES DE CÉLULAS HepG2 CONTROL,
SCRAMBLED Y A β 1-42**

	Control	Scrambled	Aβ1-42
ABSORBANCIA	0.1410	0.0870	0.1470
	0.1360	0.1893	0.1517
	0.1390	0.1743	0.1227
Promedio	0.1387	0.1502	0.1404
Desviación Estándar	0.0025	0.0553	0.0156

ANEXO XXIV

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE CÉLULAS HepG2
CONTROL, SCRAMBLED Y A β 1-42

	PROTEÍNA μ g/mL		
	Control	Scrambled	A β 1-42
CONCENTRACIÓN	173.7320	125.2593	181.0830
	167.6200	140.8148	186.8132
	171.2857	124.1481	151.3837
Promedio	170.8792	130.0741	173.0933
Desviación Estándar	3.0762	9.3183	19.0181

ANEXO XXV

CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO A β 1-42 EN UN MICROGRAMO DE
PROTEÍNA DE CÉLULAS HepG2 CONTROL, SCRAMBLED Y A β 1-42

	A β 1-42 pg/ μ g		
	Control	Scrambled	A β 1-42
CONCENTRACIÓN	0.0161	0.1389	5.4323
	0.0167	0.0319	5.0832
	0.0107	0.0595	5.9297
Promedio	0.0145	0.0768	5.4818
Desviación Estándar	0.0033	0.0556	0.4254

ANEXO XXVI

ÁREA DE A β 1-42 Y LRP-1 EN CÉLULAS HepG2 CON SCRAMBLED Y A β 1-42,
(ICC) FIJADAS CON METANOL

	A β 1-42		Scrambled-Ab 1-42	
	A β 1-42	LRP-1	A β 1-42	LRP-1
ÁREA	1508.00	28826.00	582.00	22808.00
	9950.00	92787.00	1158.00	44494.00
	5172.00	42693.00	942.00	28611.00
Promedio	5543.33	54768.67	894.00	31971.00

ANEXO XXVII

ÁREA DE A β 1-42 Y LRP-1 EN CÉLULAS HepG2 CON SCRAMBLED Y A β 1-42,
(ICC) FIJADAS CON PARAFORMALDEHIDO

	A β 1-42		Scrambled-Ab 1-42	
	A β 1-42	LRP-1	A β 1-42	LRP-1
ÁREA	2392.00	42222.00	985.00	41567.00
	3748.00	70923.00	474.00	39456.00
	4140.00	76681.00	99.00	38251.00
Promedio	3426.67	63275.33	519.33	39758.00

ANEXO XXVIII

DENSITOMETRÍA DE BANDAS DE LRP-1 EN CÉLULAS HepG2 CONTROL,
SCRAMBLED Y A β 1-42

	Control	Scrambled	A β 1-42
LRP-1	75889.3	53710.2	71451.8
	79194.5	74437.1	75441.3
	50892.2	55003.5	43065.8
	32306.1	37794.0	40408.5
β -Actina	20524.2	11503.5	17721.0
	46461.4	23201.0	31430.6
	42134.3	49623.8	16063.3
	45755.0	24442.6	40919.9
	1.4248	1.7286	1.4928
	0.6311	1.1878	0.8886
	1.2622	1.1583	2.8016
	0.7378	1.6158	1.0319
Promedio	1.014	1.423	1.554
Desviación Estándar	0.389	0.292	0.871