

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Generación de un modelo *in vitro*
para evaluar la actividad agonista de
extractos naturales, obtenidos de
plantas de las familias de Lauráceas
y Miristicáceas, sobre los receptores
X del hígado (LXRs)**

Estefanía Valencia Rincón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Maestría en Ciencias Bioquímica
Bogotá, Colombia
2017

Generación de un modelo *in vitro* para evaluar la actividad agonista de extractos naturales, obtenidos de plantas de las familias de Lauráceas y Miristicáceas, sobre los receptores X del hígado (LXR_s)

Estefanía Valencia Rincón

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Bioquímica

Director (a):

MD, MSc, PhD. Gonzalo Arboleda Bustos

Línea de Investigación:

Enfermedades Neurodegenerativas

Grupo de Investigación:

Muerte Celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2017

*El que tiene imaginación con qué facilidad saca de la nada un mundo.
Gustado Adolfo Bécquer*

*Dedicado a todos ellos que encuentren interesante
y/o útil la información aquí presentada*

...Todo final significa el comienzo de una nueva aventura.....

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a la Universidad Nacional de Colombia, por haberme permitido adquirir herramientas conceptuales, prácticas y sociales durante mi pregrado y posgrado; por los recursos aportados y por la oportunidad de acceder a la beca de estudiante auxiliar. Gracias a esto, el proceso de construcción de esta tesis tiene un final lleno de satisfacciones y alegrías.

Doy gracias a mi director el Doctor Gonzalo Arboleda por darme la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación en Muerte Celular, y por su acompañamiento en el desarrollo del proyecto de investigación que es reflejado en esta tesis. Igualmente a los integrantes del grupo de investigación en Muerte Celular: María José Contreras, Jenny Jaramillo, Adrián Sandoval, Tatiana Báez, Cesar Hernández y Ángela Rodríguez, por compartirme sus conocimientos y apoyarme en los momentos de duda.

Al Profesor Luis Enrique Cuca y su grupo de investigación en Productos Naturales Vegetales del departamento de Química por obsequiarme los extractos vegetales que se estudiaron y su colaboración para resolver dudas relativas a dichos extractos.

A mis compañeros y amigos del instituto de genética: Laura Duque, Juliana Cardozo, Angie Bustos, Gabriela Concha, Luis Castro, Liliana Márquez, Juan Neira, Samanta Tarquino quienes fueron y son mi apoyo en situaciones académicas y personales, e hicieron de los buenos y malos momentos de este camino, recuerdos maravillosos y oportunidades de gran aprendizaje. A Adriana Mejía y Claudia por su ayuda técnica y oportunos regaños. Al grupo de Casalimpia por su colaboración en el aseo y el delicioso tinto y aromática que hacían menos abrumadores los días largos. A las chicas de seguridad por su carisma y la sonrisa que nos regalan al llegar y salir del instituto sin importar la hora.

Por último y no menos importante a mi Familia, mis Padres Eduardo Valencia y Carmen Rincón por apoyarme emocional y económicamente en cada paso de mi vida; y mis abuelos Nancy Llinas y Ramón Valencia por recargarme con su hermosa energía.

Resumen

Actualmente la activación de receptores nucleares LXRs (receptores X del hígado) ha demostrado efectos benéficos en modelos *in vitro* e *in vivo* de diversas enfermedades neurodegenerativas, en particular la enfermedad de Alzheimer, asociado a la sobreexpresión de proteínas como ABCA1 y ApoE. Los agonistas sintéticos generados hasta el momento pertenecen a compañías farmacéuticas, que limitan su uso para la investigación y la aplicación. Se han descrito efectos secundarios indeseados de estos agonistas, por lo cual se ha abierto la búsqueda de agonistas naturales, obtenidos de la biodiversidad alrededor del mundo. En el presente trabajo realizamos la evaluación de varios extractos etanólicos de plantas pertenecientes a las familias *Lauraceae*, *Rutaceae* y *Myristicaceae* provenientes de la biodiversidad colombiana, para definir su potencial función como agonistas de LXR, ya que estas plantas son ricas en compuestos terpenoides los cuales tienen la capacidad de activar a LXR. Los estudios se han realizado utilizando la línea de riñón embrionario humano (HEK293). Inicialmente se han analizado la citotoxicidad de los extractos mediante ensayos de MTT y LDH; la capacidad de activar LXR se realizó mediante ensayos de actividad luciferasa; y cambios en los niveles de expresión de APOE y ABCA1 en la línea celular SHSY-5Y. Estos resultados demuestran que algunos extractos naturales derivados de plantas de la biodiversidad colombiana poseen actividad LXR, lo cual los hace candidatos promisorios en el desarrollo de nuevas herramientas tanto en investigación como para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave: LXR, Extractos Vegetales, Alzheimer, ApoE, ABCA1

Abstract

Currently, activation of nuclear LXR receptors (liver X receptors) has shown beneficial effects in in vitro and in vivo models of different neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, associated with overexpression of proteins such as ABCA1 and ApoE. Synthetic agonists generated until now, belong to pharmaceutical companies, which limit their use for research and application. Undesired side effects of these agonists have been described, so the search for natural agonists, obtained from biodiversity around the world, has been opened. In the present work, we performed the evaluation of several ethanolic extracts of plants belonging to the families *Lauraceae*, *Rutaceae* and *Myristicaceae* from colombian biodiversity, to define their potential role as LXR agonists, since these plants are rich in terpenoid compounds, which have the ability to activate LXRs. Studies have been performed using the human embryonic kidney cell line (HEK293) and the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. The cytotoxicity of the extracts was initially analyzed by MTT and LDH assays for both cell lines; the ability to activate LXR was performed by luciferase activity assays in HEK293 cells; and changes in APOE and ABCA1 expression levels in the SHSY-5Y cell line. These results demonstrate that some natural extracts derived from plants of the Colombian biodiversity possess LXR activity, which makes them promising candidates in the development of new tools in research as well as in the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: LXR, Plant Extracts, Alzheimer Disease, ApoE, ABCA1

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
Introducción	1
1. Marco Teórico	4
1.1 Enfermedad de Alzheimer.....	4
1.1.1 Factores de Riesgo	5
1.1.2 Hipótesis Amiloide del origen de la EA	5
1.1.3 Péptido Amiloide	6
1.1.4 Apolipoproteína E (ApoE).....	7
1.1.5 Colesterol	9
1.1.6 LXR	10
1.1.7 Dianas Terapéuticas usadas en la EA	11
1.1.8 Agonistas de LXR.....	13
1.1.9 Plantas Colombianas como fuente de dianas terapéuticas	13
2. Objetivos	16
2.1 General	16
2.2 Específicos.....	16
3. Metodología	17
3.1 Materiales.....	17
3.1.1 Células	17
3.1.2 Extractos Vegetales	20
3.1.3 Reactivos.....	21
3.2 Equipos	24
3.3 Métodos	24
3.3.1 Determinación de las Concentraciones de Trabajo.	24
3.3.2 Transfección de células HEK	27
3.3.3 Ensayo de Transactivación	28
3.3.4 Evaluación de la expresión de proteínas	30
3.3.5 Análisis Estadístico	31
4. Resultados	33

4.1	Ensayos de Viabilidad y Citotoxicidad	33
4.2	Generación del sistema para evaluar la activación de LXRb.....	38
4.3	Evaluación de la actividad agonista de los extractos	41
4.4	Efecto de los extractos con actividad agonista sobre la expresión de ABCA1 y ApoE en células SH-SY5Y.....	43
4.5	Efecto de las fracciones del extracto 1, sobre la expresión de ABCA1 y ApoE en células SH-SY5Y.	45
4.6	Efecto de los extractos de hojas, madera y frutos de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> sobre la expresión de ApoE y ABCA1 en células SH-SY5Y.....	Error! Bookmark not defined.
4.7	Efecto de los extractos 1 y 10 en cultivos primarios de neuronas hipocámpales y astrocitos.....	Error! Bookmark not defined.
5.	Discusión	52
5.1	Efectos sobre viabilidad y toxicidad celular.....	53
5.2	Activación de LXRb con extracto	56
5.3	Efecto sobre la Expresión de ABCA1 y ApoE en la línea células SH-SY5Y... ..	57
5.4	Efecto sobre la Expresión de ABCA1 y ApoE en cultivos primarios de neuronas y astrocitos.....	59
6.	Conclusiones y recomendaciones	62
6.1	Conclusiones.....	62
6.2	Recomendaciones	63
Anexo A: Graficas del efecto de los extractos estudiados sobre la viabilidad celular (MTT y LDH).....		64
Anexo B: Fotografías de los cultivos primarios empleados.....		69
Bibliografía		72

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Cascada de eventos en la Hipótesis Amiloide.	5
Figura 1-2: Procesamientos de APP.....	7
Figura 1-3: Isoformas de ApoE.....	8
Figura 3-1: Reacciones presentes en ensayo LDH	25
Figura 3-2: Ensayo de Transactivación empleando luciferasa como gen reportero.....	29
Figura 4-1: Viabilidad y Citotoxicidad extractos 1, 10 y 16	34
Figura 4-2: Viabilidad y citotoxicidad de las fracciones del extracto 1.....	36
Figura 4-3: Viabilidad y citotoxicidad de otros extractos provenientes de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	37
Figura 4-4: Confirmación de la transfección de células HEK293 para generación de modelo de trabajo.	39
Figura 4-5 Estandarización del ensayo de Transactivación de LXRb.	40
Figura 4-6: Evaluación de la actividad agonista de los extractos frente a LXRb en el modelo generado de células HEK293.....	42
Figura 4-7: Los Extractos 1, 3 y 10 cambian la expresión de ABCA1 y ApoE en células SH-SY5Y.	44
Figura 4-8: El extracto 10 cambia la expresión de ABCA1 y ApoE en neuronas hipocámpales.....	45
Figura 4-9: Extractos 3 y 10 aumentan expresión de ABCA1 y ApoE en Astrocitos .46	
Figura 4-10: Evaluación de efecto dosis dependiente en actividad luciferasa de extractos 1 (<i>Ocotea lanceolata</i>)y 10 (<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>).....	47
Figura 4-11: Activación de LXRb con fracciones obtenidas del extracto 1 en diferentes solventes.	48
Figura 4-12: Cambios en la expresión de ABCA1 y ApoE generados por las fracciones del extracto 1	49
Figura 4-13: Actividad Luciferasa en distintos órganos de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	50
Figura 4-14: Los extractos de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> cambian expresión de ABCA1 y ApoE.	51

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Estrategias Terapéuticas frente a la EA: Aprobadas y en Investigación.....	12
Tabla 3-1: Extractos estudiados	21
Tabla 3-2: Reactivos empleados en cultivo celular	22
Tabla 3-3: Reactivos empleados en Westernblot	22
Tabla 3-4: Kits utilizados.....	22
Tabla 3-5: Reactivos para preparación de soluciones.....	23
Tabla 3-6: Soluciones utilizadas	23
Tabla 3-7: Anticuerpos utilizados.....	23
Tabla 3-8: Equipos empleados.	24
Tabla 3-9: Tratamientos, Controles y Blancos empleados en ensayos de MTT y LDH26	28
Tabla 3-10: Plásmidos empleados para evaluar activación de LXRb	28
Tabla 4-1: Concentraciones de trabajo determinadas para cada extracto	35
Tabla 4-2: Cantidades de cada plásmido estandarizadas	40

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AB</i>	Beta amiloide
<i>ABCA1</i>	transportador dependiente de la unión de ATP A1
<i>ABCG1</i>	transportador dependiente de la unión de ATP G1
<i>AMP</i>	Adenosín monofosfato
<i>apoE</i>	Gen de apolipoproteína E
<i>ApoE</i>	Apolipoproteína E
<i>APP</i>	Proteína Precursora Amiloide
<i>ATP</i>	Adenosín trifosfato
<i>BCA</i>	Ácido Bicinconínico
<i>CH₂Cl₂</i>	Diclorometano
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>EA</i>	Enfermedad de Alzheimer
<i>EtoAc</i>	Acetato de Etilo
<i>EtOH</i>	Etanol
<i>g</i>	gravedades
<i>GFP</i>	Proteína fluorescente verde
<i>HBSS</i>	Solución balanceada de Hans
<i>IL6</i>	Interleucina 6
<i>IRF1</i>	Factor regulador de interferón 1
<i>LDH</i>	Lactato deshidrogenasa
<i>LDLR</i>	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
<i>LRP1</i>	Proteína relacionada con receptor de lipoproteínas de baja densidad 1
<i>LXRα</i>	Receptor X del Hígado alfa
<i>LXRβ</i>	Receptor X del Hígado beta
<i>mA</i>	Miliamperios
<i>mARN</i>	ARN mensajero
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>MTT</i>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<i>NAD⁺</i>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidado
<i>NADH</i>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido
<i>P/S</i>	Penicilina-estreptomina
<i>PPi</i>	Pirofosfato
<i>PVDF</i>	Fluoruro de vinilideno
<i>qPCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<i>RIPA</i>	Buffer de Radioinmunoprecipitación
<i>RN</i>	Receptores nucleares

<i>RXR</i>	Receptor X Retinoide
<i>SEM</i>	Error Estándar de la Media
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>TNFα</i>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<i>ug</i>	Microgramos
<i>uL</i>	Microlitros
<i>VLDLR</i>	Receptor de lipoproteínas de muy baja densidad

Introducción

Los receptores X del hígado (LXRa y LXRb por sus siglas en inglés) son receptores nucleares activados endógenamente por oxisteroles¹. Consecuentemente, los oxisteroles tienen un papel importante en la regulación homeostática del colesterol, en el metabolismo de carbohidratos y en la respuesta inflamatoria, en varios tejidos, particularmente en el cerebro, donde las proteínas ABCA1 y ApoE son algunos de sus blancos más estudiados^{2,3}. La razón de interés en ApoE, es que esta es una de las moléculas más relevantes en la homeostasis lipídica, la inflamación cerebral y por lo tanto, con la Enfermedad de Alzheimer (EA).

La EA es una dolencia sistémica cuyo blanco patológico final es el cerebro⁴. Es considerada como la principal causa de demencia, y debido a su complejidad y falta de tratamientos efectivos para contrarrestarla, su prevalencia mundial crece exponencialmente⁵. Una de las hipótesis más aceptada sobre la aparición de la enfermedad, es la acumulación de péptidos de Amiloide β (AB) tanto dentro como fuera de las células neuronales⁶. Este fenómeno desencadenaría todos los demás síntomas de la EA.

Los síntomas de la EA son generalmente procesos crónicos de inflamación y alteraciones en la homeostasis lipídica en el cerebro⁷. Adicionalmente, la enfermedad presenta una disfunción sináptica que genera procesos neurodegenerativos relacionados con la pérdida de memoria, lo cual es característico de la enfermedad⁸. Diferentes investigaciones han mostrado que niveles altos de colesterol en la sangre, así como la variación en la expresión de los genes implicados en su homeostasis, son factores de riesgo para el desarrollo de la EA⁹⁻¹¹.

Uno de esos genes es apoE, precursor de la proteína E (ApoE). Como esta proteína está vinculada con la homeostasis lipídica y la inflamación cerebral, su gen precursor es

considerado como un factor clave en el desarrollo de la EA. Se sabe que la ocurrencia de diferentes alelos de apoE tienen efectos en el desarrollo de la EA. Así por ejemplo, la presencia de apoE2 tiene un carácter protector, mientras que apoE4 se asocia con una mayor incidencia de la enfermedad, no obstante apoE3 es el alelo predominante en la población^{12,13}

Junto con la proteína ApoE, el transportador ABCA1 también se ha relacionado con la EA, puesto que en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* muestran la importancia de ABCA1 en la eliminación de AB mediante la lipidación de ApoE¹⁴. Adicionalmente Lupton muestra una relación entre diferentes alelos del gen de ABCA1 y el riesgo con la EA, mediante un estudio de casos y controles empleando secuenciación de nueva generación.

La expresión de ApoE, así como de ABCA1, es regulada, entre otros mecanismos, por los LXRs¹⁵ por lo que su estudio en el sistema nervioso ha crecido notablemente. Varias investigaciones han mostrado que los LXRs se expresan tanto en cerebros en desarrollo como en cerebros adultos, y tanto en células neuronales como en células gliales¹⁶. Adicionalmente en la literatura se presentan estudios que relacionan modelos murinos *knockout* de LXRs con anomalías cerebrales como inclusiones lipídicas celulares, y aumentos en la carga amiloide local^{17,18}.

En la actualidad, los tratamientos aprobados para la EA disponibles no están dirigidos hacia desencadenantes moleculares como LXR. Es por esto que los receptores nucleares como LXR, son atractivos para el tratamiento de EA debido a su capacidad para facilitar la degradación de AB, afectar a la activación microglial y disminuir el medio pro-inflamatorio del cerebro, todo asociado a su capacidad de regulación de los niveles de ApoE y ABCA1¹⁶.

Hasta la fecha se han desarrollado varios agonistas sintéticos de LXR como T0901317 y GW3965, los cuales han mostrado una alta efectividad para el tratamiento de sintomatologías propias de diabetes, cáncer, inflamación y de la EA en modelos murinos. No obstante, se ha encontrado que estos compuestos generan efectos secundarios indeseables en humanos como hipertrigliceridemia y problemas a nivel del sistema nervioso central, además que T0901317 no es completamente selectivo a LXR¹⁹.

Para superar los efectos secundarios generados por los agonistas sintéticos, se han propuesto como alternativa varios compuestos de alto potencial terapéutico extraídos de plantas y hongos. Estos compuestos de origen natural, han mostrado una regulación de la actividad de LXR¹⁷. Las plantas de las familias de las *Lauraceae* y *Myristicaceae*, que predominan en América tropical y Malasia, han sido las más utilizadas por poseer compuestos como terpenos, sesquiterpenos y lignanos²⁰⁻²², los cuales han mostrado actividad agonista hacia los receptores LXR.^{23,24}

En consecuencia, el tratamiento de la EA puede abordarse desde el punto de vista de la modulación de los desencadenantes moleculares, como los RN. De esta manera, LXR es un blanco terapéutico prometedor para el control de los síntomas de la EA y la búsqueda de nuevos agonistas a partir de la bioprospección. Este hecho puede convertirse en un renglón importante para el desarrollo de nuevos medicamentos y consecuentemente impulsar de la industria farmacéutica nacional.

Teniendo en cuenta lo anterior, esta tesis estudia el efecto agonista frente a LXRB de extractos de plantas pertenecientes a las familias de *Lauraceae*, *Myristicaceae*, y *Rutaceae* en un modelo de células HEK293 que expresan LXR y poseen un constructo con los elementos de respuesta a LXR en la región promotora del gen codificante para Luciferasa. De esta manera, se seleccionaron 3 extractos con actividad agonista, para posteriormente evaluar la expresión de proteínas blanco de LXR en células SH-SY5Y, cultivos primarios de neuronas hipocámpales y astrocitos, frente a los tratamientos.

1. Marco Teórico

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo, considerada como la principal causa de demencia en la tercera edad⁶, cuya incidencia mundial en 2014 alcanzó los 24 millones de personas, y se espera que la cifra crezca 20 veces antes del 2040⁴.

La EA fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1907, quien observó tanto lesiones cerebrales como alteraciones arterioescleróticas en el tejido cerebrovascular, cúmulos neurofibrilares dentro de las células, además de depósitos de una sustancia desconocida en la corteza. Adicionalmente el conjunto se manifestó con un gran número de células neuronales muertas en el cerebro de una paciente de 55 años que presentó problemas de pérdida de memoria, alteraciones comportamentales y pérdida de funciones ejecutivas durante 4 años antes de su muerte en un hospital psiquiátrico ^{25,26}.

En la actualidad, las principales características fisiopatológicas de la EA son la acumulación intraneuronal de la proteína tau hiperfosforilada, en ovillos neurofibrilares, y agregados intra y extracelulares de péptidos de amiloide- β (A β). Los últimos, dan lugar a la formación de placas seniles²⁷; generando daño celular y la posterior muerte de la célula²⁸. Algunos de los síntomas reconocibles y empleados para el diagnóstico de la EA son la pérdida progresiva de memoria, alteraciones del comportamiento y dificultad para realizar tareas cotidianas²⁹.

1.1.1 Factores de Riesgo

En múltiples estudios de la EA se han descrito diferentes factores de riesgo tanto genético como ambiental²⁷. Debido a que no todos los factores se presentan en todos los pacientes, se ha definido a la EA como una patología multifactorial⁷. Dentro de los factores genéticos se encuentran mutaciones de los genes de la proteína precursora Amiloide (APP), y las presenilinas 1 y 2, las cuales favorecen mayor producción de péptidos AB, en los casos de Alzheimer familiar de inicio temprano³⁰. De otra parte, tenemos los genes descritos para la EA de inicio tardío, donde el gen *apoE* es el más importante, puesto que su variación alélica se asocia a mayor o menor riesgo para la aparición de la EA. La presencia del alelo *apoE4* aumenta la probabilidad para desarrollar la enfermedad y el alelo *apoE2* tiene un carácter protector frente a la dolencia^{12,31,32}.

1.1.2 Hipótesis Amiloide del origen de la EA

Debido a que el desarrollo de la EA puede obedecer a una compleja cadena de eventos, se han planteado varias hipótesis para identificar sus causas principales³³. La hipótesis más aceptada hasta el momento es la Hipótesis Amiloide, la cual propone que la acumulación de AB, es el primer fenómeno en aparecer en la EA y ello sería el desencadenante para las demás características celulares³⁴, que se evidenciarían en los subsecuentes procesos de neurodegeneración típicos de la EA (Figura 1-1).



Figura 1-1: Cascada de eventos en la Hipótesis Amiloide.
Esquema que resume las etapas en la enfermedad de Alzheimer de acuerdo a la hipótesis amiloide.

1.1.3 Péptido Amiloide

El AB es un péptido producido a partir del clivaje de APP, cuyo tamaño varía entre 38 y 43 aminoácidos, siendo las isoformas de 40 aminoácidos las más abundantes³⁵. En la ruta no amiloidogénica participan la α -secretasa y la γ -secretasa, quienes van a generar dos fragmentos extracelulares, sAPP α y P3, los cuales tienen actividad neuroprotectora, y un fragmento intracelular (AICD) que funciona como activador transcripcional. Por su parte en la vía amiloidogénica, los clivajes realizados por la β secretasa y la γ -secretasa, producen dos péptidos extracelulares, sAPP β y AB, e intracelularmente también se origina la fracción AICD³⁵ (figura1-2).

Gracias a la capacidad de autoagregación, que tienen los péptidos de AB al adquirir una conformación de hoja beta, pueden existir como monómeros, dímeros u oligómeros, los cuales forman las fibrillas que constituyen las placas amiloides³⁶. Estas placas y junto a agregados solubles, en concentraciones del orden de las nano y micromoles³⁷ producen alteraciones fisiológicas que desencadenan procesos de muerte celular³⁸. Sin embargo, los péptidos de AB, pueden ser encontrados en varios tipos celulares saludables, así como en el fluido cerebroespinal y la sangre³⁹. Se ha reportado en estos casos que su concentración es del orden picomolar, y no tiene efectos citotóxicos; en el cerebro esta cantidad de amiloide actúa como señal trófica⁴⁰, modulador de la actividad sináptica y como antioxidante gracias a su capacidad quelante de metales como cobre, hierro y zinc³⁵. En consecuencia, es clara la existencia de una dualidad de roles de los péptidos amiloides de acuerdo a su concentración y configuración en el medio celular.

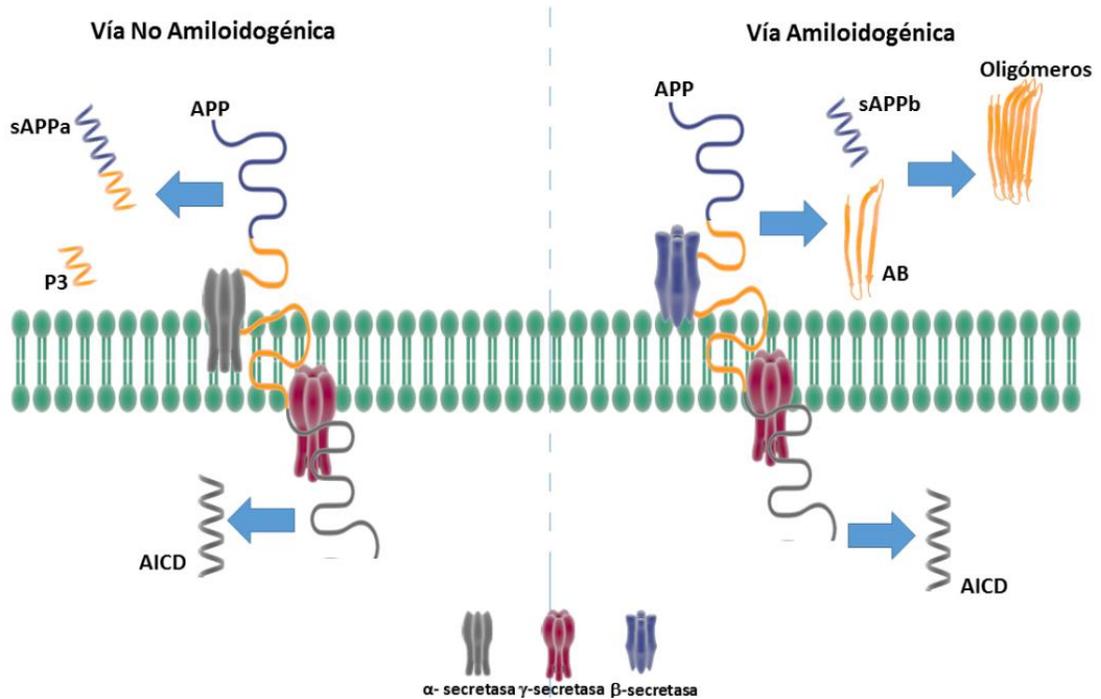


Figura 1-2: Procesamientos de APP.

Esquema representativo de los clivajes que sufre APP. Derecha vía generación de péptido amiloide en la vía amiloidogénica, este procesamiento se favorece en las balsas lipídicas. Izquierda ruptura de APP por vía no amiloidogénica.

Ahora bien, la eliminación de AB del cerebro se da por dos vías principales: (1) La degradación proteolítica mediada por endopeptidasas. (2) La limpieza mediada por receptores en las células formadoras del parénquima cerebral, a lo largo de la vía de drenaje de líquido intersticial o a través de la barrera hematoencefálica⁴¹. Esta segunda vía es ejecutada principalmente por los receptores de la lipoproteína ApoE (LRP1, LDLR y VLDLR), los cuales se expresan ampliamente en neuronas, astrocitos y microglía⁴².

1.1.4 Apolipoproteína E (ApoE)

ApoE es una glicoproteína soluble de 299 aminoácidos, la cual tiene un rol importante en la regulación de la homeostasis del colesterol, facilitando la entrada al hígado de las lipoproteínas remanentes de los demás órganos del cuerpo^{43,44}. Después del hígado, el segundo órgano con mayor expresión de ApoE es el cerebro donde es producida por astrocitos y microglía principalmente^{45,46}. En el cerebro, ApoE forma la mayoría de partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) al asociarse con fosfolípidos y

colesterol; de esta forma es reconocida por los receptores correspondientes en neuronas y en la barrera hematoencefálica⁴⁷. Es así como una de las principales funciones de ApoE es transportar el colesterol desde la glía hacia las neuronas, estas últimas lo requieren para su crecimiento, reparación y sinaptogénesis, ya que normalmente no pueden sintetizar colesterol⁴⁸⁻⁵¹.

En humanos se han identificado tres isoformas de ApoE: ApoE2, ApoE3 y ApoE4, las cuales difieren entre sí en los residuos 112 y 158, que definen arginina y cisteína (figura 1-3); estas pequeñas diferencias afectan la capacidad y afinidad de ApoE para unirse a lípidos, receptores y a los péptidos de AB; donde, la isoforma ApoE2 tiene un carácter protector, la isoforma ApoE3 es la más frecuente y es eficiente en el transporte e interacción con lípidos y AB, mientras que ApoE4 se asocia a procesos de neurodegeneración^{32,52}. En este sentido, se ha reportado que alrededor del 40% de pacientes con EA presentan la isoforma ApoE4, que al tener menor afinidad por el AB, y al emplear los receptores VLDLR (transporte más lento) es más ineficiente para eliminar los péptidos amiloides^{31,32}. Adicionalmente estudios *in vivo* muestran co-localización de ApoE con las placas amiloides⁵², y que mutaciones sobre la ApoE afectan su interacción con el AB propiciando su acumulación⁵².

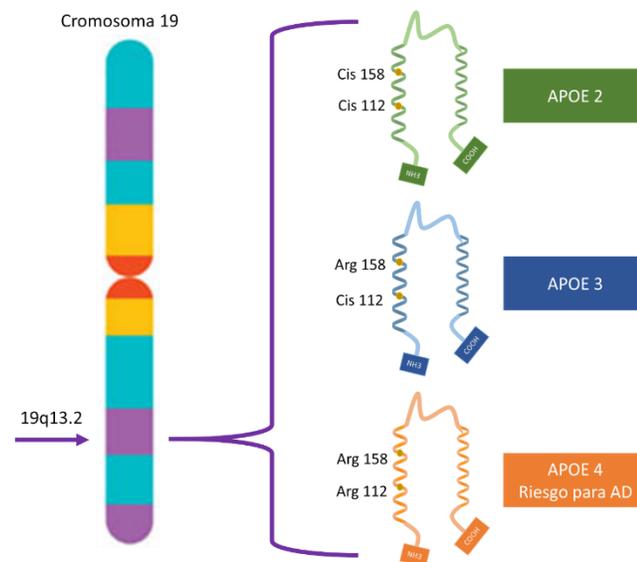


Figura 1-3: Isoformas de ApoE.

Esquema de las tres isoformas de ApoE. Los genes codificantes para su síntesis se encuentran en el cromosoma 19. La isoforma ApoE2 es la menos frecuente y tiene un carácter protector; por su parte la isoforma ApoE3 es la más común; mientras que la isoforma ApoE4 se considera un factor de riesgo para la EA.

1.1.5 Colesterol

El colesterol es una de las moléculas lipídicas que encontramos en las biomembranas, y se ha observado que la variabilidad en su distribución y metabolismo están relacionados con diferentes fases en la cascada patogénica de la EA⁵³. Los procesos observados en la acumulación de amiloide como el clivaje de APP y el cambio conformacional del AB que facilita la formación de agregados, están influenciados por la interacción de APP y AB con las membranas biológicas, especialmente en las balsas lipídicas, regiones de la membrana donde el colesterol es el componente principal^{54,55}.

En el cerebro, el colesterol es necesario tanto para mantener la estructura de membranas, axones y dendritas, como para el adecuado funcionamiento de procesos vitales como la sinapsis². Debido a que el colesterol no puede atravesar la barrera hematoencefálica, la mayoría del colesterol presente en el cerebro es sintetizado por las células gliales^{56,57}. Sin embargo, aunque las neuronas requieren de grandes cantidades de colesterol, no tienen una vía de síntesis eficiente, por ende dependen del colesterol producido por la glía⁵⁸⁻⁶⁰; donde transportadores como ABCA1 y ABCG1 se encargan de lipidar, a ApoE para su exportación^{61,62}.

El desbalance de colesterol en el cerebro se ha asociado a diferentes enfermedades del sistema nervioso central como la EA y el síndrome de Smith-Lemli-Opitz^{63,64}. Pfrieger y Hunger⁶⁵ han propuesto tres formas en que las neuronas manejan las sobrecargas de colesterol, donde la más aceptada consiste en oxidar el colesterol en la posición 24 por la colesterol-24-hidroxilasa (CYP46A1, un miembro de la superfamilia de hemoproteínas citocromo P450, ubicada en el retículo endoplásmico de neuronas⁶⁶). La oxidación del colesterol genera oxisteroles, que atraviesan más fácilmente la barrera hematoencefálica, promoviendo su salida del cerebro⁶⁷. Adicionalmente estos productos de oxidación actúan como activadores del Receptor X

del Hígado (LXR por sus siglas en inglés), el cual es el regulador del metabolismo de colesterol por excelencia².

1.1.6 LXR

Los receptores X del hígado (LXRs por sus siglas en inglés), hacen parte de la superfamilia de receptores nucleares. Los LXRs hace parte de una subclase llamada heterodímeros de RXR permisivos, que forman dímeros con RXR los cuales se puede activar independientemente por el ligando de RXR (ácido-9-cis-retinoico), el ligando de LXR o por ambos ligandos en forma sinérgica¹.

LXR, presenta dos isoformas, LXRA y LXRb, las cuales comparten una identidad cercana al 78% en la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio de unión al DNA. La isoforma LXRA predomina en tejidos metabólicamente activos como el hígado, mientras que LXRb tienen una expresión más ubicua, con una alta concentración en el cerebro^{68,2}. Aunque presentan diferencias, ambas isoformas son activadas por los mismos ligandos endógenos: compuestos derivados del colesterol, principalmente los oxisteroles⁶⁹; sin embargo algunos oxisteroles y los ligandos exógenos descritos suelen ser específicos para una u otra isoforma⁷⁰⁻⁷².

▪ Activación y Represión regulada por LXRs

La activación de LXR, ocurre el heterodímero LXR-RXR se une, a las secuencias AGGTCA presentes en la región promotora del gen diana⁷³, gracias a los dedos de zinc en su dominio de unión al ADN. A continuación se asocian un conjunto de proteínas con co-represoras⁷³. En el momento que el ligando se une al receptor, este último sufre un cambio conformacional que libera a las moléculas represoras, y a su vez recluta proteínas co-activadoras, formando un complejo que promueve la transcripción del gen⁷⁴.

De otra parte, se ha reportado que los LXRs reprimen la expresión de genes inflamatorios en macrófagos⁷⁵, cuando LXR es activado por su ligando y a su vez se asocia con un grupo SUMO2/3. Estos eventos, generan su translocación al promotor de NF- κ B y en consecuencia, el silenciamiento de genes inflamatorios^{75,76}, Tal es el caso de la proteína inflamatoria STAT1 la cual queda impedida para unirse al promotor de sus genes blanco IRF1, TNFa y IL6, reduciendo la expresión de dichas proteínas, y por ende se observa una menor respuesta inflamatoria⁷⁷.

▪ LXR y Alzheimer

Una de las funciones más importantes de LXR es su trabajo como sensor de colesterol y regulador de la homeostasis de lípidos². La activación de LXR induce la expresión de genes involucrados en el transporte de colesterol como proteínas de unión a ATP (ABCA1 y ABCG1) y ApoE, además regula a la baja genes implicados en la síntesis de este lípido^{78,79}.

Los modelos *knockout* de LXR han mostrado efectos neurodegenerativos dependientes de la edad, acompañados de la acumulación de lípidos en neuronas, astrocitos y meninges⁸⁰. Diferentes estudios con ratones *knockout* (LXRb^{-/-}) y doble *knockout* (LXRa^{-/-}LXRb^{-/-}) relacionan la acumulación de colesterol con la pérdida de neuronas, formación de placas amiloides, alteración axonal, y astrogliosis^{17,80}. De esta forma LXR se convierte en un blanco atractivo en la EA gracias a su capacidad de regular factores determinantes de la enfermedad, principalmente los involucrados en la regulación de APOE, homeostasis del colesterol e inflamación^{1,81,82}.

1.1.7 Dianas Terapéuticas usadas en la EA

Hasta el momento, y de forma general, los mecanismos bioquímicos y moleculares de la EA no se comprenden por completo, y en ese sentido los tratamientos disponibles

no logran aliviar a largo plazo los síntomas ni prevenirlos. Dentro de las dianas terapéuticas actuales encontramos los sistemas de neurotransmisores, principalmente el colinérgico; y el metabolismo del AB⁸³; algunas de estas estrategias se muestran en la tabla 1-1. No obstante estos blancos apuntan a estadíos iniciales de la enfermedad para retrasar su avance, pero no permiten tratar a pacientes en etapas avanzadas ni generar una cura; además no funcionan para todos los casos^{83,84}.

Tabla 1-1: Estrategias Terapéuticas frente a la EA: Aprobadas y en Investigación

Fármaco	Acción	Referencia
Donepezil	Inhibición acetilcolinesterasa	Petersen ⁸⁵
Rivastigmina	Inhibición acetilcolinesterasa	Feldman ⁸⁶
Galantamina	Inhibición acetilcolinesterasa incrementa respuesta pos sináptica	Reisberg ⁸⁷ , Raskind ⁸⁸
Memantine	Inhibición de receptores NMDA	Reisberg ⁸⁹
Tacrine	Inhibición acetilcolinesterasa	Korabecny ⁸⁴
MK-8931	Inhibidor de BACE	Korabecny ⁸⁴
ADZ-3293	Inhibidor de BACE	Korabecny ⁸⁴
ADZ-2609		
LY-28866721	Inhibidor de BACE	Korabecny ⁸⁴
E-2609	Inhibidor de BACE	Aziz ⁹⁰
Benzodiazepina	Inhibidor y secretasa	Wolfe ⁹¹
Sulfonamida	Inhibidor y secretasa	Gauthier ⁹²
Benzocapro lactama	Inhibidor y secretasa	Citron ⁹³
Peptidos	evitar agregación de AB	Pardee ⁹⁴
Polifenoles	previene Oligomerización	Pardee ⁹⁴
Vitaminas A,C, E	inhiben Oligomerización	Pardee ⁹⁴
Chaperonas artificiales	modular plegamiento de AB	Huang ⁹⁵ , Liu ⁹⁶
CAD106	inmunización activa	Farlow ⁹⁷
Bapinezumap	Inmunización pasiva	Liu ⁹⁸
BII037	Inmunización pasiva	Dunstan ⁹⁹

Recientemente varias investigaciones se han centrado en terapias que permitan modular los niveles de colesterol y otros lípidos; donde se han encontrado efectos benéficos para diferentes modelos animales de la EA¹⁰⁰. Uno de los blancos más promisorios en este campo son los receptores nucleares, como los LXR, quienes son conocidos como los reguladores maestros del metabolismo de lípidos¹⁰¹.

1.1.8 Agonistas de LXR

Hasta la fecha se han desarrollado varios agonistas sintéticos de LXR como T0901317 y GW3965, los cuales muestran una alta efectividad para el tratamiento de condiciones como diabetes, cáncer e inflamación en modelos murinos de EA¹⁰². Nuestro grupo de investigación ha reportado varios de los efectos positivos de GW3965 frente a la EA^{103–105}. No obstante se ha encontrado que no son completamente selectivos y generan efectos secundarios en humanos como hipertrigliceridemia e hígado graso¹⁹.

1.1.9 Plantas Colombianas como fuente de dianas terapéuticas

Para superar las características negativas de los agonistas LXR conocidos, varios investigadores se han buscado nuevas moléculas en productos naturales, las cuales sean de fácil acceso para la investigación y que a su vez reduzcan los efectos secundarios, teniendo en cuenta que estos nuevos compuestos pueden tener mayor especificidad hacia LXR, una selectividad frente a una isoforma y posiblemente actúen en tejidos específicos^{3,106}.

Esta búsqueda se ha enfocado en evaluar el efecto de nuevos agonistas sobre algunas líneas celulares de cáncer y del sistema inmune, así como en algunos modelos murinos¹⁰⁷. Por ejemplo, Huang *et al*²³ estudian el efecto agonista, sobre los LXRs en macrófagos humanos (células THP1), de un compuesto aislado a partir de una planta usada en la medicina tradicional china. Por su parte Hsiang-Ru Lin¹⁰⁸, emplea una línea celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) y una molécula aislada de *Paeonia*

lactiflora. Estos autores así como muchos otros emplean el gen de la luciferasa como reportero para cuantificar la actividad de LXR¹⁰⁷.

Nuestro grupo de investigación junto con el grupo de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia, se ha sumado a la búsqueda de nuevos agonistas LXR, para lo cual se escogieron tres familias de la flora colombiana: *Lauraceae*, *Rutaceae* y *Myristicaceae*, ya que se caracterizan por poseer moléculas como los terpenos, sesquiterpenos y lignanos²⁰⁻²². Estas moléculas en otros tipos de plantas, como las empleadas en la medicina tradicional china, han mostrado actividad agonistas hacia los receptores LXRs y RXRs^{23,24}

Según lo reportado en el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia, en el país podemos encontrar una gran diversidad Lauráceas. Hasta el momento hay registradas alrededor de 1600, donde los géneros *Nectandra* y *Ocotea* son los más abundantes y diversos. Tradicionalmente estas plantas se han utilizado para diferentes tipos de tratamientos como, problemas digestivos, hipertensión y migraña¹⁰⁹⁻¹¹¹. Además varios investigadores han reportado diferentes usos útiles de las plantas de estos géneros; como actividad antiparasitaria, antiplaquetaria, antiinflamatoria, antimicrobiana e insecticida¹¹².

De otro lado, en la familia de los cítricos (*Rutaceae*), que cuenta con el ampliamente reconocido género *Citrus* (naranjas, limones y mandarinas), se conocen varias cualidades medicinales. Dentro de los usos medicinales que se le han dado a estas plantas se encuentran tratamientos para enfermedades gastrointestinales, gonorrea, reumatismos, tratamiento de la malaria entre otros¹¹³.

En el caso de la familia *Myristicaceae* se conocen aproximadamente 500 especies de árboles de gran tamaño. La mayoría de las especies se caracterizan por la presencia de aceites esenciales en diferentes órganos, como es el caso de la nuez moscada, y

porque de sus follajes y troncos se obtienen resinas o mucilagos, de color rojizo o amarillento^{114,115}. Tradicionalmente se emplean poco con fines medicinales, por ejemplo se usa para tratar el paludismo¹¹⁵, puesto que su principal uso es en la industria maderera¹¹⁵.

2. Objetivos

2.1 General

Evaluar la actividad agonista de extractos naturales, obtenidos de plantas de las familias de *Lauraceae* y *Myristicaceae*, sobre los receptores X del hígado (LXRs)

2.2 Específicos

Evaluar el efecto de los extractos de plantas a emplear sobre la viabilidad de células a emplear: HEK293 y SH-SY5Y.

Generar un modelo in-vitro de células HEK293, transfectandolas con plásmidos de expresión para LXRb y un constructo con elementos de respuesta a LXR en el promotor de un gen reportero.

Evaluar la actividad agonista de extractos crudos obtenidos de plantas de las familias *Lauraceae* y *Myristicaceae* en el modelo de células HEK293 generado.

Evaluar el efecto de los extractos que presenten actividad agonista sobre LXR en la expresión de proteínas blanco como ApoE y ABCA1 en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma.

3. Metodología

3.1 Materiales

3.1.1 Células

En esta investigación se emplearon dos líneas celulares, las cuales se describen a continuación, junto con cultivos primarios de neuronas hipocampales, astrocitos, obtenidos a partir de cerebros de ratones neonatos c57bl/6.

- **Línea celular SH-SY5Y**

La línea celular SH-SY5Y es una sublínea generada a partir de la tercera clonación de las células SK-N-SH, la cual se estableció originalmente a partir de una biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma en 1970^{116,117}. Esta línea celular se ha usado como modelo neuronal desde comienzos de la década de los 80 ya que estas células poseen varias características bioquímicas y propiedades funcionales de las neuronas¹¹⁸, así como algunas propiedades de células madre¹¹⁹. Dentro de sus marcadores neuronales se encuentra la actividad tirosina y dopamina- β hidroxilasa, y la expresión de proteínas formadoras de los neurofilamentos. Su diferenciación se puede inducir con ácido retinoico¹¹⁹, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés)¹²⁰, AMP cíclico dibutírico¹²¹ o estaurosporina¹²². Gracias a que estas células expresan LXRb, ABCA1 y ApoE, se emplearon para evaluar los cambios en la expresión de ABCA1 y ApoE frente al tratamiento con los extractos vegetales.

▪ Línea celular HEK293

La línea celular HEK293 fue generada a partir de la transformación de células humanas embrionarias de riñón, con fragmentos de ADN de adenovirus humano de tipo 5 (Ad5). El material del adenovirus se incorporó, de forma permanente, en el cromosoma 19 del genoma huésped estableciendo esta útil herramienta^{123,124}.

La línea celular HEK293 es ampliamente utilizada en el estudio de proteínas típicas de células neuronales, pues tiene muchas características en común con neuronas tempranamente diferenciadas. Adicionalmente se ha reportado la expresión de subunidades de proteínas del citoesqueleto y un total de 61 mARN exclusivos de este tipo de células¹²⁵. Adicionalmente su fácil manipulación hace a las células HEK293 un excelente modelo de trabajo⁵³. Estas células mantienen una estabilidad fenotípica y electrofisiológica hasta el pase 30, luego de lo cual es necesario trabajar con una alícuota nueva para asegurar que las condiciones de trabajo sean óptimas¹²⁴. La confluencia ideal para transfectarlas mediante electroporación, formación de micelas y formación de liposomas, es del 70%¹²⁴. Gracias a esta última característica y al hecho de no expresar ninguna isoforma de LXR, se seleccionó esta línea para la generación del modelo para evaluar la activación de LXRb con los extractos vegetales.

▪ Cultivos Primarios

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo y astrocitos se obtuvieron a partir de ratones C57BL/6 E18 o P0. Todo el procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar y con instrumentación estéril, como se describe a continuación:

En primer lugar las crías de ratón se colocaron en una caja de Petri sobre hielo durante aproximadamente 10 minutos para adormecerlas y proseguir a decapitarlas con tijeras. Posteriormente, con la ayuda de una caja de Petri las cabezas se embebieron en HBSS frío para la disección bajo un estereoscopio con ayuda de pinzas. Para realizar la disección se inicia retirando la piel y luego la calota para dejar expuesto el cerebro, el cual se retira con una espátula y se deposita en otra caja de Petri con HBSS. A

continuación se retiran las meninges y tomando el cerebro por el lado posterior se separan los hemisferios cuidadosamente simulando abrir un libro. De esta manera se dejan visibles los hipocampos, los cuales se remueven, para luego ser puestos en un tubo cónico con HBSS frío. Una vez aislados los hipocampos, se retiran el cerebelo y el bulbo olfatorio. Las cortezas se cortan por mitades 8 veces con un bisturí y se trasladan a otro tubo cónico con HBSS.

Una vez recolectados los tejidos se les agrega tripsina 10X y se incuban por 15 minutos (los hipocampos) y 30 minutos (las cortezas) a 37°C, agitando ocasionalmente. Las cortezas se centrifugan 5 minutos a 300g y los hipocampos se lavan dos veces con HBSS. Al retirar el sobrenadante se coloca medio completo al 10% de SBF y 1% P/S (Neurobasal para hipocampos y DMEM para glía) en el cual se disgregan las células. A continuación se pasan por un filtro de 70µm y con un hemocitómetro se realiza el conteo para sembrar 70000 células sobre cubreobjetos, de 12mm de diámetro, pre-tratados con poli-L Lisina dispuestos en cajas de 24 pozos con medio neurobasal al 5µM de glutamato en el caso de las neuronas hipocampales. Para el cultivo mixto de glía las células resuspendidas luego de la centrifugación, se siembran en una caja de 75cm² previamente tratada con poli-L-Lisina en medio DMEM al 200µM de glutamina. Una vez sembradas se incuban a 37°C. 3 horas después de sembradas las neuronas, se completó el volumen de medio a 600µL y se continuó la incubación. Cuando el cultivo llevaba 3 días, se cambia la mitad del medio por medio sin glutamato y se repite el procedimiento cada 3 días.

Posteriormente, en el día 12 las neuronas se usaron para los experimentos correspondientes. Por su parte los astrocitos se mantienen hasta el día 8, momento en el cual ya están confluentes y se procede a separarlos de los otros tipos celulares presentes en el cultivo. Para esto, la caja se agita en un durante 45 minutos a 0.7g en un agitador orbital. El sobrenadante se descarta y a las células adheridas a la caja se les adicionan 15 mL de medio completo y se agitan por 6 horas a 1.7g. El sobrenadante se descarta y las células adheridas a la caja se tripsinizan y se siembran en 2 cajas de 75. Se espera que se alcance una confluencia del 70% para usarlas en los experimentos, lo cual ocurre 6 días después de realizar la separación. En este momento se tripsinizan y se siembran en cajas de 24 pozos o en vidrios pre-tratados con poli-L Lisina 20X10⁴ células.

3.1.2 Extractos Vegetales

Los extractos empleados en esta tesis, se muestran en la tabla 3-1. Estos fueron donados por el profesor MSc. PhD Luis Enrique Cuca del Laboratorio de Productos Naturales Vegetales del departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. El procedimiento para obtener los extractos es el siguiente: El material vegetal se separó en los diferentes órganos vegetales como hojas, frutos, madera, corteza y raíces (cuando fue posible). Los órganos se secaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 días. A partir del material vegetal seco se pesaron muestras, entre 20 y 100 g para la obtención de extractos por maceración en frío con etanol. Los extractos alcohólicos se filtraron, luego se concentraron a presión reducida y se secaron en la cabina de extracción. Este procedimiento se realizó repetidamente hasta agotar el residuo obtenido.

Una vez los extractos estaban secos, se prepararon soluciones stock de 50ug/mL en DMSO, las cuales se almacenan protegidas de la luz a 4°C. Al momento de colocar los tratamientos a las células, se prepara una solución de trabajo 1mg/mL en medio DMEM, a partir del Stock. Con la solución de trabajo se realizan las diferentes diluciones requeridas para cada tratamiento.

Tabla 3-1: Extractos estudiados

EXTRACTO N°	FAMILIA	ESPECIE	ÓRGANO
1	<i>Lauraceae</i>	<i>Ocotea lanceolata</i>	Hojas
2	<i>Lauraceae</i>	<i>Cinamomun triplinerve</i>	Hojas
3	<i>Lauraceae</i>	<i>Nectandra reticulata</i>	Hojas
4	<i>Lauraceae</i>	<i>Nectandra lineata</i>	Hojas
5	<i>Lauraceae</i>	<i>Persea perseifila</i>	Hojas
6	<i>Lauraceae</i>	<i>Rhodostemonodaphne laxa</i>	Hojas
7	<i>Rutaceae</i>	<i>Zanthoxylum sp</i>	Hojas
8	<i>Rutaceae</i>	<i>Zanthoxylum sp</i>	Frutos
9	<i>Rutaceae</i>	<i>Zanthoxylum sp</i>	Madera
10	<i>Rutaceae</i>	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Corteza
11	<i>Myristicaeae</i>	<i>Virola carinata</i>	Hojas
12	<i>Myristicaeae</i>	<i>Virola carinata</i>	Corteza
13	<i>Myristicaeae</i>	<i>Virola sebifera</i>	Madera
14	<i>Myristicaeae</i>	<i>Virola sebifera</i>	Semillas
15	<i>Myristicaeae</i>	<i>Virola sp</i>	Hojas
16	<i>Myristicaeae</i>	<i>Virola sp</i>	Hojas
17	<i>Lauraceae</i>	<i>Nectandra sp</i>	Hojas
18	<i>Lauraceae</i>	<i>Endichleria oreocola</i>	Hojas
19	<i>Lauraceae</i>	<i>Endichleria paniculata</i>	Hojas
20	<i>Lauraceae</i>	<i>Nectandra reticulata</i>	Hojas

3.1.3 Reactivos

Para llevar a cabo cada uno de los experimentos, se emplearon diferentes tipos de reactivos entre los cuales encontramos compuestos puros para preparar las diferentes soluciones de trabajo, kits comerciales, anticuerpos, medios de cultivo y los suplementos correspondientes; los cuales se relacionan en las siguientes tablas:

Tabla 3-2: Reactivos empleados en cultivo celular

Reactivo	Marca	Referencia
DMEM con glucosa y glutamina	Lonza	12-604Q
DMEMF12	Lonza	12-719Q
OPTIMEM	Gibco	31985-070
Medio Neurobasal Primario	Lonza	CC-3256
Suero fetal bovino	Gibco	12657
Penicilina/Estreptomicina	Lonza	17-603E 10000U Pen/ml 10000ug Strep/ml
Tripsina	Sigma	9002-07-7
Poli-L-Lisina	Sigma	P1274
Lipofectamina2000	Thermoscientific	11668027
Azul de tripan	Lonza	17-942E

Tabla 3-3: Reactivos empleados en Westernblot

Reactivo	Marca	Referencia
Solución al 30% de Acrilamida	Bio-Rad	161-0156
Persulfato de Amonio (APS)	Amresco	0486-25G
Dodecil sulfato de Sodio (SDS)	ProPure	M107-500G
TEMED	Sigma	T9281-50ML
Buffer Laemmli	Biorad	161-0737
Marcador de peso	Thermoscientific	26619
Metanol	Panreac	131091.1211
Tween 20	BioBasic Inc	9005-64-5
Leche en polvo descremada baja en grasa	Colanta	ND
Tiomersal (Mertiolate ®)	MK	ND

Tabla 3-4: Kits utilizados.

Kit	Marca	Referencia	Uso
ECL	Thermoscientific	WP20005	Revelar membranas WB
Luciferasa	Thermoscientific	16176	Evaluar activación de LXR
BCA	Thermoscientific	23227	Cuantificar proteína
Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega	G1781	Cuantificar citotoxicidad de extractos

Tabla 3-5: Reactivos para preparación de soluciones

Reactivos	Marca	Referencia
Tris base	Promega	H5135
Glicina	J.T Baker	4059-02
Cloruro de Sodio	Analyticals	479687
Cloruro de Potasio	Merk	4936
Fosfato diácido de potasio	BDH chemicals	29608
Fosfato monobásico de sodio	Analyticals	480087
Inhibidores de Proteasas y Fosfatasas	Roche	04906845001 04693159001
Buffer RIPA	Thermoscientific	89900
Ácido Acético glacial	Mallinckrodt	V193
DMSO	Sigma	276855
N,N Dimetilformamida (DMF)	Panreac	161785.1611
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT)	Molecular Probes	M6494

Tabla 3-6: Soluciones utilizadas

Solución	Componentes	Ensayo
PBS 10X pH 7,4	NaCl 13,7 M KCl 27uM Na ₂ HPO ₄ 8uM KH ₂ PO ₄ 2uM	Cultivo, MTT
TBS 10X, pH 7,5	Tris-Base 1M NaCl 1,5 M	Western Blot
TTBS 1X	TBS 1X, Tween 20 al 2%	Western Blot
Buffer Bloqueo	5% leche en polvo en TTBS 1X	Western Blot
Solución de Lisis	40% Dimetilformamida 16% SDS Solvente: ácido acético al 2%	MTT
Buffer Towing 10X, pH 8,3	Tris-Base 248 mM Glicina 1,92 M SDS 10 g/L	Western Blot
MTT	2,75mg/mL de MTT Solvente: PBS 1X	MTT
SDS 10%	SDS en Agua	Western Blot
APS1%	Persulfato de amonio en agua	Western Blot
Tripsina 10X	Tripsina EDTA Penicilina/estreptomicina	cultivo

Tabla 3-7: Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Marca	Referencia N°	Dilución
Anti LXRb	Abcam	Ab 76983	1:500
Anti ABCA1	Abcam	Ab 18180	1:1000
Anti ApoE	Abcam	Ab 183596	1:1000
Anti b-actina	Sigma	A3854	1:25000
Anti-rabbit	Cell Signaling	7074p2	1:1000
Anti-mouse	Cell Signaling	7076s	1:1000

3.2 Equipos

Para llevar a cabo los experimentos de esta tesis, se usar diferentes equipos de laboratorio, los cuales se describe en la tabla 2-8.

Tabla 3-8: Equipos empleados.

Equipo	Marca	Referencia	Uso
Cámara de Electroforesis	BioRad	Mini-Protean-III Cell	Western Blot
Cámara para transferencia	BioRad	Mini-Protean-III Cell	Western Blot
Fotodocumentador	BioRad	ChemiDocTMMP System Software: Image Lab	Western Blot
Cabina de Flujo Laminar, Bioseguridad tipo II	NUAIRE	NU-425-300	Cultivo
Incubadora de CO ₂	NUAIRE	AutoFlow NU-8500 Water Jacket CO2 Incubator	Cultivo
Estereomicroscopio de fluorescencia	Zeiss	Axio Zoom V16	Verificación de transfección
Microscopio: Nikon	Nikon	Eclipse ti C1 plus Software: Nikon EZ-C1	Seguimiento cultivo celular
Fluorómetro	Biotek	FLx800 Software: Gen5	Medición actividad luciferasa
Lector de placas	Tecan	Sunrise™ Absorbance Reader. Software: Magellan	Cuantificación de Proteínas y ensayo MTT

3.3 Métodos

3.3.1 Determinación de las Concentraciones de Trabajo.

En primer lugar, se debía saber si los extractos seleccionados tenían un efecto sobre la viabilidad de las células de trabajo, y así determinar las concentraciones óptimas a emplear en los ensayos posteriores. Para esto las células se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones de cada extracto en un rango entre 25 a 250ug/mL (diluciones preparadas en DMEM), y la viabilidad se evaluó empleando un ensayo de actividad mitocondrial y siguiendo la morfología celular por microscopía. Paralelamente se realizó

también un ensayo de liberación de LDH para corroborar procesos de muerte celular.

- **Viabilidad Celular**

El ensayo de MTT permite inferir la viabilidad celular de forma indirecta. Consiste en evaluar la actividad mitocondrial a través de la reducción de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) en un compuesto coloreado de formazan, por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. El producto de la reacción se acumula intracelularmente en cristales, por lo cual para su cuantificación es necesario lisar las células y disolver los cristales¹²⁶. De esta forma a mayor concentración de formazan, mayor actividad mitocondrial y por ende mayor viabilidad celular.

- **Citotoxicidad**

La liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) permite evaluar la citotoxicidad de un tratamiento en modelos celulares. El ensayo consiste en la reducción de una molécula de NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ por la enzima LDH liberada por las células en procesos de lisis celular. Esta reacción se acopla a la conversión de una sal de tetrazolio en un compuesto coloreado (rojo) tipo formazan¹²⁷ (Figura 3-1).

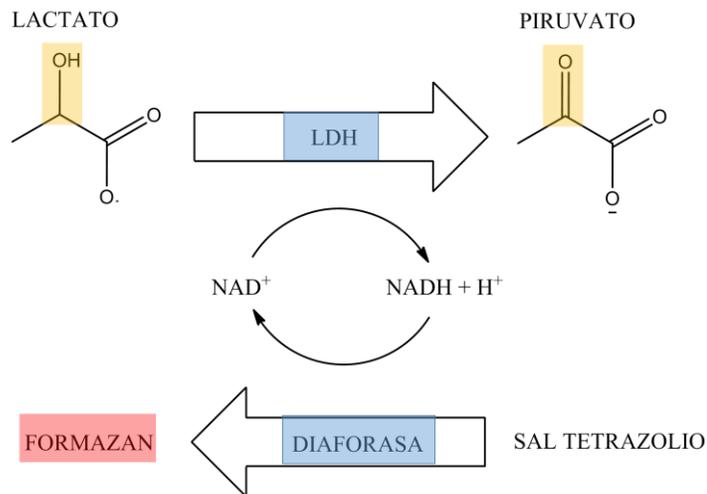


Figura 3-1: Reacciones presentes en ensayo LDH

Esquema de la reacción catalizada por la enzima LDH, acoplada a la reacción de la enzima Diaforasa, empleada para cuantificar muerte celular cuando hay ruptura de la membrana plasmática.

Inicialmente, las células HEK293 y SHSY-5Y, se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 25000 células/pozo. Una vez las células estaban adheridas se colocan los tratamientos (Tabla 3-9) por 24 horas en un volumen final de 150uL. Finalizado el tratamiento se retiran 50uL para el ensayo de citotoxicidad y se transfieren a otra caja de 96 pozos. A continuación, se agregaron 10uL de solución de MTT en PBS (2,75mg/mL) a las células para incubarlas por 2 horas a 37°C (ensayo de viabilidad celular). Transcurrido el tiempo se removió el medio teniendo cuidado de no retirar los cristales. A cada pozo se adicionaron 100uL de solución de lisis (Tabla 3-5) y junto con agitación vigorosa por 20 minutos se disolvieron los cristales, obteniéndose una solución purpura homogénea. Se midió la absorbancia de cada pozo a 595nm empleando un lector de placas.

Para el ensayo de citotoxicidad en células HEK293, se adicionaron 50uL de solución de trabajo (contiene sustrato) a 50uL el sobrenadante previamente recolectado, de muestras, controles (control positivo: 100% de lisis y control negativo: células sin tratamiento) y blancos, y se incubó a 37°C por 30 minutos, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Finalizada la incubación se detuvo la reacción con la solución de parada y se procedió a cuantificar la señal, a 490nm, en un lector de placas, y mediante la ecuación 3-1 se determinó el porcentaje de citotoxicidad de cada tratamiento.

Ecuación 3-1

$$\%Citotoxicidad^* = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{maxima}} \times 100$$

*Donde $Abs_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra menos la absorbancia del blanco (medio de cultivo) y $Abs_{máxima}$ es la absorbancia del control positivo (células sin tratamiento lisadas con Tritón x-100) menos la absorbancia del blanco.

Tabla 3-9: Tratamientos, Controles y Blancos empleados en ensayos de MTT y LDH

Concentraciones evaluadas para cada extracto (ug/mL)	Controles positivos	Blancos
250	Células sin Tratamiento (MTT)	Solución de Lisis (MTT)
125		
75	Células lisadas con Triton x-100 (LDH)	DMEM+ Solución trabajo+ Solución de parada (LDH)
25		

3.3.2 Transfección de células HEK

Paralelamente a la evaluación de la citotoxicidad de los extractos sobre las líneas celulares, se generó un sistema para estudiar la activación de LXRb en las células HEK293. El sistema consiste en transfectar las células con un plásmido de expresión para LXRb (pCMX-LXRb), un plásmido que permita expresar un gen reportero (Luciferasa) dependiente de la activación de LXRb(LXRE-Luc), y finalmente un plásmido cuyo gen reportero (GFP) no dependa de LXRb para expresarse(pEGFP-N1) tabla 3-10. Este tipo de modelo lo han utilizado diferentes investigadores¹²⁸⁻¹³⁰ donde la principal variación es el gen reportero independiente. Algunos emplean una luciferasa distinta¹³¹, otros betagalactosidasa^{130,132} y algunos GFP¹³³. Este segundo gen reportero permite normalizar el proceso de transfección. Este gen se puede usar en el mismo plásmido que contiene el gen reportero regulado por el factor de transcripción a estudiar o en un plásmido independiente como se realizó en esta tesis.

Para realizar la transfección de las células HEK293, éstas se sembraron en cajas de 6 ($1,5 \times 10^5$ células/pozo) y 96 pozos (5×10^3 células/pozo) y se dejaron adherir a la superficie durante toda la noche. Al día siguiente se cambia el medio por DMEM al 0,1% de SFB una hora antes de colocar la mezcla de transfección; la cual consiste en lipofectamina y los plásmidos disueltos en Optimem preparada según las recomendaciones del fabricante. En el proceso de estandarización se evaluaron diferentes concentraciones de los plásmidos como se muestra en la tabla 2-10. 24 horas después de realizada la transfección se observan las células en un estereomicroscopio de fluorescencia, a 112X, para confirmar que éstas hayan adquirido el nuevo ADN, empleando un filtro de 488nm que permite ver el GFP sintetizado por las células. Una vez verificado esto se colocan los tratamientos.

Tabla 3-10: Plásmidos empleados para evaluar activación de LXRb

Constructo	Uso	Cantidades Evaluadas(ng)	Origen	Referencia
LXRE-LUC	Gen reportero luciferasa dependiente de LXR	170 300 500	Donado por el MD.PhD Peter Tontonoz de la Universidad de California (UCLA)	Laffitte ¹²⁹
LXRE-LUC*(C-)	Gen reportero luciferasa dependiente de LXR truncado	170		Laffitte ¹²⁹
pCMX-LXRb	Expresión de LXRb	30 60 100		Umesono y Laffite ^{128,129}
pEGFP-N1	Gen reportero GFP independiente de LXR	8 12 24	-	Cormack ¹³⁴

3.3.3 Ensayo de Transactivación

Los ensayos con genes reporteros como el gen codificante de la enzima luciferasa, son ampliamente usados para estudiar fenómenos relacionados con la expresión génica. Estos experimentos consisten en emplear vectores que contienen la secuencia de nucleótidos del reportero, cuya transcripción está regulada por la región promotora de interés. Así la cantidad de proteína traducida será proporcional al evento a estudiar en el promotor.

En este caso, el ensayo se emplea para medir la activación del factor de transcripción LXRb, así que en la región promotora de la secuencia codificante para la luciferasa, se encuentra el elemento de respuesta de LXRb, por lo cual cuanto mayor sea su activación, se acrecentará la actividad enzimática, cuantificada mediante la cantidad de luz producida (figura 3-2).

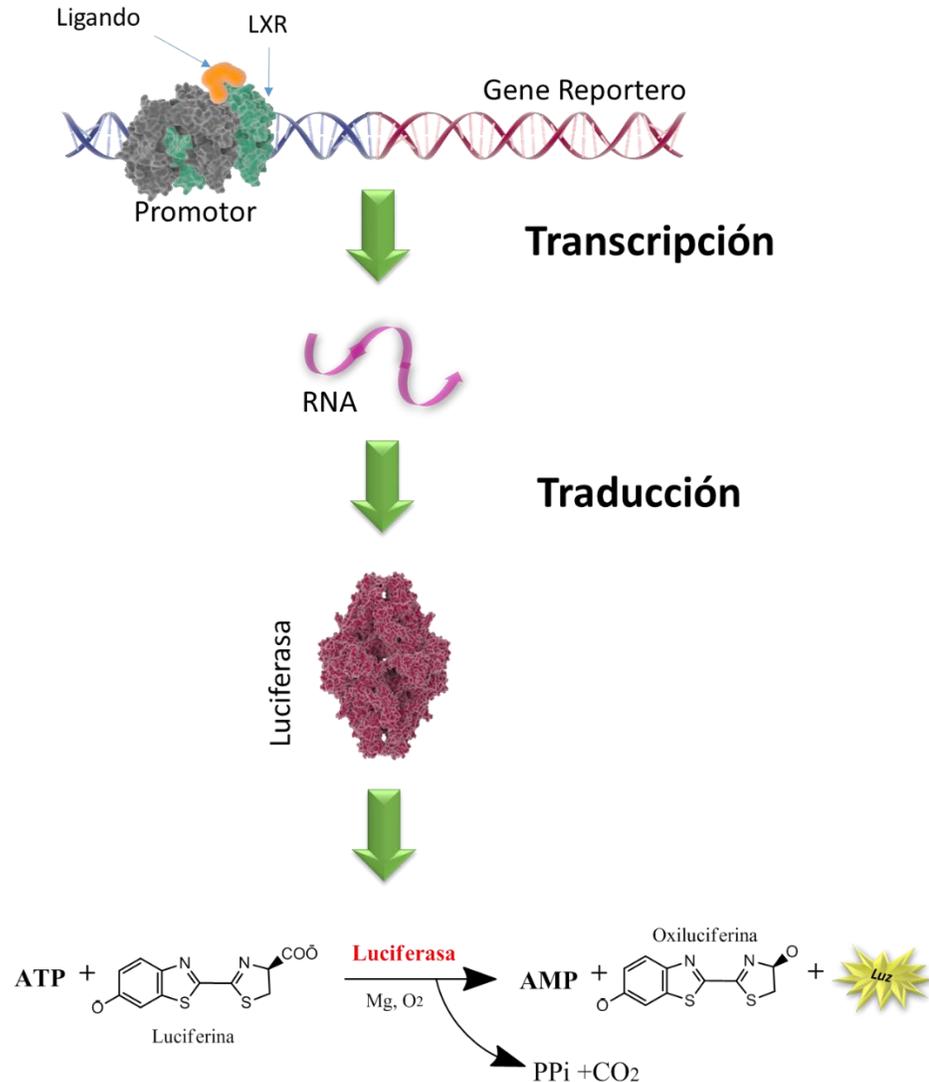


Figura 3-2: Ensayo de Transactivación empleando luciferasa como gen reportero.

Representación de los procesos celulares que ocurren durante el ensayo para evaluar la activación de LXR donde el gen reportero es la enzima luciferasa.

Para este ensayo se usaron células HEK293 transfectadas para expresar LXR β , GFP, y luciferasa dependiente de la activación de LXR, y un kit para evaluar actividad luciferasa (Thermoscientific Massachussets, USA). En primer lugar, 24 horas después de transfectar las células, se cambia el medio a DMEM al 1% de suero y se colocan los tratamientos, cada uno por triplicado, de acuerdo a las concentraciones determinadas en los ensayos

de viabilidad y citotoxicidad (ver tabla 4-1), y se incuban a 37°C durante 24 horas. Cumplido ese tiempo se retira el medio y se hace un lavado con PBS 1X teniendo cuidado de no perturbar la monocapa. A continuación se lisan las células con 100uL del buffer de lisis que viene en el kit durante 15 minutos bajo una agitación moderada. Posteriormente se toman 20uL del lisado, se colocan en una caja de 96 pozos negra y se adicionan 50uL de solución de trabajo (contiene luciferina). Con la caja dentro del Fluorómetro se esperan 10 minutos para que se establezca la señal, y se realiza la lectura de luminiscencia a 560nm, dos veces consecutivas para asegurar la precisión de la medida. Finalmente se hace una medición de fluorescencia de GFP, la cual servirá para la normalización de la medición de luminiscencia.

3.3.4 Evaluación de la expresión de proteínas

Para evaluar los cambios en la expresión de APOE y ABCA1 con los diferentes extractos, se empleó la línea celular SHSY-5Y, y la técnica de Western Blot. En este caso se sembraron 150.000 células por pozo en cajas de 6 pozos, y una vez se encontraban adheridas a la matriz, se colocaron los tratamientos seleccionados de acuerdo al ensayo transactivación, durante 24 horas. Finalizado este tiempo, se evaluó la expresión de ABCA1 y APOE en extractos de proteína total.

Extracción y cuantificación de proteínas

Una vez terminado el tiempo de los tratamientos, se retiró el sobrenadante y se hicieron 3 lavados con PBS 1X con cuidado de no despegar la monocapa de células. Posterior a esto, se lisaron las células con buffer RIPA y una solución de inhibidores de fosfatasa y proteasas. El lisado se centrifuga a 17000g durante 15 minutos a 0°C, luego se aplican 3 pulsos de ultrasonido, de 3 segundos cada uno, a 20% de amplitud, y finalmente se centrifuga una vez más a 17000g durante 15 minutos a 0°C. Por último, se cuantificó la proteína total en el extracto empleando un kit basado en el método de ácido bicinónico (BCA) (Thermoscientific, Massachusetts, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Western Blot

La separación de proteínas (SDS-PAGE) se llevó a cabo en un sistema miniprotean 3 de Bio-Rad con buffer towing 1X, empleando geles al 12%. Por muestra se sembraron 30ug de proteína total previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 96°C. El corrido se inició a 50 voltios durante 50 minutos para que las muestras se alinearan, una vez las muestras estaban alineadas en el gel de separación el voltaje se aumentó a 90 voltios hasta observar que el frente de corrido llegaba al borde inferior del vidrio que contenía el gel (90 minutos); adicional a esto se usó un marcador de peso (Thermoscientific, Massachusetts, USA) para seguir el proceso de separación.

Con las proteínas separadas se procedió a transferirlas a una membrana de PVDF, previamente activada con metanol, empleando buffer Towing 1X al 20% de metanol y 250mA durante 2 horas. La membrana que contenía las proteínas se bloqueó por 1 hora empleando buffer de bloqueo (tabla 3-6), y luego se incubo toda la noche a 4°C en anticuerpo primario. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TTBS 1X. Inmediatamente se incubó en anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente, para luego hacer 3 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TTBS 1X y proceder a revelar en un fotodocumentador (Bio-Rad California, USA) y el kit de revelado ECL (Thermoscientific, Massachusetts, USA). Las densitometrías se hicieron con el software ImageLab.

3.3.5 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software Graph Pad Prism 5, teniendo en cuenta que los datos obtenidos en cada experimentos, corresponden a tres replicas biológicas independientes, cada una por triplicado. Los resultados, se expresaron como promedio \pm SEM. En todos los experimentos se realizaron pruebas *t de student* al 95% de confianza.

4. Resultados

4.1 Objetivo específico 1: Ensayos de Viabilidad y Citotoxicidad

Los resultados de los experimentos de MTT y LDH, mostraron que los extractos 1, 10 y 16 (hojas de *Ocotea lanceolata*, corteza de *Zanthoxylum rhoifolium*. y Hojas de *Virola* sp.) en ninguna de las concentraciones empleadas, disminuían en más de un 30% la viabilidad celular y la liberación de la enzima LDH fue menor al 30% (figura 4-1 A). La morfología, durante el ensayo no cambió viéndose células adheridas, refringentes, con forma fibroblástica (alargada), como se muestra en la figura 4-1 B. Adicionalmente, en el caso del extracto 1 (hojas de *Ocotea lanceolata*), el ensayo de MTT muestra una tendencia a promover proliferación.

De otra parte los extractos 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 18 y 19 mostraron efectos adversos en las células en concentraciones superiores a los 75 ug/mL. De esta manera, las células se observaban flotando y con una morfología circular además de presentar, en promedio, un porcentaje de citotoxicidad superior al 40%. Por su parte las concentraciones de 25 y 75 ug/mL permiten observar células en un estado saludable, adheridas y refringentes, con actividad mitocondrial superior al 70% y un porcentaje de liberación de LDH menor al 30% (ver anexo A). Los demás extractos sólo mantenían la viabilidad celular por encima del 70% a concentraciones iguales o menores 25 ug/mL. En la tabla 4-1 se resumen las concentraciones de trabajo establecidas a partir de estos ensayos.

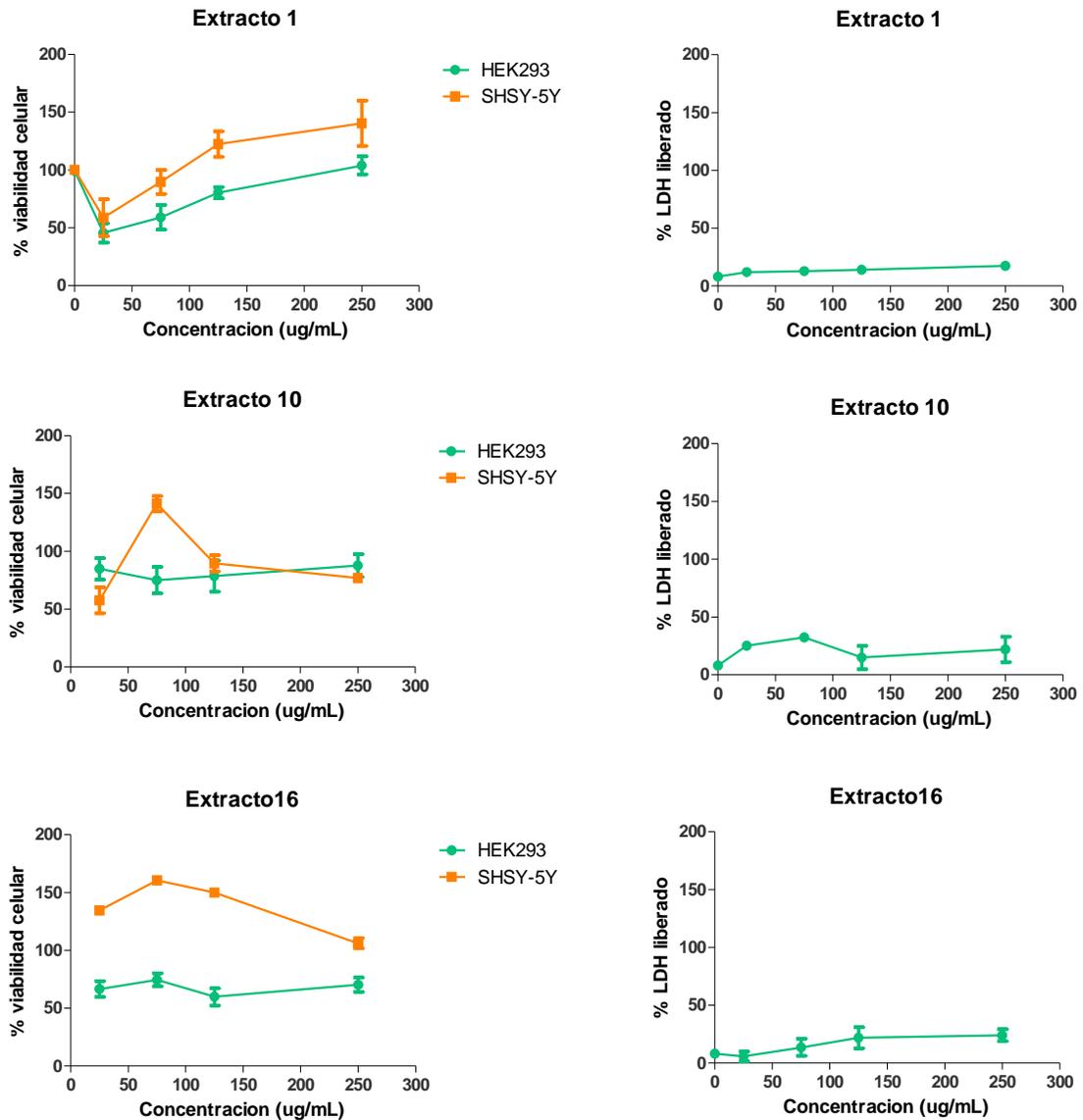
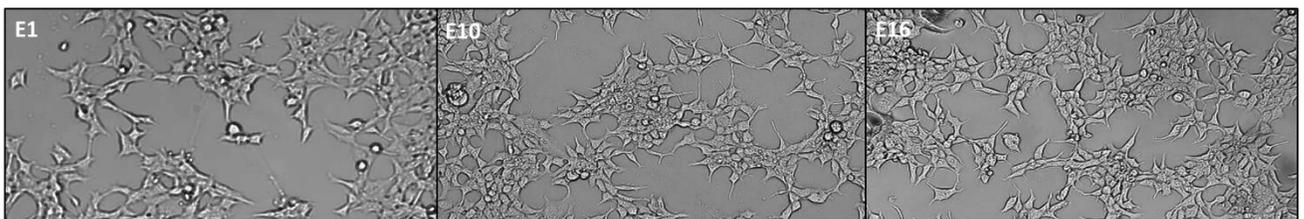
A**B**

Figura 4-1: Viabilidad y Citotoxicidad extractos 1, 10 y 16

A. Evaluación de viabilidad celular (MTT) y citotoxicidad (LDH) de los extractos 1, 10 y 16, los cuales resultaron poco tóxicos para las células en todas las concentraciones estudiadas. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes ($n=3$ por cada experimento). **B.** Fotografías de las células HEK293 24h después de los tratamientos con los extractos 1 (E1), 10 (E10) y 16 (E16) a 250 ug/mL.

Tabla 4-1: Concentraciones de trabajo determinadas para cada extracto

Tratamiento	Concentración (ug/mL)	Especie	Órgano
Extracto 1	250	<i>Ocotea lanceolata</i>	Hojas
Extracto 2	15	<i>Cinamomun triplinerve</i>	Hojas
Extracto 3	25	<i>Nectandra reticulata</i>	Hojas
Extracto 4	25	<i>Nectandra lineata</i>	Hojas
Extracto 5	75	<i>Persea perseifila</i>	Hojas
Extracto 6	75	<i>Rhodostemonodaphne laxa</i>	Hojas
Extracto 7	75	<i>Zanthoxylum sp</i>	Hojas
Extracto 8	25	<i>Zanthoxylum sp</i>	Frutos
Extracto 9	75	<i>Zanthoxylum sp</i>	Madera
Extracto 10	250	<i>Zanthoxylum sp</i>	Corteza
Extracto 11	75	<i>Viola carinata</i>	Hojas
Extracto 12	75	<i>Viola carinata</i>	Corteza
Extracto 13	75	<i>Viola sebifera</i>	Madera
Extracto 14	75	<i>Viola sebifera</i>	Semillas
Extracto 15	25	<i>Viola sp</i>	Hojas
Extracto 16	250	<i>Viola sp</i>	Hojas
Extracto 17	25	<i>Nectandra sp</i>	Hojas
Extracto 18	75	<i>Endichleria oreocola</i>	Hojas
Extracto 19	75	<i>Endichleria paniculata</i>	Hojas
Extracto 20	25	<i>Nectandra reticulata</i>	Hojas

Adicionalmente, al estudio de los extractos crudos se evaluaron también las fracciones en metanol, diclorometano y acetato de etilo del extracto 1, además de los compuestos volátiles (aceite esencial). Teniendo en cuenta que el extracto crudo tiene un comportamiento similar en las dos líneas celulares estudiadas, se decide evaluar viabilidad y citotoxicidad únicamente en células HEK293. En este experimento, las fracciones en los diferentes solventes orgánicos, no afectaron la viabilidad celular de ninguna forma; mientras que el aceite muestra efectos citotóxicos a concentraciones superiores a 12 ug/mL.(figura 4-2)

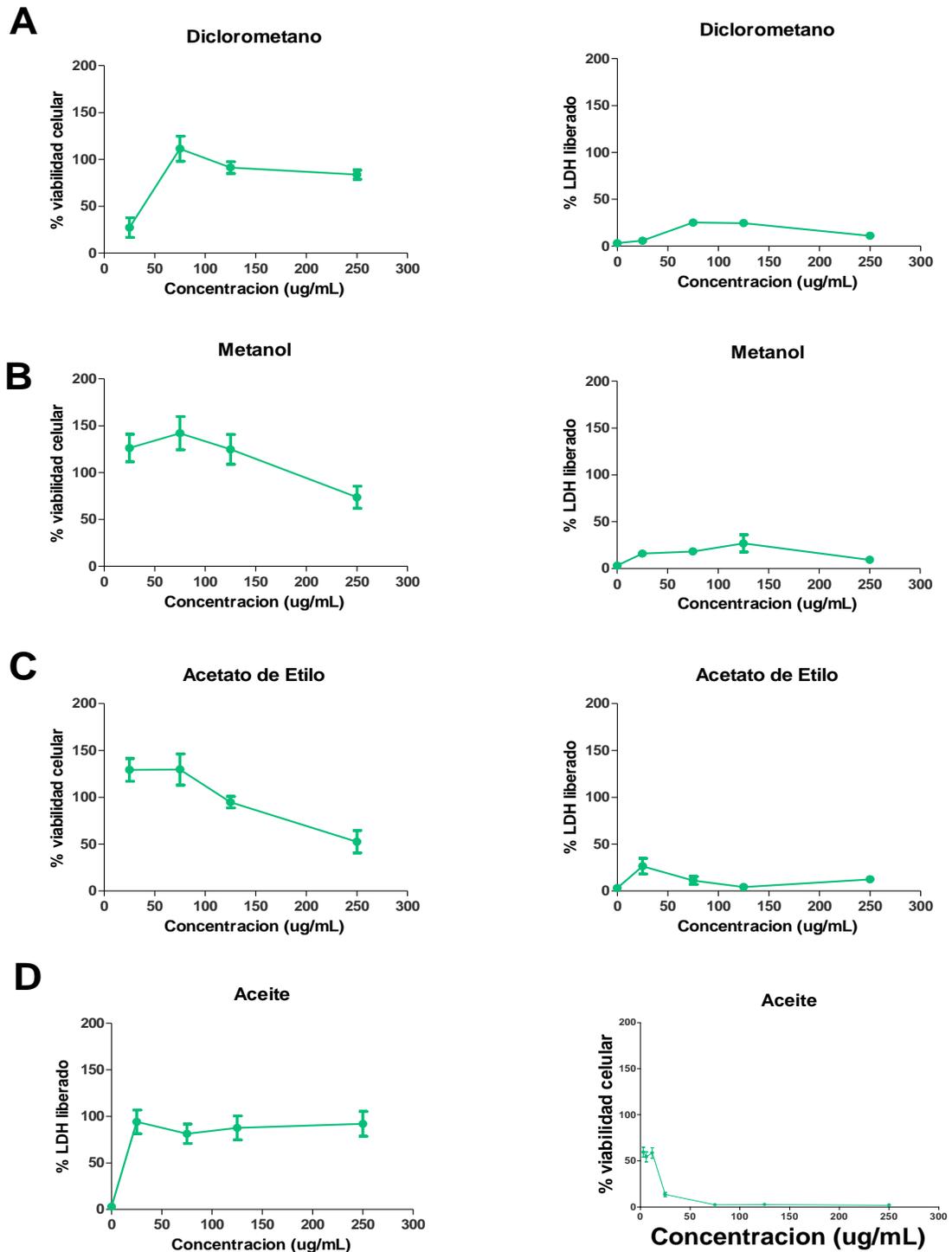


Figura 4-2: Viabilidad y citotoxicidad de las fracciones del extracto 1.

Viabilidad celular (MTT) y citotoxicidad (LDH) determinadas para cada una de las fracciones y el aceite provenientes del extracto 1 en células HEK293. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes ($n=3$ por cada experimento).

En el caso del extracto 10, se evaluó la citotoxicidad y el efecto en la viabilidad celular, de extractos obtenidos del mismo organismo, pero de otros órganos: hojas, madera y frutos. Se observó que la viabilidad celular no se reduce en ninguna de las concentraciones de trabajo, y la citotoxicidad es menor al 30%. (figura 4-3)

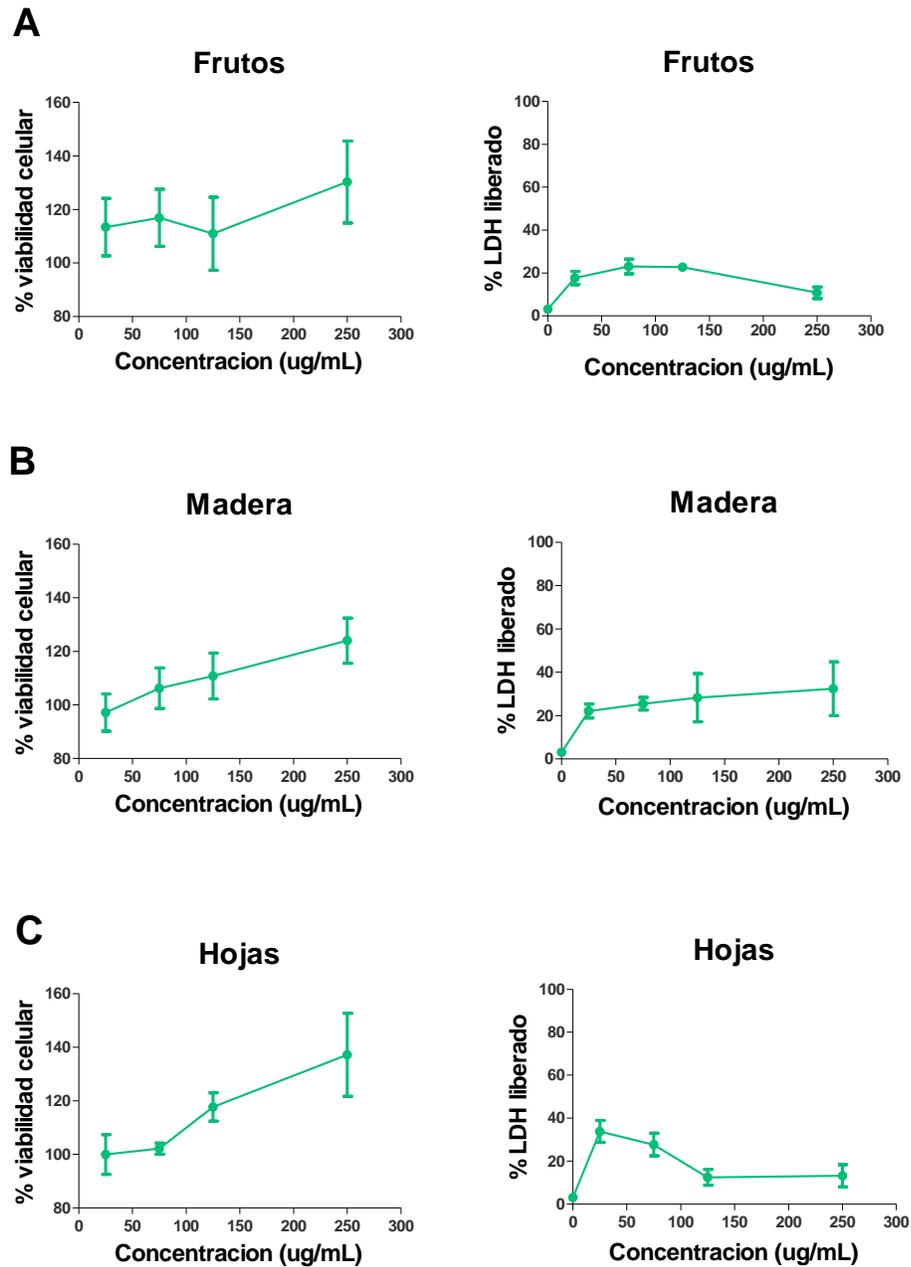


Figura 4-3: Viabilidad y citotoxicidad de otros extractos provenientes de *Zanthoxylum rhoifolium*. Viabilidad celular (MTT) y citotoxicidad (LDH) determinada para extractos de otros órganos de *Zanthoxylum rhoifolium* (A-C). Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento).

Se ha observado que extractos y compuestos aislados de plantas de las familias *Lauraceae*, *Myristicaceae* y *Rutaceae* tienen comportamientos variados frente a la viabilidad celular. Algunos efectos son muy negativos como los reportados por Pacifico *etal.*, donde los extractos de hojas de *Laurus nobilis*, presentan efectos citotóxicos frente a células SHSY-5Y¹³⁵. Paralelamente, otros estudios muestran efectos benéficos, por ejemplo, los sesquiterpenos encontrados por Qin-Gen en un extracto vegetal de una rutácea, muestra un carácter protector en células hepáticas¹³⁶.

4.2 Objetivo específico 2: Estandarización del sistema para evaluar la activación de LXRb

Paralelamente a la evaluación de la citotoxicidad de los extractos sobre las líneas celulares, se generó un sistema para estudiar la activación de LXRb en las células HEK293. El sistema consiste en transfectar las células con un plásmido de expresión para LXRb (pCMX-LXRb), un plásmido que permita expresar un gen reportero (Luciferasa) dependiente de la activación de LXRb (LXRE-Luc), y finalmente un plásmido cuyo gen reportero (GFP) no dependa de LXRb para expresarse (pEGFP-N1). Este tipo de modelo lo han utilizado diferentes investigadores¹²⁸⁻¹³⁰ donde la principal variación es el gen reportero independiente. Algunos emplean una luciferasa distinta¹³¹, otros betagalactosidasa^{130,132} y algunos GFP¹³³. Este segundo gen reportero permite normalizar el proceso de transfección. Este gen se puede usar en el mismo plásmido que contiene el gen reportero regulado por el factor de transcripción a estudiar o en un plásmido independiente como se realizó en esta tesis.

El proceso de transfección se siguió mediante WesternBlot de LXRb y por microscopía de fluorescencia (GFP). Se encontró que las diferentes concentraciones de plásmido empleadas permiten expresar LXRb y GFP en la línea celular, mientras que las células que no se trataron de ninguna forma y aquellas que se transfectaron con un plásmido truncado no presentaron fluorescencia ni la presencia de LXRb como se aprecia en la figura 4-4.

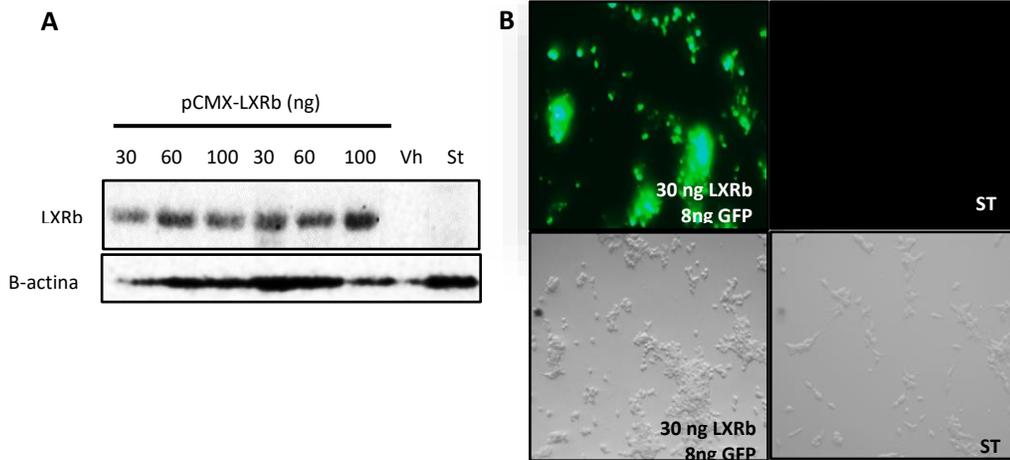


Figura 4-4: Confirmación de la transfección de células HEK293 para generación de modelo de trabajo.

A Expresión de LXRb en células HEK293 empleando diferentes concentraciones de plásmido pCMX-LXRb y concentraciones constantes de los plásmidos LXRE-LUC y GFP, donde Vh representa células que pasaron por el proceso de transfección sin usar plásmido pCMX-LXRb, y St a las células HEK293 sin ningún tratamiento. **B** Evaluación por microscopía de fluorescencia del proceso de transfección.

Finalmente se evaluó la producción de luciferasa dependiente de la activación de LXRb en el sistema. Para esto, se trataron las células transfectadas con el agonista sintético de LXR, GW3965, a una concentración de 10 μ M (6 μ g/mL), la cual no genera muerte celular y si una máxima activación¹³⁷. Como resultado, se observa que los controles de células sin transfectar (ST), así como de células transfectadas y tratadas con el vehículo y de células transfectadas con el plásmido truncado y tratadas con el agonista GW3965, presentan una mínima actividad luciferasa. Por su parte las células transfectadas y tratadas con el agonista GW3965 muestran una actividad agonista cinco veces mayor y significativamente diferente a las células de los controles previamente mencionados como se muestra en la figura 4-5. Lo anterior nos permite afirmar que el modelo generado permite evaluar la activación del receptor LXRb, empleando la luciferasa como gen reportero de forma específica.

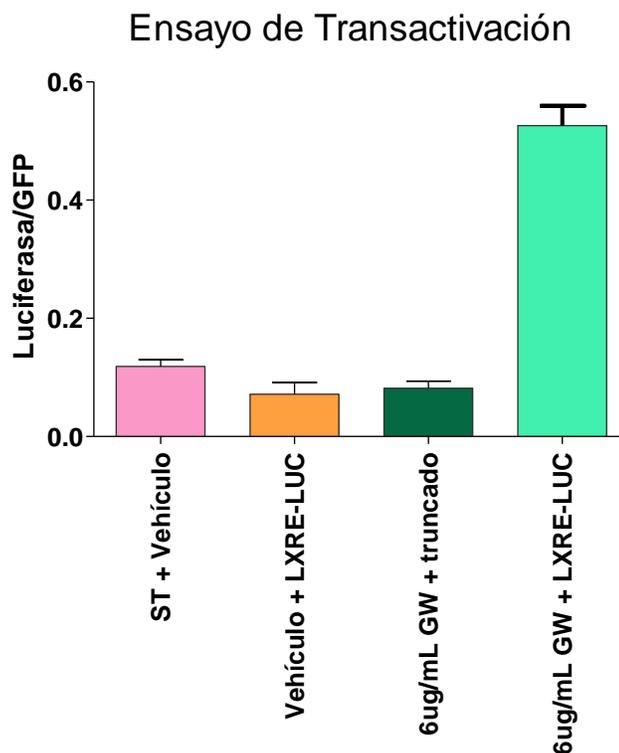


Figura 4-5 Estandarización del ensayo de Transactivación de LXRb.

Ensayo de actividad luciferasa llevado a cabo en células HEK293 sin transfectar y tratadas con vehículo (barra rosa), transfectadas y tratadas con vehículo (barra naranja), transfectadas con los plásmidos pCMX-LXRb y LXRE-Luc, y tratadas con el agonista sintético de LXR, GW3965 (barra verde claro); y transfectadas con los plásmidos pCMX-LXRb y LXRE-Luc truncado y tratadas con el agonista GW3965 (barra verde oscuro). Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). La comparación estadística se realizó usando un análisis de *t de student* ** $p < 0,01$

Estos resultados permitieron establecer condiciones óptimas y eficientes de transfección (tabla 4-2), para realizar los ensayos con los extractos vegetales, las cuales resultaron similares a las reportadas por Moutinho, quien utiliza un sistema muy parecido, incluyendo el mismo plásmido reportero (LXRE-LUC)¹³².

Tabla 4-2: Cantidades de cada plásmido estandarizadas

CONSTRUCTO	CANTIDAD USADA POR CADA 5×10^4 CÉLULAS (NG)
LXRE-LUC	160
LXRE-LUC*(C-)	160
pCMX-LXRb	30
pEGFP-N1	8

4.3 Objetivo específico 3: Evaluación de la actividad agonista de los extractos:

En el sistema previamente generado, se evaluó si los extractos eran capaces de activar a LXRb. Como se observa en la figura 4-6, en este experimento se encontró que los extractos 1, 3 y 10 producen una activación del receptor nuclear en una proporción similar a la generada por el agonista sintético, mientras que los extractos 14, 15 y 17, aunque presentan actividad luciferasa esta no es tan alta como la del GW3965. Finalmente, en el resto de los extractos no se encontró actividad agonista LXRb; sin embargo, los extractos 5, 6 y 7 parecen mostrar actividad antagonista al reducir la activación “basal” del receptor. De acuerdo a estos resultados se seleccionaron los extractos 1, 3 y 10 para realizar los ensayos posteriores

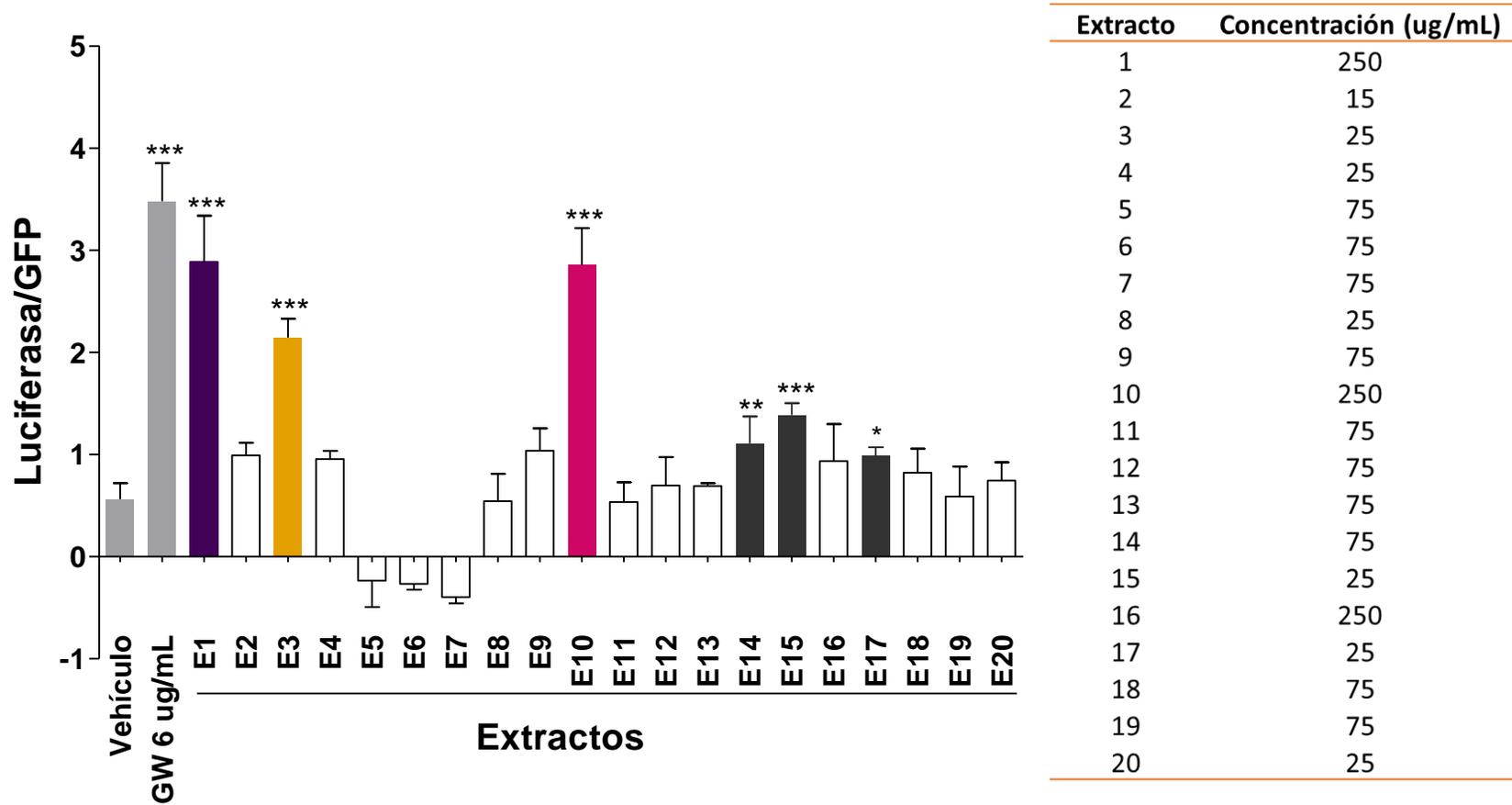


Figura 4-6: Evaluación de la actividad agonista de los extractos frente a LXRb en el modelo generado de células HEK293.

Ensayo de actividad luciferasa para evaluar activación de LXRb con la concentración determinada por los ensayos de viabilidad celular en el modelo de células HEK293 transfectadas. El vehículo es DMSO. Las barras coloreadas en violeta, amarillo y rosado, corresponde a los extractos que presentan la mayor actividad agonista respecto al vehículo, y que se seleccionaron para los ensayos posteriores; en gris oscuro se muestran los extractos con actividad agonista leve, y en blanco los extractos sin actividad. En gris claro se muestra el efecto del vehículo y el agonista sintético GW3965 a 6ug/mL(control positivo). Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student* * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

4.4 Efecto de los extractos con actividad agonista sobre la expresión de ABCA1 y ApoE en células SH-SY5Y: Resolución Objetivo específico 4.

Una vez determinado que los extractos 1 (*Ocotea lanceolata*), 10 (*Zanthoxylum rhoifolium*) y 3 (*Nectandra reticulata*) logran activar a LXRb, se procedió a evaluar la expresión de ABCA1 y ApoE mediante WesternBlot en la línea celular SH-SY5Y, que expresa tanto LXR como ABCA1 y ApoE⁷². Se observó que los extractos 3 y 10 produce aumento de ABCA1 y Apoe, siendo el extracto 3 quien mayores cambios genera (figura 4-7). Estas observaciones son sorprendidas teniendo en cuenta que los extractos 1 y 10 producen una activación del receptor en igual intensidad al agonista sintético, el cual sí genera cambios drásticos en la expresión de ambas proteínas. Lo anterior, lleva a pensar que otros compuestos en dichos extractos están regulando la expresión, posiblemente a niveles postrascriptoriales, o que se encuentran acelerando su tasa de degradación. Para esto se procedió a estudiar tanto el comportamiento de fracciones del extracto frente a la activación de LXRb (ensayo de luciferasa) como su efecto en la expresión de las proteínas blanco.

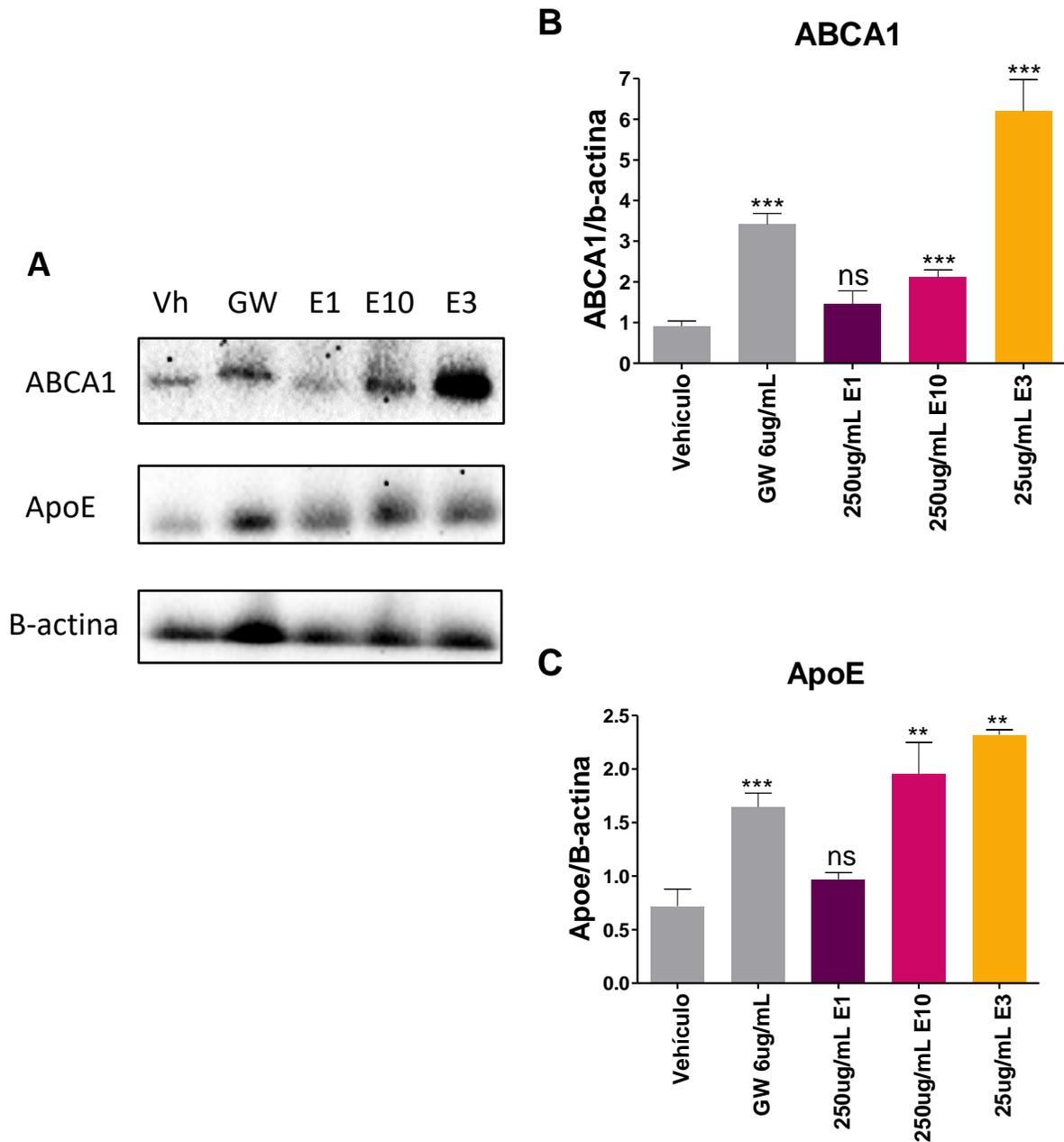


Figura 4-7: Los Extractos 1, 3 y 10 cambian la expresión de ABCA1 y ApoE en células SH-SY5Y.

A WesternBlot en células SH-SY5Y tratadas con vehículo, 6ug/mL del agonista sintético GW3965, Extracto 1 250ug/mL, Extracto 3 25ug/mL y Extracto 10 250ug/mL durante 24 horas. **B** Densitometría para ABCA1. **C** Densitometría para ApoE. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=2 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student*; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.5 Resultados Adicionales

4.5.1 Efecto de los extractos 1 y 10 en cultivos primarios de neuronas hipocampales y astrocitos

En el camino para darle mayor relevancia biológica a los resultados obtenidos con la línea celular SH-SY5Y, se decidió estudiar el comportamiento de ApoE y ABCA1 en cultivos primarios de neuronas y astrocitos frente a los extractos seleccionados. En la figura 4-8 se muestra que el extracto 10 logra aumentar expresión de ApoE por encima del tratamiento con GW3965 y ABCA1 en igual proporción que el agonista sintético en neuronas. Sin embargo, el extracto 1 solo incrementa en una cuarta parte la expresión de ApoE en las neuronas.

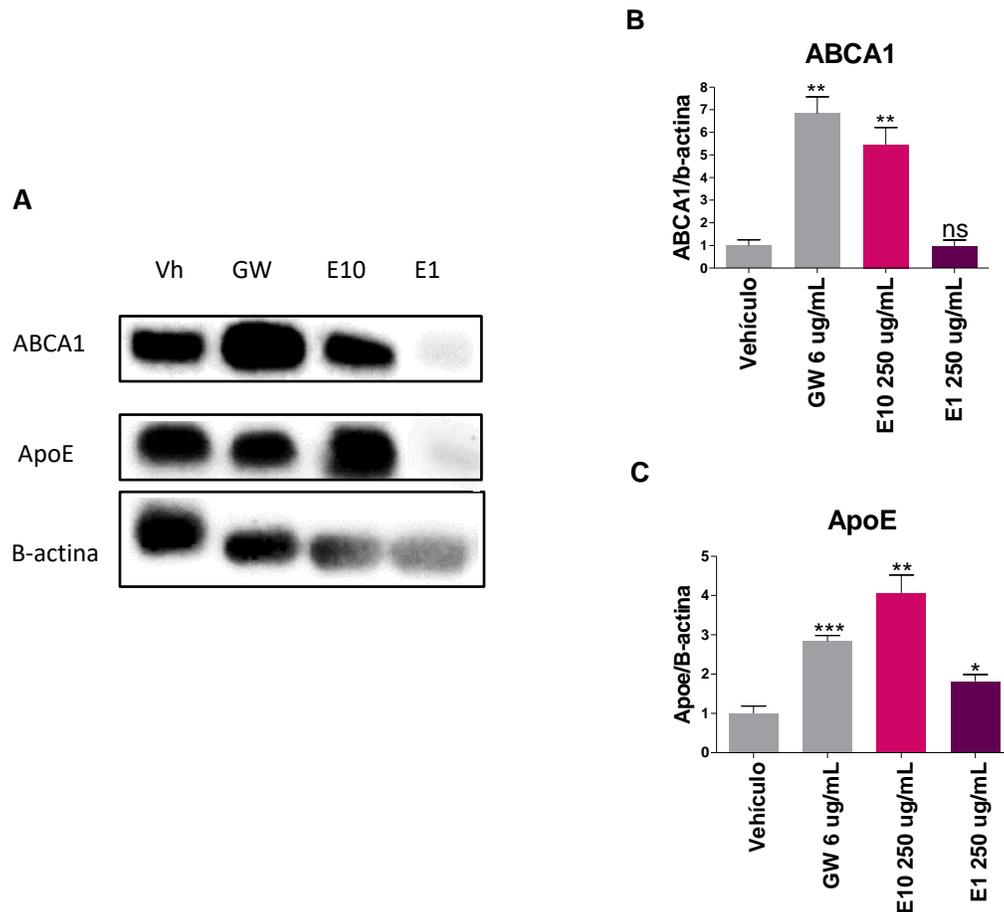


Figura 4-8: El extracto 10 cambia la expresión de ABCA1 y ApoE en neuronas hipocampales.

A WesternBlot en cultivo primario de neuronas hipocampales tratadas con vehículo 6ug/mL del agonista sintético GW3965, Extracto 1 250ug/mL, y Extracto 10 250ug/mL durante 24 horas. **B** Densitometría para ABCA1. **C** Densitometría para ApoE. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=2 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student*; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

En el caso de los astrocitos el extracto 10 acrecienta ApoE y ABCA1. Sin embargo, este aumento es menor al obtenido con el GW3965. Por su parte, el extracto 1 solo produce un incremento en ABCA1. Finalmente, el extracto 3 logra aumentos tanto en ABCA1 como en ApoE, donde el efecto sobre ApoE no es superior al generado por el agonista sintético (figura 4-9).

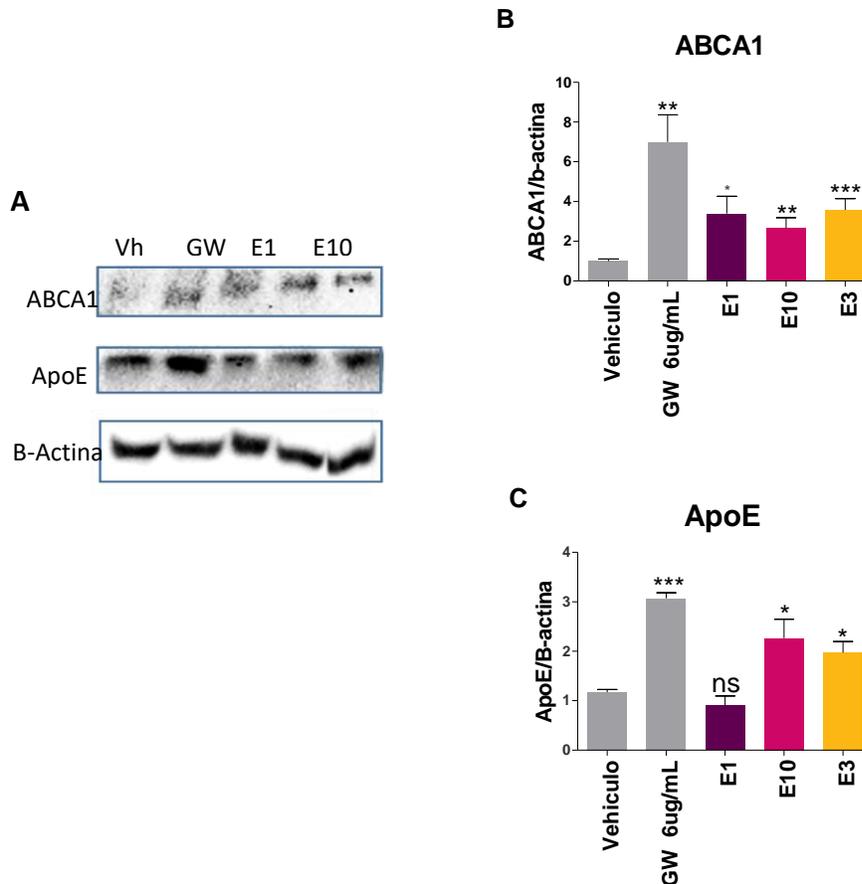


Figura 4-9: Extractos 3 y 10 aumentan expresión de ABCA1 y ApoE en Astrocitos

A WesternBlot en cultivo primario de astrocitos tratadas con vehículo 6ug/mL del agonista sintético GW3965, Extracto 1 250ug/mL, Extracto 10 250ug/mL y Extracto 3 25ug/mL durante 24 horas. **B** Densitometría para ABCA1. **C** Densitometría para ApoE. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=2 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student*; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Las diferencias observadas entre el cultivo de neuronas y el de astrocitos puede deberse a la susceptibilidad de cada tipo celular al extracto a causa de una diferencia en la isoforma de LXR que presente en cada grupo celular. Whitney y colaboradores mostraron que, si bien LXRb es la isoforma predominante tanto en neuronas como astrocitos, la isoforma LXRA se encuentra en una mayor concentración (un orden de magnitud) en astrocitos⁸¹.

Una vez observado que los extractos seleccionados (1, 3 y 10) generaban cambios en la expresión de ABCA1 y ApoE tanto en la línea celular (SHSY-5Y) como en los cultivos primarios, se procedió a profundizar su estudio. En esta tesis no continúo estudiando el extracto 3, puesto que no se tenían extractos adicionales (de la misma planta) ni fracciones disponibles.

4.5.2 Relación entre la concentración de extracto y la activación de LXRb.

En primer lugar, se procedió a estudiar si la activación observada era concentración-dependiente, para lo cual se probaron concentraciones de 250, 125 y 75 ug/mL, donde las dos últimas en el caso del extracto 1, no generan activación de LXRb (Figura 4-10A). En el caso del extracto 10, este muestra actividad a las tres dosis estudiadas, y aunque no hay una diferencia significativa entre ellas, si se observa una tendencia a disminuir la actividad conforme se reduce la concentración, tal como se muestra en la figura 4-10B.

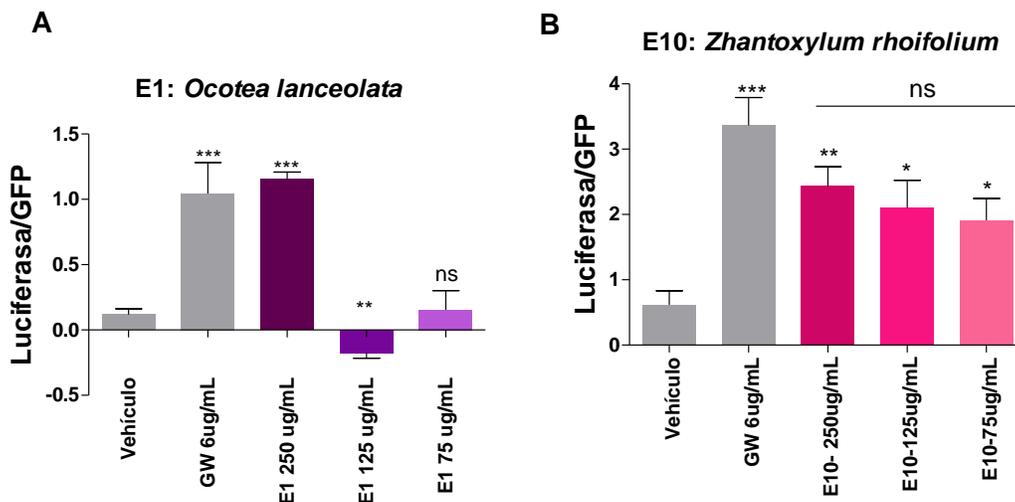


Figura 4-10: Evaluación de efecto dosis dependiente en actividad luciferasa de extractos 1 (*Ocotea lanceolata*) y 10 (*Zhantoxylum rhoifolium*).

A Efecto dosis dependiente del extracto 1. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student* ** p<0.01; *** p<0.001. **B** Efecto de la dosis dependiente del extracto 10. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student* * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. La comparación entre las 3 dosis se realizó con una ANOVA de una vía.

4.5.3 Activación de LXRb con fracciones del Extracto 1 (*Ocotea lanceolata*, Hojas)

Ahora bien, en el camino para encontrar cuál compuesto entre los presentes en el extracto 1 es el responsable de la actividad agonista y elucidar si existe algún componente en el extracto crudo que interfiera con la expresión de ApoE y ABCA1, se estudiaron fracciones del extracto en diferentes solventes. Para estos ensayos se empleó una concentración de 250ug/mL para cada fracción, conforme a los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y citotoxicidad(figura 4.2).

▪ Ensayo de Transactivación con fracciones en células HEK293

En primer lugar, se evaluó la actividad en fracciones de metanol, diclorometano y acetato de etilo para encontrar la molécula responsable de activar a LXRb. Se encontró que la fracción de acetato de etilo es la única que no tiene efecto agonista y por el contrario reduce la actividad “basal”, mientras que las demás fracciones presentan igual activación que el extracto crudo (figura 4-11).

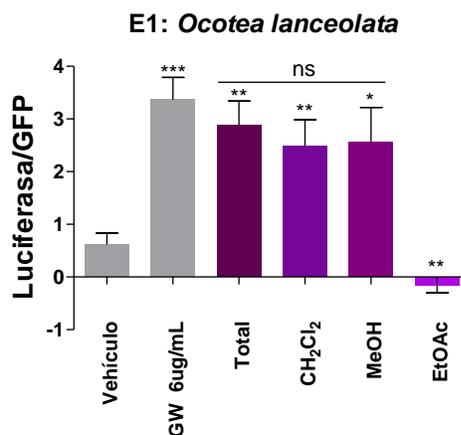


Figura 4-11: Activación de LXRb con fracciones obtenidas del extracto 1 en diferentes solventes.

Ensayo de Transactivación para estudiar activación de LXRb con diferentes fracciones del Extracto 1. Total se refiere al extracto etanólico, CH₂Cl₂ a la fracción en diclorometano, MeOH a la fracción en metanol y EtOAc a la fracción en acetato de etilo. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student* * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. La comparación entre las diferentes fracciones se realizó con una ANOVA de una vía

▪ **Efecto de las Fracciones sobre la expresión de ABCA1 y ApoE en células SHSY-5Y**

En segundo lugar, se realizó un Western Blot con proteína aislada de células SH-SY5Y tratadas con las fracciones del extracto 1 en pro de evaluar el efecto de las fracciones sobre la expresión de ABCA1 y ApoE. El experimento muestra que las fracciones en CH₂Cl₂ y MeOH aumentan la expresión de ApoE, siendo la primera quien produce un mayor incremento; mientras que la fracción en EtOAc tiende a reducir su expresión basal. Sin embargo, en el caso de ABCA1, únicamente la fracción en metanol aumenta ABCA1, aunque no al nivel que lo hace el GW3965 (figura 4-12). Lo anterior, permite intuir que el efecto producido sobre ApoE por la fracción en diclorometano es independiente de ABCA1, de forma similar a lo observado por Stukas *et al* y Huang *et al*.^{138,139}. Se infiere también, que los compuestos presentes en la fracción de acetato de etilo, afectan la expresión de ApoE y ABCA1, permitiendo explicar porque no se observan cambios al usar el extracto crudo. Adicionalmente la diferencia en los efectos producidos por las fracciones en metanol y diclorometano, pueden deberse a que cada una contiene un agonista distinto y que, por lo tanto, los mecanismos en cada caso varíen.

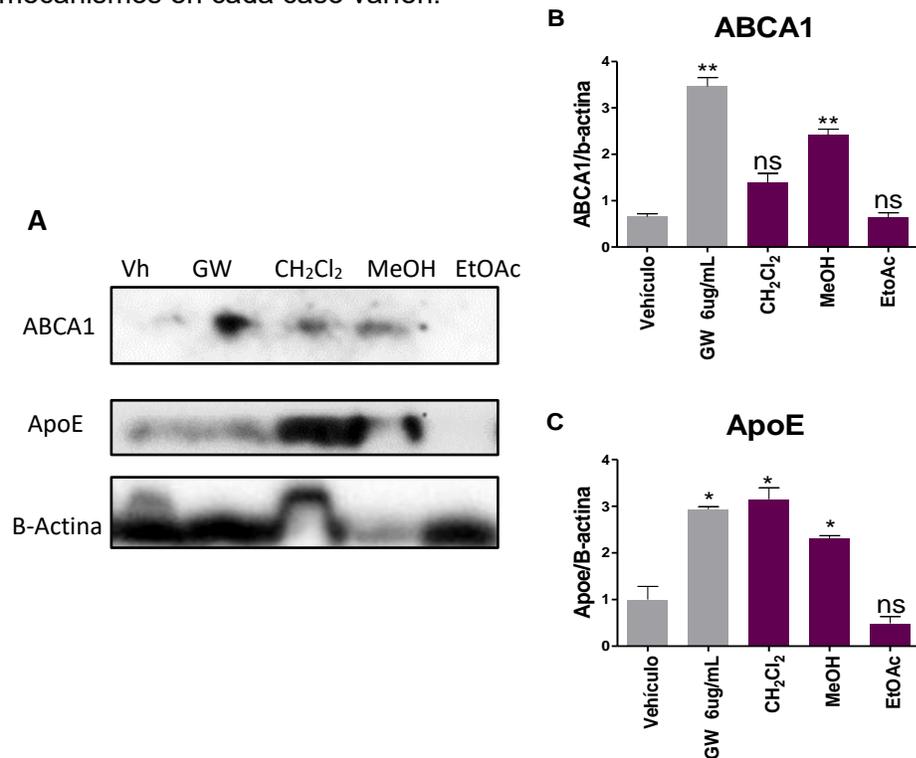


Figura 4-12: Cambios en la expresión de ABCA1 y ApoE generados por las fracciones del extracto 1
A WesternBlot de ABCA1 y ApoE luego de tratar las células con 250ug/mL de las fracciones de Diclorometano (CH₂Cl₂), Metanol (MeOH) y Acetato de etilo (EtOAc). **B** Densitometría de ABCA1. **C** Densitometría de ApoE. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=2 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student* * p<0.05.

4.5.4 Activación de LXRb con extractos totales de frutos madera y hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* (Extracto 10)

▪ Ensayo de Transactivación con nuevos extractos en células HEK293

Debido a que la expresión génica es diferente en cada parte de la planta, la concentración y disponibilidad de los metabolitos secundarios también cambiará. Por esta razón, también se estudiaron extractos de diferentes órganos (frutos, madera y hojas) de *Zanthoxylum rhoifolium*. En este ensayo se encontró que en el extracto de corteza (extracto10) es donde más actividad se presenta. Sin embargo, los extractos de frutos, madera y hojas también generan activación de LXRb, pero con menor intensidad, indicando que el metabolito(s) responsable(s) de la actividad predomina(n) en la corteza de la planta. (ver figura 4-13)

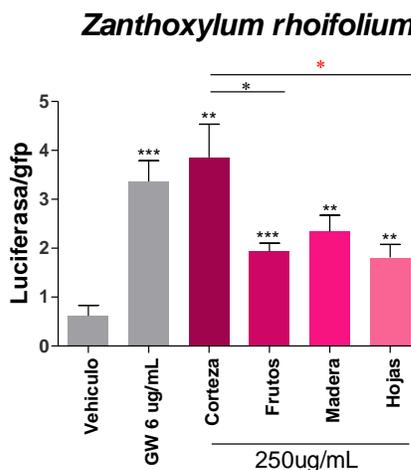


Figura 4-13: Actividad Luciferasa en distintos órganos de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Evaluación de la actividad luciferasa por activación de LXRb con extractos de distintos órganos de la planta *Zanthoxylum rhoifolium*. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=3 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una *t de student* * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. La comparación entre los extractos de cada órgano se realizó con una ANOVA de una vía * p<0.05.

▪ Efecto de los nuevos extractos sobre la expresión de ABCA1 y ApoE en células SHSY-5Y

Al comparar el efecto de los extractos de hojas, madera y frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*, con el extracto de corteza, de la misma planta, se encontró que el extracto de hojas no

genera cambios respecto al control en el caso de ApoE, mientras que los otros dos extractos tienen actividad similar a la presentada por el extracto de corteza y el GW3965, tal como muestra la figura 4-14B. En cuanto a ABCA1, solo el extracto de frutos produce un incremento en la cantidad de proteína (figura 4-14A). Estos resultados junto con los presentados en la figura 4-13 muestran que la corteza es el mejor candidato para encontrar un agonista de LXRB, puesto que presenta la mejor actividad luciferasa y logra incrementar la expresión de ApoE y ABCA1 con igual o mayor intensidad al GW3965. Sin embargo, también sería interesante continuar estudiando el extracto de frutos e investigar el mecanismo por el cual el extracto de madera incrementa ApoE y no ABCA1.

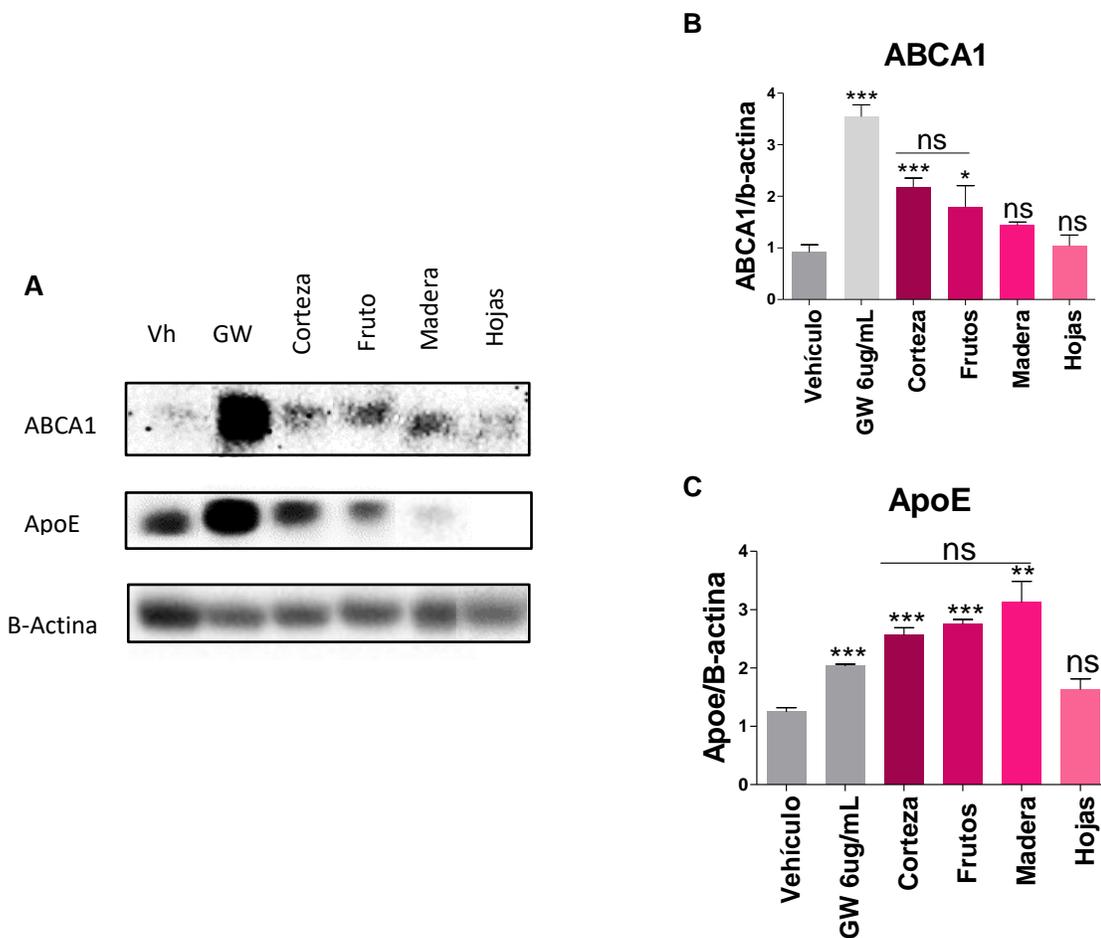


Figura 4-14: Los extractos de *Zanthoxylum rhoifolium* cambian expresión de ABCA1 y ApoE.

A WesternBlot de ABCA1 y ApoE luego de tratar las células con 250ug/mL los extractos de corteza, frutos, madera y hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* llyya . **B** Densitometría de ABCA1. **C** Densitometría de ApoE. Los datos representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes (n=2 por cada experimento). Las comparaciones contra el vehículo se realizaron empleando una ANOVA de una vía.

5. Discusión

La gran variedad de factores que rodean a la EA hace que encontrar tratamientos efectivos sea un proceso complejo. Un blanco terapéutico reciente son los receptores nucleares, los cuales permiten regular diferentes procesos celulares, muchos son importantes en la etiología de la enfermedad, por ejemplo la alteración en los niveles de colesterol¹⁶.

Es así como, los niveles alterados de colesterol se han relacionado con la EA, inicialmente por observaciones en pacientes y posteriormente con evidencia experimental¹⁴⁰, la cual ha demostrado que la producción de péptido amiloide y sus oligómeros está ligado a la concentración de colesterol, ya que tanto la disposición como la actividad, de las proteasas encargadas del clivaje amiloidogénico de APP, se favorece significativamente en dominios de la membrana ricos en colesterol como las balsas lipídicas. En este sentido, la activación del receptor nuclear LXR al ser el regulador maestro del metabolismo de colesterol se ha relacionado con el aceleramiento del procesamiento proteolítico y la posterior reducción de la carga amiloide en modelos *in vitro*^{141,142}, y la mejoría de síntomas en modelos murinos^{103,143} de la EA. Sin embargo, nuestro grupo de investigación, ha mostrado que puede haber mejoría, en los animales transgénicos de EA, sin la reducción de la carga amiloide^{103,105}. A pesar de estos resultados promisorios, los agonistas de RN disponibles actualmente, generan efectos no deseados y pertenecen a grandes farmacéuticas que

limitan su disponibilidad. En consecuencia, junto con el grupo de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia, se propuso buscar nuevos ligandos de RN derivados de la flora colombiana, con potencial para el tratamiento de la EA y como herramientas biotecnológicas.

5.1 Efectos sobre viabilidad y toxicidad celular

En primer lugar, los ensayos de MTT y LDH, mostraron en forma general, que los extractos de *Lauraceae* estudiados, son los que más afectan la viabilidad celular, (Figura 4-1 y ANEXO A), y permiten trabajar con concentraciones entre 25 y 75ug/mL a excepción del extracto 1. Por su parte, los extractos de *Rutaceae* y *Miristicaceae* disminuyeron la supervivencia celular en un 30% en promedio a todas las dosis estudiadas. Adicionalmente se observó que las células HEK293 son más susceptibles frente a los tratamientos, y que con algunos extractos se observaban caídas o incrementos en la viabilidad celular en concentraciones intermedias, alterando la tendencia general como se observa en la figura 4-1 para el extracto 10 en células SH-SY5Y.

De otra parte, los extractos 1 y 16 (*Lauraceae* y *Myristicaceae*), mostraron un aumento en la viabilidad celular por encima del control (100%), lo que podría significar un incremento en la proliferación celular o la biogénesis mitocondrial. En el caso del extracto 1, esto podría explicarse a activación que el extracto genera de LXR, la cual promueve proliferación celular, como se ha observado en células hepáticas¹⁴¹ y células madre neuronales^{102,142}. Ahora bien, es necesario evaluar marcadores como Histona2 para confirmar que las células efectivamente están aumentando su cantidad a causa del tratamiento; y del mismo modo, repetir los ensayos en células que estén fuera del ciclo celular. Por su parte en cuanto al extracto 16 además de evaluar marcadores de proliferación también será necesario estudiar el proceso de biogénesis mitocondrial.

La variedad de comportamientos que mostraron los extractos, era un hecho de esperarse puesto que, se ha observado que extractos y compuestos aislados de plantas de las familias *Lauraceae*, *Myristicaceae* y *Rutaceae* tienen comportamientos diferentes frente a la viabilidad celular. Algunos efectos son muy negativos como los reportados por Pacifico

y Chen, donde los extractos de hojas de *Laurus nobilis* (de la familia de las Lauráceas), presentan efectos citotóxicos frente a células SHSY-5Y y microglía en concentraciones superiores a los 50 ug/mL y 30ug/mL respectivamente^{143,144}. Paralelamente, otros estudios muestran efectos benéficos, por ejemplo, los sesquiterpenos encontrados por Ma en un extracto vegetal de *Murraya koenigii* (de la familia de las Rutáceas), muestra un carácter protector en células hepáticas frente a procesos de muerte celular¹⁴⁵. Por otra parte los picos observados en las gráficas de la figura 4-1 y ANEXO A, podrían deberse a que los extractos están compuestos de una gran cantidad de moléculas, las cuales dependiendo de la concentración pueden generar diferentes fenómenos en las células.

Asimismo, al estudiar las fracciones del extracto 1, es curioso observar que la fracción en diclorometano reduce significativamente la viabilidad celular a una concentración baja (25 ug/mL), mientras que las fracciones en metanol y acetato de etilo no presentan este comportamiento. Al comparar con la gráfica del extracto 1 (figura 4-2) está también tiene una menor viabilidad celular a 25ug/mL respecto a las dosis más altas. Este hecho indica que los compuestos disueltos en diclorometano son los responsables de afectar la actividad mitocondrial a esta concentración.

De otra parte, el comportamiento del aceite (compuestos volátiles) fue bastante toxico, pues la viabilidad celular se redujo por debajo del 10% y la muerte celular se incrementó hasta el 80% con dosis superiores a 12 ug/mL (figura 4-2). De forma similar otros autores han mostrado que los aceites esenciales tienden a ser tóxicos en dosis superiores a los 15ug/mL en diferentes líneas celulares, debido a que la concentración de sus componentes es mucho mayor comparada con la de otros tipos de extractos^{146,147}.

Finalmente al comparar los ensayos de viabilidad celular de las diferentes órganos de *Zanthoxylum rhoifolium*, se observa que el extracto de corteza es el único que mantiene la viabilidad celular alrededor del 100%, mientras los otros extractos tienden a aumentarla con forme se incrementa la concentración (Figuras 4-1 y 4-3). En el caso del extracto de hojas se puede descartar un efecto sobre la proliferación celular ya que en los ensayos de Western Blot no se observaron incrementos en las proteínas estudiadas, lo cual sería de esperar si aumenta la población celular. Sin embargo, en el caso de frutos valdría la pena evaluar marcadores de proliferación ya que hay activación de LXRb y aumento de ABCA1

y ApoE.

Para nosotros estos resultados son de gran importancia, puesto que nos permite identificar el rango adecuado de trabajo para extracto. Así en proyectos posteriores, tenemos un punto de referencia claro; bien sea para determinar dosis óptimas de activación o por el contrario calcular dosis letales del 50% (LD50).

5.2 Sistema para evaluar la activación de LXRb

Como vimos en las figuras 4-4 y 4-5 se generó y estandarizó un sistema propio que permite evaluar la activación de LXRb, basado en modelos previamente reportados¹²⁸⁻¹³⁰, donde la principal variación es el gen reportero independiente. En nuestro caso empleamos GFP al igual que XXXXX¹³³, mientras que la mayoría de investigadores utilizan una luciferasa distinta¹³¹, o betagalactosidasa^{130,132}. Este segundo gen reportero permite normalizar el proceso de transfección. Se puede usar en el mismo plásmido que contiene el gen reportero regulado por el factor de transcripción a estudiar o en un plásmido independiente como se realizó en esta tesis.

Nuestro modelo muestra que la actividad luciferasa observada se debe únicamente a la activación del receptor. Vimos en la figura 4-5 la actividad luciferasa es significativa únicamente en las células que contenían los tres plásmidos, y a su vez se trataron con el agonista GW3965; mientras que aquellas células que se transfectaron con un plásmido trucado (que no expresa luciferasa en ningún caso) no mostraron actividad diferente a las células sin transfectar. Esto nos indica que el sistema solo generará resultados positivos cuando LXRb interactue con un ligando adecuado que promueva su activación.

5.3 Activación de LXRb con extracto

Los terpenos y sesquiterpenos, son el tipo de compuesto más promisorio como agonistas de LXR teniendo en cuenta los agonistas previamente identificados dentro de metabolitos secundarios de las plantas¹⁰⁶. Se sabe que las hojas, la corteza y los aceites esenciales son las partes de la planta donde estos metabolitos tienden a acumularse (generalmente) y por ende se encuentran en mayor concentración¹⁴⁸. Esta información soporta el hecho que los extractos 1 (*Ocotea lanceolata*, hojas), 3 (*Nectandra reticulata*, hojas) y 10 (*Zanthoxylum rhoifolium*, corteza) fueron los que presentaron mayor actividad luciferasa en el ensayo de transactivación, además de alterar la expresión de proteínas diana, indicando una actividad agonista frente a LXRb. No obstante cabe resaltar que el extracto 3 logró la activación del receptor a una concentración diez veces menor que los extractos 1 y 10 (figura 4-6).

En los diferentes estudios de bioprospección, los investigadores alrededor del mundo han mostrado una amplia variedad de compuestos con alguna actividad biológica puntual, dentro de las que se encuentran nuevos agonistas de LXR¹⁰⁷. Sin embargo, son pocos los estudios que muestran el comportamiento de extractos crudos y fracciones sobre los tipos celulares y fenómenos estudiados, descartando los posibles efectos sinérgicos presentes en estas mezclas. Esto puede deberse a la facilidad que conlleva emplear compuestos puros en los ensayos, pues es más sencillo estudiar el efecto de un solo agente externo sobre los sistemas, además de permitir un control certero de la estabilidad de la molécula en las diferentes condiciones de trabajo.

Con el modelo se evaluaron los diferentes extractos seleccionados y se encontró que los extractos con mayor actividad pertenecen a los géneros *Ocotea* y *Nectandra* de la familia *Lauraceae* y *Zanthoxylum* de la familia de *Rutaceae*, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el territorio colombiano; sin embargo, los principales estudios de bioprospección realizados a su alrededor se enfocan en tratamientos para enfermedades tropicales, antibióticos y como pesticidas¹⁴⁹ por lo cual es difícil tener un punto de referencia al presente estudio. Adicionalmente los investigadores alrededor del mundo, con investigaciones similares al presentado en este trabajo, suelen enfocarse en

un compuesto puntual, sin mostrar el camino que los llevo a elegirlo como candidato. No obstante, autores como Wu sí muestran los efectos de extractos sobre modelos celulares. En este caso se emplea un extracto de *Zanthoxylum bungeanum* (de la familia de las Rutáceas), para evaluar su papel en el metabolismo de lípidos. Wu encuentra que efectivamente el extracto es capaz de aumentar la expresión de proteínas involucradas en el transporte de lípidos¹⁵⁰ y de esta manera evitar la acumulación indeseada de colesterol intracelular¹⁵⁰.

Es sabido que los metabolitos secundarios tienden a ser característicos de plantas pertenecientes a una misma especie y/o a especies relacionadas¹⁴⁸. Con esto en mente y teniendo en cuenta que el extracto 10 pertenece al mismo género del extracto estudiado por Wu, se puede pensar que ambas plantas comparten metabolitos secundarios y por ende el efecto agonista del extracto 10 estará acompañado de cambios sobre el transporte de lípidos. De la misma manera se esperaría que los efectos observados por Wu se puedan deber a una activación de LXR (regulador del metabolismo de lípidos).

5.4 Efecto sobre la Expresión de ABCA1 y ApoE en la línea células SH-SY5Y

Posteriormente al ensayo de transactivación, se evalúa la expresión de ABCA1 y ApoE. En la figura 4-7 se observa un efecto sobre el nivel de expresión de ABCA1 con el extracto 10 (*Zanthoxylum rhoifolium*) de forma menor al generado por el agonista sintético GW3965; mientras que para el caso de ApoE el extracto 10 (*Zanthoxylum rhoifolium*) produce un aumento de la proteína igual al del de GW3965. Por su parte el extracto 1 (*Ocotea lanceolata*) no tiene efecto sobre ABCA1 ni ApoE. De forma interesante el extracto 3 (*Nectandra reticulata*) genera incrementos en ambas proteínas superiores al ocasionado por el agonista sintético GW3965.

Las observaciones sobre los extractos 1 (*Ocotea lanceolata*) y 10 (*Zanthoxylum rhoifolium*) son sorprendidas teniendo en cuenta que ambos extractos producen una activación del receptor en igual intensidad al agonista sintético, el cual sí genera cambios drásticos en la

expresión de ambas proteínas, y en otros estudios se ha observado que tratamientos a partir de productos vegetales logran incrementos en la expresión de ApoE y ABCA1 de al menos el 50% del generado por agonistas sintéticos o endógenos^{21,151,152}. Lo anterior, lleva a pensar que otros compuestos en dichos extractos están regulando la expresión, posiblemente a niveles postrascriptoriales, o que se encuentran acelerando su tasa de degradación en el caso del extracto 1 (*Ocotea lanceolata*), o en el caso del extracto 10 (*Zanthoxylum rhoifolium*) que el posible agonista se encuentra en una muy baja concentración.

Para confirmar la hipótesis sobre el extracto 1 (*Ocotea lanceolata*), se procedió a estudiar el comportamiento de fracciones frente a la activación de LXRb (ensayo de luciferasa) como su efecto en la expresión de las proteínas blanco. Las figuras 4-9 y 4-11 muestran que la fracción de acetato de etilo reduce la actividad luciferasa basal del sistema y no genera cambios en la expresión de las proteínas indicando la posible presencia de un antagonista. En cuanto a la fracción en diclorometano, esta aumenta el nivel de expresión de ApoE independiente de ABCA1, de igual forma que ocurre con el extracto de la madera de *Zanthoxylum rhoifolium* (Figura 4-12). Estos comportamientos son similares a lo observado por *Fan* en sus ensayos con progesterona en sistema nervioso central y *Duan* en macrófagos, en los cuales la progesterona interactúa con el dominio C-terminal de ApoE y bloquea su degradación, lo que sugiere que el aumento ocurre postraduccionalmente^{155,156}. Lo anterior permite proponer que la fracción en diclorometano así como el extracto de madera, activan a LXR en las células SH-SY5Y en una baja proporción, pero sus componentes interactúan con ApoE aumentando su vida media y por ende su concentración. Esto explica que el incremento en ABCA1 es mucho menor o no ocurre.

Por su parte, la fracción en metanol aumenta tanto la expresión de ABCA1 como de ApoE en igual proporción al GW3965. Este hecho convierte la fracción en metanol en la más interesante para identificar un ligando de LXRb. No obstante, para tener total certeza sobre esta hipótesis es necesario cuantificar el mRNA de las proteínas correspondientes para verificar si el proceso de transcripción se lleva a cabo con las otras fracciones. Es curioso que sea esta fracción la más atractiva ya que es la que contiene los compuestos más polares, y los terpenos previamente identificados por otros investigadores, son de carácter

apolar por lo que se esperaba encontrarlo en la fracción de acetato de etilo. Esto puede indicar que los terpenos presentes pueden estar glicosilados.

En cuanto al hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* se puede decir que aunque en el modelo de células HEK293 es capaz de activar a LXRb, en las células SH-SY5Y su activación es reducida o algún(os) de su(s) componente(s) está interfiriendo en procesos postrascriptoriales, puesto que no se logra aumentar la expresión de ApoE y ABCA1. Para comprobar este hecho es necesario cuantificar el mRNA y así verificar si el proceso de transcripción se lleva a cabo.

5.5 Efecto sobre la Expresión de ABCA1 y ApoE en cultivos primarios de neuronas y astrocitos

Los ensayos con neuronas hipocampales y astrocitos corticales, mostraron que los extractos 10 (Rutácea, corteza) y 3 (Laurácea, Hojas) , al igual que el fármaco GW3965, incrementan la cantidad de ApoE y ABCA1. Lo anterior es un hecho importante en la búsqueda de terapias contra la EA, ya que estas proteínas han mostrado diferentes efectos positivos sobre las neuronas, como el incremento de neuritas^{157,158}, protección frente a procesos de muerte celular^{159,160}, el aumento en el eflujo de colesterol y lipidos^{81,161,162}, entre otras. Igualmente aumentar ABCA1 y ApoE en astrocitos ha evidenciado la reducción de procesos inflamatorios asociados a la eliminación de amiloide.

En el cerebro, ApoE es sintetizado principalmente por células gliales, aunque varios autores ya han mostrado que ApoE también se expresa en neuronas en una proporción mucho menor como respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y patológicas^{81,163} . En este sentido varios investigadores han buscado los roles que ApoE juega en las neuronas y como éstos se relacionan con la EA. Por ejemplo, Nathan y colaboradores, muestran el efecto que tiene ApoE sobre el crecimiento de neuritas en un modelo de neuronas corticales primarias. En tal estudio se compara la longitud y ramificación de las mismas en células provenientes de ratones silvestres contra ratones *Knockout* (K.O) para ApoE,

observando que las células sin ApoE presentan menos neuritas y de menor tamaño¹⁵⁷. Por su parte, *Minagawa* y *Michikawa*, evidencian la relación del eflujo de lípidos con las isoformas de ApoE presentes en el medio. En este caso se muestra que tanto las células sin exposición a ApoE como aquellas en presencia de ApoE4, presentan menor eflujo de lípidos, lo cual altera la homeostasis de colesterol y promueve, entre otros fenómenos, la acumulación de amiloide^{161,162,164}.

Como se mencionó anteriormente los astrocitos son el grupo celular que produce ApoE en mayor cantidad en el cerebro¹⁶⁵, adicionalmente, se ha observado que incrementar la cantidad de ApoE tanto en cultivos de astrocitos como en cerebro completo generan mayor eflujo de colesterol⁸¹ y mayor eliminación de AB^{162,166}. Autores como Chen han mostrado que al activar el heterodímero LXR/RXR en astrocitos, se incrementa la expresión de ABCA1, y a su vez la excreción de colesterol a través de partículas de alta densidad (HDL)¹⁶⁷.

En el caso de ABCA1, su papel en células del sistema nervioso central, no se ha comprendido por completo. Se sabe que juega un rol en la homeostasis de colesterol, favoreciendo su transporte a través de lipoproteínas. Autores como Lefterov y Hirsch-Reinshagen describen una relación entre la expresión de ABCA1 y ApoE ligada al eflujo de colesterol en neuronas, donde los modelos KO de ABCA1 tienden a acumular lípidos además de alterar la distribución y cantidad de ApoE^{168,169}. Asimismo, Karasinka ha mostrado un incremento en la susceptibilidad a inflamación y muerte celular en neuronas y astrocitos silenciados para ABCA1¹⁶⁰; mientras Koldamova demuestra que la ausencia de ABCA1, en ratones, reduce la cantidad de ApoE en cerebro, al igual que el eflujo de colesterol mientras que se favorece la acumulación de péptidos amiloides de 1-40 y 1-42¹³. Sin embargo, se ha demostrado que cuando hay activación de LXR, aumenta la cantidad de ABCA1 provocando un mayor eflujo de colesterol que se asocia a la reducción de la carga amiloide⁸¹.

Estos hechos llevan a pensar que el incremento de ApoE y ABCA1 generado por los extractos analizados en el presente modelo podrían tener efectos similares al trasladarlo a un modelo animal con una mejoría en la sintomatología. Lo anterior se ajustaría a

resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación, donde se muestra que el tratamiento con GW3965 en neuronas hipocampales, promueve el aumento dendritas, espinas y contactos sinápticos¹⁷⁰, además de evidenciar mejoría en los síntomas, asociado a incrementos de ApoE y ABCA1, en un modelo murino de la EA¹⁰². Por esta razón los extractos 1 (*Ocotea lanceolata*), 3 (*Nectandra reticulata*) y 10 (*Zanthoxylum rhoifolium*), se vuelven candidatos promisorios para desarrollar un nuevo tratamiento de la enfermedad. En consecuencia, se requiere continuar con ensayos bioguiados para determinar los compuestos puntuales que presentan actividad y paralelamente, llevar a cabo estudios *in-vitro* en neuronas para determinar el efecto de los extractos en la dinámica de las espinas dendríticas y posteriormente en un modelo animal de la EA, evaluar la especificidad sobre tejidos y los efectos secundarios que puedan generar.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Los extractos 1 (*Lauraceae*, Hojas), 10 (*Rutaceae*, Corteza) y 16 (*Lauraceae*, Hojas) son los que permiten emplear la concentración máxima estipulada (250ug/mL) sin reducir la viabilidad celular en más de un 20%. Los demás extractos se trabajaron a concentraciones de 75 y 25 ug/mL según cada caso.

El modelo generado en células HEK293 permite evaluar la activación de LXRb a través de la cuantificación de actividad luciferasa.

Los extractos 1 (*Lauraceae*, Hojas), 10 (*Rutaceae*, Corteza) y 3 (*Lauraceae*, Hojas) presentaron actividad agonista frente a LXRb en el modelo generado en células HEK, en proporción similar a la observada con el agonista sintético GW3965; al igual que las fracciones en metanol y diclorometano obtenidas del extracto 1.

Los extractos 3 (*Lauraceae*, Hojas), 10 (*Rutaceae*, Corteza) logran incrementar la expresión de ABCA1 y ApoE en células de neuroblastoma (SH-SY5Y), neuronas hipocámpales y astrocitos.

La fracción en metanol del extracto 1 aumenta la expresión de ABCA1 y ApoE en células de neuroblastoma (SH-SY5Y).

6.2 Recomendaciones

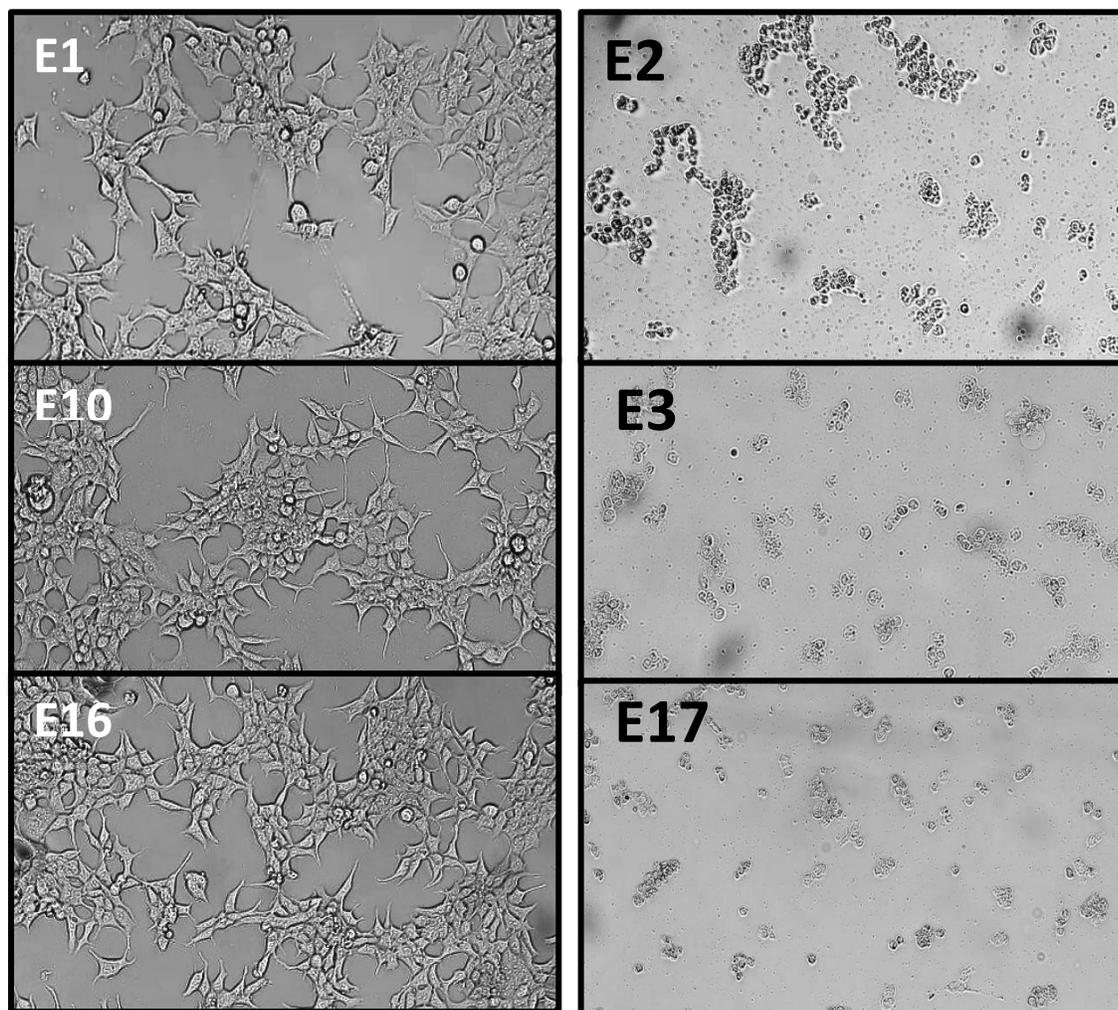
1. Evaluar mediante RT-PCR o qPCR los cambios en el mRNA de ABCA1 y ApoE, para corroborar los cambios observados por Western Blot, así como evaluar los cambios de ApoE en el medio extracelular con cada uno de los tratamientos.
2. Repetir los ensayos de transactivación en un modelo para LXRA para estudiar si la activación depende de la isoforma.
3. Continuar con los ensayos bioguiados para obtener una lista de los posibles ligandos, que posteriormente se pueda emplear en análisis computacionales como el *docking* molecular, que permitan identificar un nuevo ligando.

...Todo final significa el comienzo de una nueva aventura.....

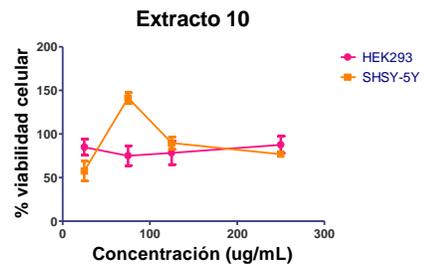
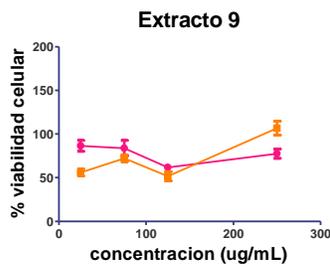
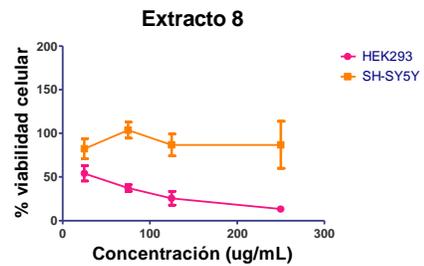
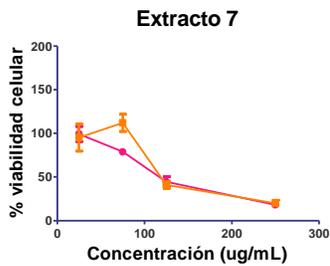
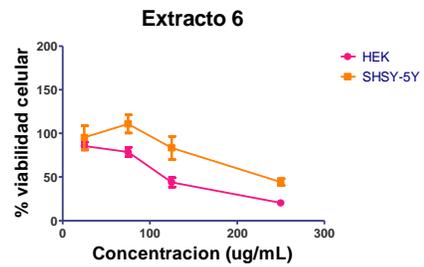
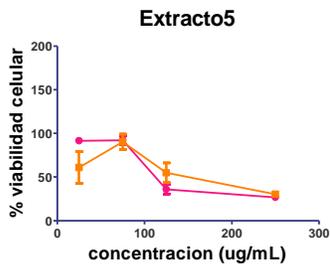
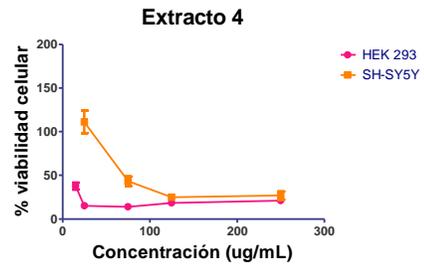
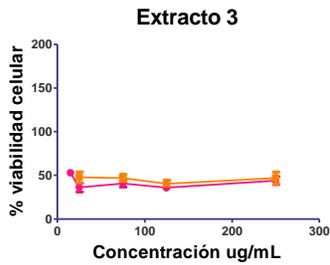
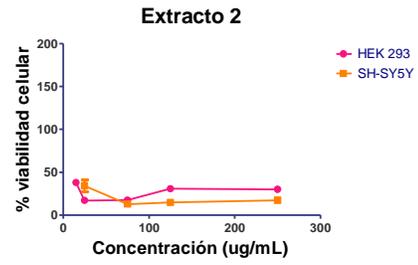
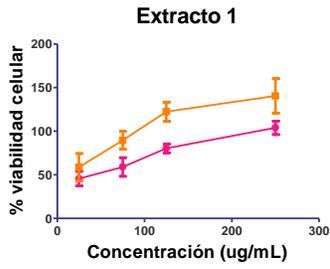
Anexo A: Graficas del efecto de los extractos estudiados sobre la viabilidad celular (MTT y LDH)

”

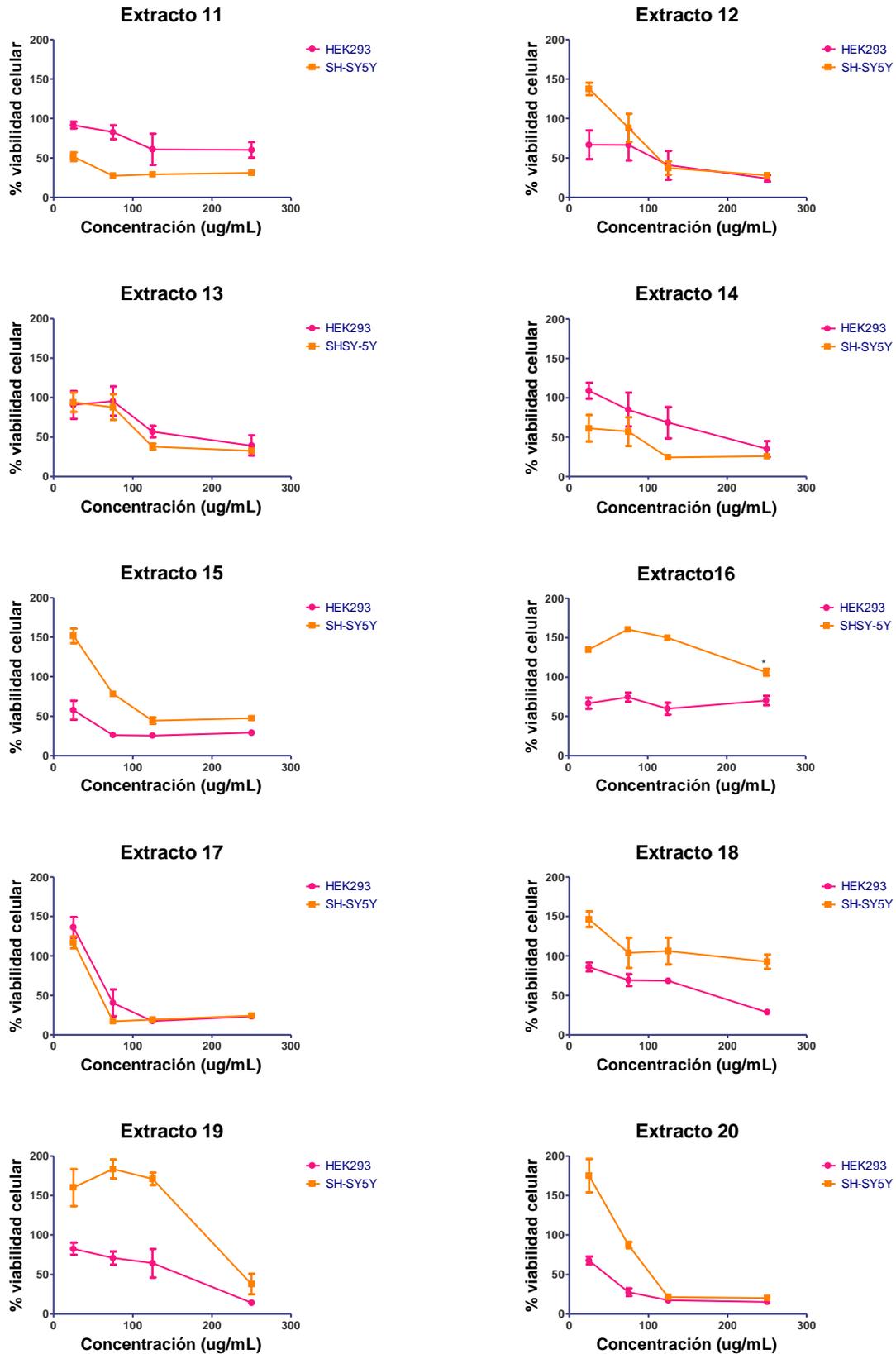
Microfotografías de las células HEK293 24h después de tratamiento con los extracto 1, 2, 3, 10, 16 y 17 a 250ug/mL



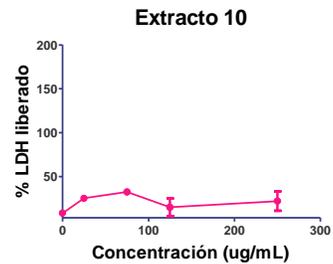
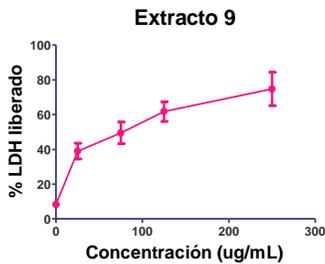
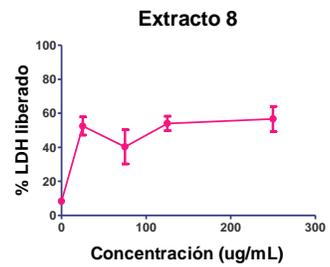
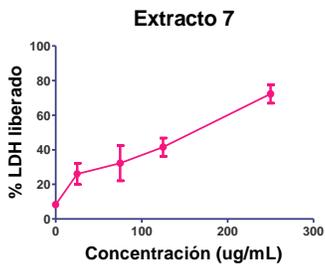
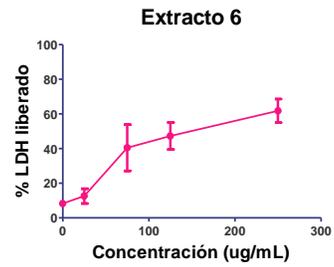
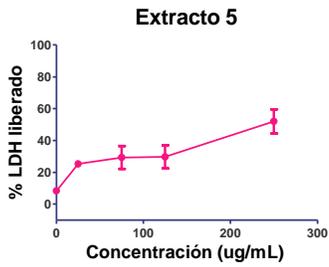
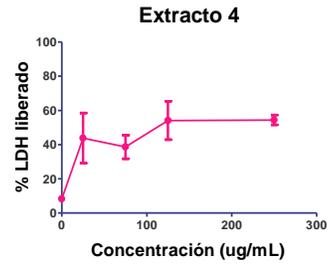
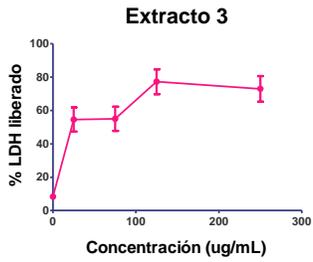
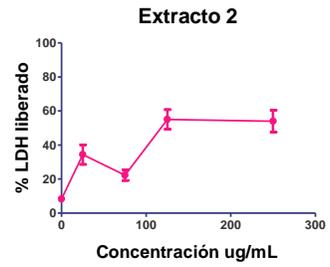
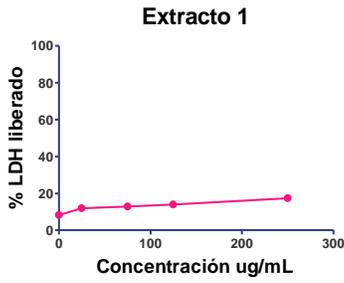
Graficas ensayos de viabilidad (MTT) para todos los extractos



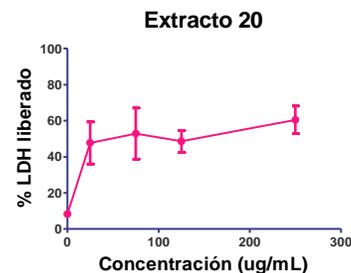
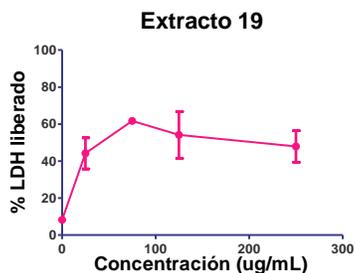
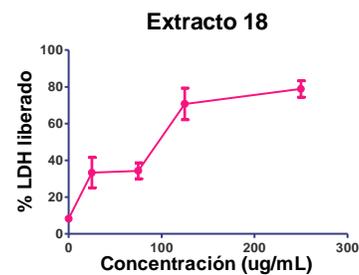
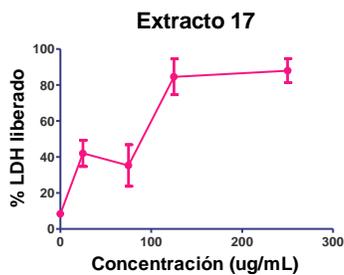
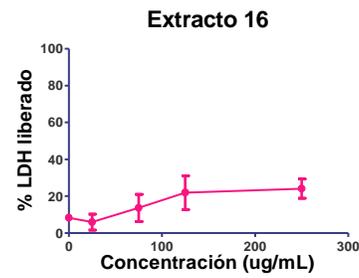
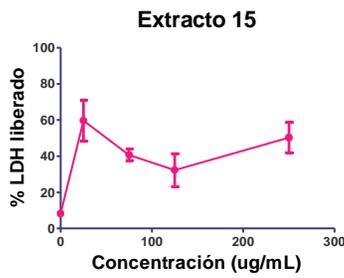
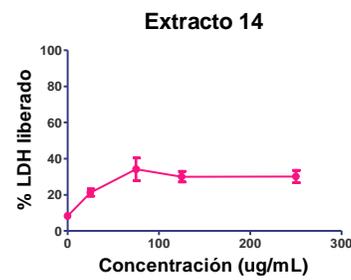
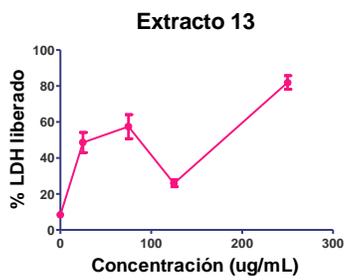
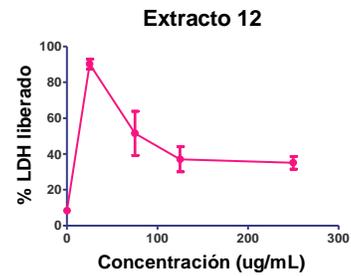
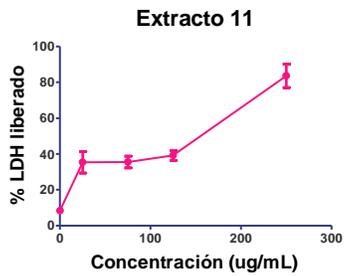
Continuación Graficas ensayos de viabilidad (MTT) para todos los extractos



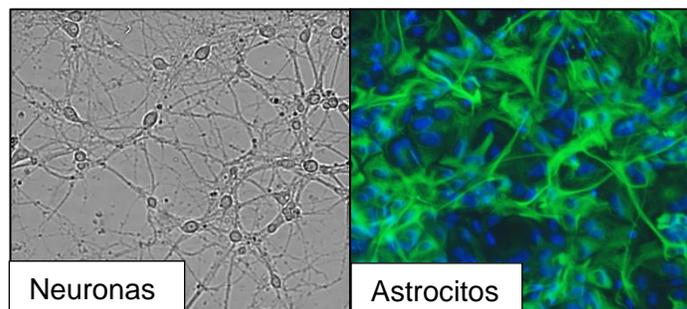
Graficas de ensayos de citotoxicidad (LDH) para todos los extractos estudiados



Continuación Graficas de ensayos de citotoxicidad (LDH) para todos los extractos estudiados



Anexo B: Fotografías de los cultivos primarios empleados y protocolo inmunofluorescencia



Protocolo inmunofluorescencia

Inicialmente, las células sembradas en vidrios pre-tratados con poli-L Lisina se les retira el medio, a continuación se lavan con PBS 1X y se fijan durante 10 minutos con solución de paraformaldehído al 4%. Una vez fijadas, se realizan 3 lavados con PBS 1X y 3 lavados con TTBS 1X de 2 minutos cada uno. Posteriormente se permeabilizan las células con una solución de Triton X100 al 0,25% en TTBS. Ahora se realizan tres lavados de 5 minutos con TTBS y se coloca el buffer de Bloqueo (0,5% SFB y 0,1% BSA en TTBS) durante 30 minutos. Culminado el bloqueo se procedió a incubar con solución de anticuerpo primario durante 36 horas a 4°C con agitación leve. Luego de este tiempo se realizan 5 lavados con buffer de bloqueo cada uno de 5 minutos, para después incubar por dos horas a temperatura ambiente el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario se retira y se realizan 5 lavados de 5 minutos cada uno con buffer de bloqueo. Finalmente los vidrios se colocan en un portaobjetos con medio de montaje (glicerol 70% y Hoechst 1:1000) y se sellan con esmalte transparente. Las láminas se almacenan a 4°C hasta la toma de fotografías.

Anexo C: Información Adicional de los Extractos estudiados.

Código	Extracto	Procedencia	N° COL	Rendimiento (%)
1	<i>Ocotea lanceolata</i>	Leticia (Amazonas)	544554	18,1
2	<i>Cinamomun triplinerve</i>	Nocaima (Cundinamarca.)	547370	18,7
3	<i>Nectandra reticulata</i>	Granada (Cundinamarca.)	547368	ND
4	<i>Nectandra lineata</i>	Leticia (Amazonas)	563472	ND
5	<i>Persea perseifila</i>	Pto.Lopez (Meta)	563464	10,8
6	<i>Rhodostemonodaphne laxa</i>	Acacias (Meta)	563249	14,4
7	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Anapoima (Cundinamarca)	591158	ND
8	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Anapoima (Cundinamarca)	591158	ND
9	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Anapoima (Cundinamarca)	591158	ND
10	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	San Juan de rio seco (Cundinamarca)	587143	ND
11	<i>Viola carinata</i>	Granada (Meta)	563244	ND
12	<i>Viola carinata</i>	Granada (Meta)	563244	ND
13	<i>Viola sebifera</i>	Pto.Lopez (Meta)	563243	ND
14	<i>Viola sebifera</i>	Pto.Lopez (Meta)	563244	ND
15	<i>Viola sp</i>	Leticia (Amazonas)	nd	ND
16	<i>Viola sp</i>	Leticia (Amazonas)	nd	ND
17	<i>Nectandra sp</i>	Sta. Bárbara (Santander)	nd	pendiente
18	<i>Endichleria oreocola</i>	Sta. Bárbara (Santander)	544557	13,8
19	<i>Endichleria paniculata</i>	Sta. Bárbara (Santander)	563248	8,9
20	<i>Nectandra reticulata</i>	Pto.Lopez (Meta)	563470	9,4

Anexo D: Resumen de los Resultados Obtenidos con cada extracto.

Código	Extracto	en HEK y SHSY	en HEK	En SHSY		En Neuronas		En Astrocitos	
		Concentración de trabajo (ug/mL)	actividad luciferasa	cambio ABCA1	cambio APOE	cambio ABCA1	cambio APOE	cambio ABCA1	cambio APOE
1	<i>Ocotea lanceolata</i>	250	si	no	no	no	si	-	-
2	<i>Cinamomun triplinerve</i>	15	no	-	-	-	-	-	-
3	<i>Nectandra reticulata</i>	25	si	si	si	-	-	si	si
4	<i>Nectandra lineata</i>	25	no	-	-	-	-	-	-
5	<i>Persea perseifila</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
6	<i>Rhodostemonodaphne laxa</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
7	<i>Zanthoxylum sp</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
8	<i>Zanthoxylum sp</i>	25	no	-	-	-	-	-	-
9	<i>Zanthoxylum sp</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
10	<i>Zanthoxylum sp</i>	250	si	si	si	si	si	si	si
11	<i>Virola carinata</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
12	<i>Virola carinata</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
13	<i>Virola sebifera</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
14	<i>Virola sebifera</i>	75	si	-	-	-	-	-	-
15	<i>Virola sp</i>	25	si	-	-	-	-	-	-
16	<i>Virola sp</i>	250	no	-	-	-	-	-	-
17	<i>Nectandra sp</i>	25	si	-	-	-	-	-	-
18	<i>Endichleria oreocola</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
19	<i>Endichleria paniculata</i>	75	no	-	-	-	-	-	-
20	<i>Nectandra sp</i>	25	no	-	-	-	-	-	-

Bibliografia

1. Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K. & Bełtowski, J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postępy Hig. i Med. doświadczalnej* **61**, 736–59 (2007).
2. Kang, J. & Rivest, S. Lipid metabolism and neuroinflammation in alzheimer's disease: A role for liver X receptors. *Endocr. Rev.* **33**, 715–746 (2012).
3. Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J.-Å. & Steffensen, K. R. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 394–404 (2012).
4. Macchi, B., Marino-Merlo, F., Frezza, C., Cuzzocrea, S. & Mastino, A. Inflammation and programmed cell death in Alzheimer's disease: comparison of the central nervous system and peripheral blood. *Mol. Neurobiol.* **50**, 463–72 (2014).
5. Prince, M. *et al.* World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost And trends. 84 (2015).
6. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
7. Hampel, H. Current insights into the pathophysiology of Alzheimer's disease: selecting targets for early therapeutic intervention. *Int. Psychogeriatr.* **24 Suppl 1**, S10-7 (2012).
8. Sodhi, R. K. & Singh, N. Liver X receptors: Emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* **72**, 45–51 (2013).
9. Puglielli, L., Tanzi, R. E. & Kovacs, D. M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat. Neurosci.* **6**, 345–51 (2003).
10. Rodríguez, E. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphism modifies the Alzheimer's disease risk associated with APOE epsilon4 allele. *J. Neurol.* **253**, 181–5 (2006).
11. Rogava, E. *et al.* The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* **39**, 168–77 (2007).
12. Roses, A. D. *et al.* Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E-epsilon 4 and apolipoprotein E-epsilon 2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer's disease. *Arzneimittelforschung.* **45**, 413–7 (1995).
13. Pahnke, J., Langer, O. & Krohn, M. Alzheimer's and ABC transporters - new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol. Dis.* **72**, 54–60 (2014).
14. Koldamova, R., Staufenbiel, M. & Lefterov, I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain

- ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 43224–43235 (2005).
15. Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J.-Å. & Steffensen, K. R. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 394–404 (2012).
 16. Mandrekar-Colucci, S. & Landreth, G. E. Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 1085–97 (2011).
 17. Andersson, S., Gustafsson, N., Warner, M. & Gustafsson, J.-A. Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3857–62 (2005).
 18. Wang, L. *et al.* Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13878–83 (2002).
 19. Viennois, E. *et al.* Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 219–232 (2011).
 20. Nunomura, S. M. & Yoshida, M. Lignans and benzoic acid derivatives from pericarps of *Virola multinervia* (Myristicaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **30**, 985–987 (2002).
 21. Bernal, F. A. & Cuca Suárez, L. E. Chemical constituents from *Iryanthera ulei* Warb. *Biochem. Syst. Ecol.* **37**, 772–775 (2009).
 22. Takaku, S., Haber, W. a. & Setzer, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochem. Syst. Ecol.* **35**, 525–532 (2007).
 23. Huang, T. H. W. *et al.* A novel LXR-?? activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1298–1308 (2005).
 24. Jung, C.-G. *et al.* Honokiol increases ABCA1 expression level by activating retinoid X receptor beta. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1105–1111 (2010).
 25. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z Psychiatr. Psych. Med* **64**, 146–148 (1907).
 26. Alzheimer, A., Stelzma, R. A., Schnitzlein, H. N. & Murlagh, F. R. VIEWPOINT An English translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"; *Clin. Anat.* **8**, 429–43 (1995).
 27. Ballard, C. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet* **377**, 1019–1031 (2011).
 28. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509 (2007).
 29. Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M. & Karagiannidou, M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. 1–140 (2016).
 30. Bird, T. D. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet. Med.* **10**, 231–9 (2008).
 31. Deane, R. *et al.* apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Invest.* **118**, 4002–4013 (2008).
 32. LaDu, M. J. *et al.* Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* **269**, 23403–6 (1994).
 33. Mohandas, E., Rajmohan, V. & Raghunath, B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J. Psychiatry* **51**, 55–61 (2009).
 34. Wahrle, S. E. *et al.* Deletion of *Abca1* increases A β deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 43236–43242 (2005).
 35. Cárdenas-Aguayo, M. C., Silva-Lucero, M. C. & García, U. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. *Neurochemistry* 1–26 (2014). doi:10.5772/57074
 36. Klein, W. L. Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem. Int.* **41**, 345–52 (2002).
 37. Jellinger, K. A. Challenges in neuronal apoptosis. *Curr. Alzheimer Res.* **3**, 377–91 (2006).
 38. Pearson, H. & Peers, C. Physiological roles for amyloid β peptides. *J. Physiol.* **575**, 5–10 (2006).

39. Gouras, G. K. *et al.* Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* **156**, 15–20 (2000).
40. Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C. & Pearson, H. A. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J. Neurosci.* **23**, 5531–5 (2003).
41. Bu, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 333–344 (2009).
42. Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K. & Hyman, B. T. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* **11**, 575–80 (1993).
43. Curtiss, L. K. & Boisvert, W. A. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 243–51 (2000).
44. Rensen, P. C. *et al.* Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 8564–71 (2000).
45. Gong, J.-S. *et al.* Apolipoprotein E (ApoE) Isoform-dependent Lipid Release from Astrocytes Prepared from Human ApoE3 and ApoE4 Knock-in Mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 29919–29926 (2002).
46. Harris, F. M. *et al.* Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells: Implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279**, 3862–3868 (2004).
47. Vance, J. E. & Hayashi, H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 806–818 (2010).
48. Mauch, D. H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354–7 (2001).
49. Mahley, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622–30 (1988).
50. Pitas, R. E., Ji, Z. S., Weisgraber, K. H. & Mahley, R. W. Role of apolipoprotein E in modulating neurite outgrowth: potential effect of intracellular apolipoprotein E. *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 257–62 (1998).
51. Hayashi, H., Campenot, R. B., Vance, D. E. & Vance, J. E. Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J. Biol. Chem.* **279**, 14009–15 (2004).
52. Strittmatter, W. J. *et al.* Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1977–81 (1993).
53. Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J. & Whitmer, R. A. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **28**, 75–80 (2009).
54. Wollmer, M. A. Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 762–773 (2010).
55. Gr??sger, S., Grimm, M. O. W., Frie??, P. & Hartmann, T. Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 966–974 (2010).
56. Turley, S. D., Burns, D. K. & Dietschy, J. M. Preferential utilization of newly synthesized cholesterol for brain growth in neonatal lambs. *Am. J. Physiol.* **274**, E1099-105 (1998).
57. Jurevics, H. & Morell, P. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J. Neurochem.* **64**, 895–901 (1995).
58. Dietschy, J. M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem.* **390**, 287–293 (2009).
59. Nieweg, K., Schaller, H. & Pfrieger, F. W. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J. Neurochem.* **109**, 125–34 (2009).
60. Dietschy, J. M. & Turley, S. D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* **45**, 1375–97 (2004).

61. Vaughan, A. M. & Oram, J. F. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* **47**, 2433–43 (2006).
62. Oram, J. F. & Heinecke, J. W. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* **85**, 1343–72 (2005).
63. Burke, K. T. *et al.* Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden Syrian hamster. *J. Lipid Res.* **50**, 1146–55 (2009).
64. Porter, F. D. & Herman, G. E. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J. Lipid Res.* **52**, 6–34 (2011).
65. Pfrieger, F. W. & Ungerer, N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* **50**, 357–71 (2011).
66. Wolozin, B. Cyp46 (24S-cholesterol hydroxylase): a genetic risk factor for Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **60**, 16–8 (2003).
67. Orth, M. & Bellosta, S. Cholesterol: Its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol* **2012**, (2012).
68. Zhao, C. & Dahlman-Wright, K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J. Endocrinol.* **204**, 233–240 (2010).
69. Theofilopoulos, S. & Arenas, E. Liver X receptors and cholesterol metabolism: role in ventral midbrain development and neurodegeneration. *F1000Prime Rep.* **7**, (2015).
70. Theofilopoulos, S. *et al.* Brain endogenous liver X receptor ligands selectively promote midbrain neurogenesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 126–133 (2012).
71. Fi??vet, C. & Staels, B. Liver X receptor modulators: Effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1316–1327 (2009).
72. Abildayeva, K. *et al.* 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **281**, 12799–12808 (2006).
73. Marchler-Bauer A *et al.* CDD:NCBI's conserved domain database. 1 (2015). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>. (Accessed: 6th September 2015)
74. Calkin, A. C. & Tontonoz, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 213–224 (2012).
75. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. a, Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
76. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* **25**, 57–70 (2007).
77. Lee, J. H. *et al.* Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol. Cell* **35**, 806–17 (2009).
78. Wang, Y. *et al.* Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J. Biol. Chem.* **283**, 26332–9 (2008).
79. Hozoji, M. *et al.* Direct interaction of nuclear liver X receptor-beta with ABCA1 modulates cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **283**, 30057–30063 (2008).
80. Wang, L. *et al.* Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13878–13883 (2002).
81. Whitney, K. D. *et al.* Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1378–85 (2002).
82. Koldamova, R. P. *et al.* 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J. Biol. Chem.* **278**, 13244–56 (2003).
83. Grill, J. D. & Cummings, J. L. Current therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* **10**, 711–728 (2010).
84. Korabecny, J. *et al.* *Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Current State and Future*

- Perspectives. Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease* (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-803959-5.50001-5
85. Petersen, R. C. *et al.* Vitamin E and Donepezil for the Treatment of Mild Cognitive Impairment. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2379–2388 (2005).
 86. Feldman, H. H., Lane, R. & Study 304 Group. Rivastigmine: a placebo controlled trial of twice daily and three times daily regimens in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry* **78**, 1056–1063 (2007).
 87. Reisberg, B. Diagnostic Criteria in Dementia: A Comparison of Current Criteria, Research Challenges, and Implications for DSM-V. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **19**, 137–146 (2006).
 88. Raskind, M. A., Peskind, E. R., Wessel, T. & Yuan, W. Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology* **54**, 2261–8 (2000).
 89. Reisberg, B. *et al.* A 24-Week Open-Label Extension Study of Memantine in Moderate to Severe Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* **63**, 49 (2006).
 90. Aziz, O., Bürlí, R. W., Fischer, D. F., Frearson, J. & Wall, M. D. *Towards small molecules as therapies for alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease* (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-803959-5.50004-0
 91. Wolfe, M. S., Esler, W. P. & Das, C. Continuing strategies for inhibiting alzheimer's γ -secretase. *J. Mol. Neurosci.* **19**, 83–87 (2002).
 92. Gauthier, S. *et al.* Recommendations of the 4th Canadian Consensus Conference on the Diagnosis and Treatment of Dementia (CCCDTD4). *Can. Geriatr. J.* **15**, 120–6 (2012).
 93. Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 387–398 (2010).
 94. Pardee, K., Necakov, A. S. & Krause, H. in *A Handbook of Transcription Factors, Subcellular Biochemistry* **52**, 123–153 (Springer Netherlands, 2011).
 95. Huang, Y. & Mucke, L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell* **148**, 1204–1222 (2013).
 96. Liu, C.-C., Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H. & Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 106–18 (2013).
 97. Farlow, M. R. *et al.* Long-term treatment with active A β immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **7**, 23 (2015).
 98. Liu, E. *et al.* Amyloid- β ¹¹ C-PiB-PET imaging results from 2 randomized bapineuzumab phase 3 AD trials. *Neurology* **85**, 692–700 (2015).
 99. Dunstan, R. *et al.* Molecular characterization and preclinical efficacy. *Alzheimer's Dement.* **7**, S457 (2011).
 100. Shepardson, N. E., Shankar, G. M. & Selkoe, D. J. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations. *Arch. Neurol.* **68**, 1385–92 (2011).
 101. Skerrett, R., Malm, T. & Landreth, G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* **72**, 104–116 (2014).
 102. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–8 (2000).
 103. Sandoval-Hernández, A. G., Buitrago, L., Moreno, H., Cardona-Gómez, G. P. & Arboleda, G. Role of Liver X Receptor in AD Pathophysiology. *PLoS One* **10**, e0145467 (2015).
 104. Sandoval-Hernández, A. G. *et al.* Liver X Receptor Agonist Modifies the DNA Methylation Profile of Synapse and Neurogenesis-Related Genes in the Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.* **58**, 243–53 (2016).
 105. Sandoval-Hernández, A. G., Restrepo, A., Cardona-Gómez, G. P. & Arboleda, G. LXR activation protects hippocampal microvasculature in very old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **621**, 15–21 (2016).
 106. Yang, C., Li, Q. & Li, Y. Targeting nuclear receptors with marine natural products. *Mar. Drugs* **12**, 601–635 (2014).

107. Huang, C. Review Natural modulators of liver X receptors. *J. Integr. Med.* **12**, 76–85 (2014).
108. Lin, H.-R. Paeoniflorin acts as a liver X receptor agonist. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **15**, 35–45 (2013).
109. Caballero Muñoz, R. *La etnobotánica en las comunidades negras e indígenas del delta del Río Patía*. (Ediciones Abya-Yala, 1995).
110. García Barriga, H. *Flora medicinal de Colombia : botánica médica*. (Tercer Mundo, 1992).
111. Atta, A. . & Alkofahi, A. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *J. Ethnopharmacol.* **60**, 117–124 (1998).
112. Prieto, J. Estudio fitoquímico de *Compsonera capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp. (Universidad Nacional de Colombia, 2012).
113. Oscar, L. *et al.* *Zanthoxylum* Genus as Potential Source of Bioactive Compounds.
114. Taylor, C M; Devia, W. La Familia de Árboles Tropicales Myristicaceae en el Departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Biota Colomb.* **1**, 106–108 (2000).
115. Herrera, M. La familia Myristicaceae. Posibilidades de uso múltiple y sostenido en bosques húmedos tropicales de Colombia. (Universidad Nacional de Colombia, 1994).
116. Joshi, S., Guleria, R., Pan, J., DiPette, D. & Singh, U. S. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* **25**, 240–7 (2006).
117. Biedler, J. L., Helson, L. & Spengler, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **33**, 2643–52 (1973).
118. Hong-rong, X., Lin-sen, H. & Guo-yi, L. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J. (Engl)*. **123**, 1086–1092 (2010).
119. Singh, J. & Kaur, G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res.* **1154**, 8–21 (2007).
120. Cernaianu, G. *et al.* All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *J. Pediatr. Surg.* **43**, 1284–94 (2008).
121. Kume, T. *et al.* Dibutyl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci. Lett.* **443**, 199–203 (2008).
122. Guarnieri, S. *et al.* Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* **27**, 135–47 (2009).
123. Hill, M. *et al.* Characteristics of a Human Cell Line Transformed by D N A from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74 (1977).
124. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).
125. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F. L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **16**, 869–71 (2002).
126. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
127. NACHLAS, M. M., MARGULIES, S. I., GOLDBERG, J. D. & SELIGMAN, A. M. The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.* **1**, 317–26 (1960).
128. Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. & Evans, R. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65**, 1255–66 (1991).
129. Laffitte, B. A. *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 507–512 (2001).

130. Kemmerer, M., Wittig, I., Richter, F., Br??ne, B. & Namgaladze, D. AMPK activates LXR?? and ABCA1 expression in human macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **78**, 1–9 (2016).
131. Lee, S. *et al.* Sterol-dependent nuclear import of ORP1S promotes LXR regulated trans-activation of apoE. *Exp. Cell Res.* **318**, 2128–2142 (2012).
132. Moutinho, M. *et al.* Cholesterol 24S-Hydroxylase Overexpression Inhibits the Liver X Receptor (LXR) Pathway by Activating Small Guanosine Triphosphate-Binding Proteins (sGTPases) in Neuronal Cells. *Mol. Neurobiol.* **51**, 1489–1503 (2015).
133. Temml, V., Voss, C. V., Dirsch, V. M. & Schuster, D. Discovery of new liver X receptor agonists by pharmacophore modeling and shape-based virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 367–371 (2014).
134. Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–8 (1996).
135. Pacifico, S. *et al.* Apolar *Laurus nobilis* leaf extracts induce cytotoxicity and apoptosis towards three nervous system cell lines. *Food Chem. Toxicol.* **62**, 628–637 (2013).
136. Ma, Q.-G. *et al.* Hepatoprotective Sesquiterpenes and Rutinosides from *Murraya koenigii* (L.) Spreng. doi:10.1021/jf5005034
137. Peng, D. *et al.* A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1792–804 (2011).
138. Stukas, S. *et al.* The LXR agonist GW3965 increases apoA-I protein levels in the central nervous system independent of ABCA1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 536–546 (2012).
139. Huang, Z. H., Lin, C. Y., Oram, J. F. & Mazzone, T. Sterol efflux mediated by endogenous macrophage ApoE expression is independent of ABCA1. *Arter. Thromb Vasc Biol* **21**, 2019–2025 (2001).
140. Foley, P. Lipids in Alzheimer's disease: A century-old story. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 750–753 (2010).
141. Casali, B. T. *et al.* Omega-3 Fatty Acids Augment the Actions of Nuclear Receptor Agonists in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **35**, 9173–81 (2015).
142. Zhang, X. *et al.* Neuropharmacology Quercetin stabilizes apolipoprotein E and reduces brain A b levels in amyloid model mice. **108**, 179–192 (2016).
143. Fitz, N. F. *et al.* Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J. Neurosci.* **30**, 6862–72 (2010).
144. Pacifico, S. *et al.* Apolar *Laurus nobilis* leaf extracts induce cytotoxicity and apoptosis towards three nervous system cell lines. *Food Chem. Toxicol.* **62**, 628–637 (2013).
145. Chen, H. *et al.* Sesquiterpenes Inhibiting the Microglial Activation from *Laurus nobilis*. doi:10.1021/jf501515v
146. Wang, Z. *et al.* Upregulation of hydroxysteroid sulfotransferase 2B1b promotes hepatic oval cell proliferation by modulating oxysterol-induced LXR activation in a mouse model of liver injury. *Arch. Toxicol.* **91**, 271–287 (2017).
147. Wang, J., Fang, Y., Ji, W. & Xu, H. LXR agonists promote the proliferation of neural progenitor cells through MEK-ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 216–222 (2017).
148. Taiz, L., Zeiger, E. & Universitat Jaume I. Publicacions. *Fisiología vegetal*. (Universitat Jaume I, 2006).
149. Siddiqui, M. W. & Prasad, K. *Plant secondary metabolites*.
150. Prieto, J. Estudio fitoquímico de *Compsonera capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp. 5–183 (2012).
151. Wu, T. *et al.* The effects of *Zanthoxylum bungeanum* extract on lipid metabolism induced by sterols. *J. Pharmacol. Sci.* **127**, 251–259 (2015).
152. Kotani, H., Tanabe, H., Mizukami, H., Makishima, M. & Inoue, M. Identification of a naturally

- occurring retinoid, honokiol, that activates the retinoid X receptor. *J. Nat. Prod.* **73**, 1332–1336 (2010).
153. Traves, P. G., Hortelano, S. & Zeini, M. Selective Activation of Liver X Receptors by Acanthoic. **71**, 1545–1553 (2007).
 154. Fan, J. *et al.* Hormonal modulators of glial ABCA1 and apoE levels. *J. Lipid Res.* **54**, 3139–50 (2013).
 155. Duan, H., Gu, D. & Mazzone, T. Sterols and inhibitors of sterol transport modulate the degradation and secretion of macrophage ApoE: requirement for the C-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1484**, 142–150 (2000).
 156. Nathan, B. P. *et al.* Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Brain Res.* **928**, 96–105 (2002).
 157. BELLOSTA, S. *et al.* Stable Expression and Secretion of Apolipoproteins E3 and E4 in Mouse Neuroblastoma-Cells Produces Differential-Effects on Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* **270**, 27063–27071 (1995).
 158. Ji, Z. S., Dennis Miranda, R., Newhouse, Y. M., Weisgraber, Y. H., Huang, K. H. & Mahley, R. W. Apolipoprotein E4 potentiates amyloid β peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 21821–21828 (2002).
 159. Karasinska, J. M. *et al.* ABCA1 influences neuroinflammation and neuronal death. *Neurobiol. Dis.* **54**, 445–455 (2013).
 160. Minagawa, H. *et al.* Mechanism Underlying Apolipoprotein E (ApoE) Isoform- dependent Lipid Efflux From Neural Cells in Culture Hirohisa. *Anal chim Acta* **87**, 2498–2508 (2009).
 161. Michikawa, M., Fan, Q. W., Isobe, I. & Yanagisawa, K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* **74**, 1008–1016 (2000).
 162. Xu, P. T. *et al.* Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am. J. Pathol.* **154**, 601–11 (1999).
 163. Jiang, M. & Li, X. Activation of PPAR γ does not contribute to macrophage ABCA1 expression and ABCA1-mediated cholesterol efflux to apoA1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 849–856 (2017).
 164. Boyles, J. K., Pitas, R. E., Wilson, E., Mahley, R. W. & Taylor, J. M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* **76**, 1501–1513 (1985).
 165. Burns, M. P. *et al.* The effects of ABCA1 on cholesterol efflux and A β levels in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* **98**, 792–800 (2006).
 166. Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L. G. & Guizzetti, M. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 263–275 (2013).
 167. Lefterov, I. *et al.* Expression profiling in APP23 mouse brain: inhibition of A β amyloidosis and inflammation in response to LXR agonist treatment. *Mol. Neurodegener.* **2**, 20 (2007).
 168. Hirsch-Reinshagen, V. *et al.* Deficiency of ABCA1 Impairs Apolipoprotein E Metabolism in Brain. *J. Biol. Chem.* **279**, 41197–41207 (2004).
 169. Baez, C. T. EFECTO DE AGONISTA DE RECEPTORES X DEL HÍGADO (LXR) SOBRE LA DINÁMICA SINÁPTICA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES BAJO EXPOSICIÓN A β -AMILOIDE. (Universidad Nacional de Colombia, 2015).