

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 427**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 5/50</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2019 PCT/IB2019/055788**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2020 WO20008442**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2019 E 19768889 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3817764**

54 Título: **Agentes biofarmacéuticos para uso en la reducción del contenido de lípidos en las células**

30 Prioridad:

**06.07.2018 ZA 201804507**  
**06.07.2018 ZA 201804509**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF THE WITWATERSRAND,  
JOHANNESBURG (100.0%)  
1 Jan Smuts Avenue, Braamfontein  
Johannesburg 2000 Gauteng, ZA**

72 Inventor/es:

**WEISS, STEFAN FRANZ THOMAS;  
OTGAAR, TYRONE CHAD;  
VAN DER MERWE, ELOISE;  
BERNERT, MARTIN y  
MORRIS, GAVIN**

74 Agente/Representante:

**BERCIAL ARIAS, Cristina**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 427 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Agentes biofarmacéuticos para uso en la reducción del contenido de lípidos en las células

## 5 CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

Esta descripción se refiere a un método para disminuir la concentración de lípidos en una célula diana de un sujeto humano o animal. La descripción se extiende al uso de agentes biofarmacéuticos que incluyen (i). el receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa precursor del receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR) y/o un fragmento del mismo, o (ii). un agente de transfección para la expresión de LRP/LR, en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/o resistencia a insulina y/o diabetes en un sujeto humano o animal. En uso, la administración del agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en las células diana.

## 15 ANTECEDENTES

La aterosclerosis es una enfermedad crónica progresiva que implica el bloqueo de las arterias, y es la forma principal de enfermedad cardiovascular (ECV). Es el resultado de la formación de placas ateroscleróticas que ocluyen las arterias y disminuyen el flujo sanguíneo a los órganos vitales.

20 La aterosclerosis está muy influenciada por el estrés oxidativo, contribuyendo especies reactivas de oxígeno (ROS) en gran medida al estado oxidativo del cuerpo. Las ROS se forman durante diversos procesos celulares, tal como la respiración celular. Se producen cuando una molécula de oxígeno pierde electrones, lo que les permite participar fácilmente en reacciones oxidativas, y contribuir así al estrés oxidativo (Chen et al., 2003). Las ROS reaccionan fácilmente con lipoproteínas de baja densidad (LDL) para formar LDL oxidada (oxLDL), una molécula responsable de la respuesta inflamatoria que da como resultado la formación de placas ateroscleróticas (Grahame y Schlesinger, 25 2012).

Con el tiempo, la acumulación de placas estrecha los vasos sanguíneos y ocluye la arteria, provocando que el corazón bombee más fuertemente, conduciendo a tejido dañado e hipertensión (Tedgui y Mallat, 1999). Además, estas placas son propensas a romperse debido a sus componentes lipídicos extracelulares blandos. Cuando estas placas se rompen, pueden causar la oclusión completa de los vasos sanguíneos dando como resultado acontecimientos cardiovasculares importantes, tales como infartos de miocardio o enfermedad cerebrovascular (Tedgui y Mallat, 1999).

35 La aterosclerosis es la principal causa de muertes relacionadas con el sistema cardiovascular, teniendo las terapias actuales tales como inhibidores de ACE y  $\beta$ -bloqueadores el objetivo de reducir el estrés en el músculo cardíaco al reducir la hipertensión causada por la oclusión de los vasos sanguíneos (Conte et al., 2015). Sin embargo, las terapias actuales no pretenden eliminar las placas ateroscleróticas que están causando la oclusión, y los únicos tratamientos actuales para la aterosclerosis es una derivación coronaria o expansión de las arterias, ambas altamente invasivas. El tratamiento de la aterosclerosis con fármacos que reducen la tensión arterial permite evitar que los órganos reciban el oxígeno y los nutrientes adecuados ya que las placas evitarían el flujo sanguíneo adecuado, lo que puede causar un fallo orgánico final (Conte et al., 2015). Además, en el caso de que estas placas revienten, puede ocurrir la oclusión completa de uno o más vasos sanguíneos, y dependiendo de la ubicación, podría dar como resultado acontecimientos cardiovasculares importantes, tales como infartos de miocardio y acontecimientos cerebrovasculares.

Por consiguiente, existe la necesidad de una nueva innovación que reduzca y/o impida la formación de placas.

50 La aterosclerosis es a menudo comórbida con la obesidad, la resistencia a insulina y/o diabetes. Una dieta rica en lípidos desempeña a menudo un papel contribuyente principal. Típicamente, se observa un aumento en los niveles de ROS en la obesidad debido al deterioro mitocondrial. El mecanismo molecular que conduce a esta resistencia a insulina se desencadena por el tejido adiposo que es metabólicamente activo en individuos obesos, experimentando continuamente de este modo lipólisis y generando ácidos grasos libres (FFA) (Gavin et al, 2017). Estos FFA actúan como antagonistas de la insulina (Salpea, 2010), y estimulan la producción de glucosa por el hígado, mientras que suprimen la captación de glucosa por los músculos esqueléticos. Los niveles de FFA aumentados disminuyen la  $\beta$ -oxidación mitocondrial en células del músculo esquelético y en células hepáticas. La  $\beta$ -oxidación mitocondrial reducida da como resultado la acumulación de diacilglicerol (DAG) y acilcoenzima A de cadena larga (LCCoA) (Savage et al. 2007; Salpea, 2012). Esto a su vez induce la fosforilación de serina/treonina de los sitios IRS-1, inhibiendo así la fosforilación de IRS-1 y la activación de la señalización de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P). PI3P regula la síntesis del transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Savage et al. 2007; Salpea, 2012). Por tanto, la inhibición de la activación de PI3P en el esqueleto da como resultado una síntesis disminuida de GLUT4, y en consecuencia una captación reducida de glucosa por los músculos esqueléticos. La inhibición de la activación de PI3P en células hepáticas conduce a una fosforilación reducida de la proteína O de la caja forkhead (FOXO), que a su vez da como resultado un aumento de la gluconeogénesis hepática (Savage et al. 2007). El aumento de FFA en individuos obesos conduce a hiperglucemia e inducción de resistencia a insulina observada en pacientes con diabetes tipo II (Gavin, 2017; Mejia, 2006). Estos cambios celulares promueven la acumulación de metabolitos lipídicos específicos

(diacilgliceroles y/o ceramidas) en el hígado y el músculo esquelético, y se ha encontrado que el contenido de lípido de las células en la diabetes aumenta, lo que también está asociado con la resistencia a insulina (Gavin et al, 2017)

5 Los protocolos actuales de tratamiento de la diabetes tipo II se dirigen al azúcar en sangre en lugar de a la señalización alterada de la insulina causada por niveles de insulina crónicamente elevados (Ford, 2010). En consecuencia, existe la necesidad de una nueva innovación que se dirija contra la señalización alterada de la insulina.

10 En el documento WO 2017/077516 A2 (University of the Witwatersrand) se describen compuestos para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con telómeros, por ejemplo cáncer. Particularmente, se describen un precursor de receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR) y/o un fragmento del mismo para uso en el tratamiento y/o prevención del envejecimiento celular. Sin embargo, no se incluye ninguna descripción habilitante para el uso de tales sustancias en el tratamiento de obesidad, aterosclerosis, resistencia a insulina y/o diabetes.

15 El documento JP 2018 027935 A describe los efectos del polifenol polimerizado de té oolong como un agonista de 67LR. Se menciona generalmente que los agonistas de 67LR se pueden usar para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con 67LR que pueden ser, entre otras, obesidad o arteriosclerosis. Los ejemplos descritos se refieren principalmente a cáncer. En esencia, una disminución de 67LR parece ser el modo de acción en el documento JP 2018 027935 A.

20 El documento JP 2015 155383 A enseña extracto de té verde que tiene efectos anticancerosos. Se describe que el extracto de té y EGCg potencian la expresión de tres receptores, el receptor de laminina, el receptor de retinoide X RXRA, y el receptor de ácidos grasos libres FFAR2. Se afirma que la activación de los dos últimos receptores "probablemente tienen efectos antiobesidad".

25 Esta descripción busca mejorar las desventajas conocidas en la técnica. Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia.

## SUMARIO

35 La invención se define en las reivindicaciones independientes 1, 10 y 11. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones preferidas de la invención.

40 Según un primero aspecto, sin embargo no reivindicado, en esta descripción, se proporciona un método para disminuir la concentración de lípidos en una célula diana de un sujeto humano o animal, comprendiendo el método las siguientes etapas:

(i) transfectar la célula para producir precursor de receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo; o

45 (ii) proporcionar a la célula LRP/LR y/o fragmentos del mismo,

en el que una disminución en la concentración de lípidos en la célula trata y/o previene aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes.

50 La etapa de transfectar puede incluir encapsular un agente de transfección para la administración específica del sitio a la célula, y la etapa de proporcionar puede incluir encapsular el LRP/LR para la administración específica del sitio a la célula.

El agente de transfección y/o el LRP/LR y/o el fragmento de LRP/LR son agentes biofarmacéuticos.

55 La encapsulación puede ser por medio de nanopartículas para formar un medio de administración para el agente de transfección y/o el LRP/LR. Las nanopartículas pueden funcionalizarse con restos químicos, bioquímicos o biológicos para asegurar la administración específica del sitio a la célula.

60 Los restos pueden actuar como ligandos para asegurar la administración específica del sitio en la célula.

La célula puede ser al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: células endoteliales de vasos sanguíneos, células de músculos lisos de vasos sanguíneos, células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y gamma ( $\gamma$ ).

65 El medio de administración se puede formular en una composición farmacéutica, la cual puede incluir además un vehículo farmacéutico para la administración parenteral o no parenteral al sujeto.

5 La administración no parenteral puede incluir al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: administración oral, nasal, rectal, vaginal, óptica, y transdérmica. Típicamente, la administración no parenteral puede ser oral. La administración parenteral puede incluir al menos una de administración intravenosa, subcutánea e intramuscular. Típicamente, la administración parenteral puede ser intravenosa.

La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante, de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

10 La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API).

El sujeto puede ser un ser humano, animal, reptil, ave o anfibio. Típicamente, el sujeto puede ser un ser humano y/o animal, preferiblemente ser humano.

15 El agente de transfección puede ser el plásmido pCIneo-moLRP::FLAG.

LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del mismo.

20 SEQ ID NO: 1 puede ser una secuencia de péptido/proteína para LRP/LR humano, y puede tener la siguiente secuencia:

MSGALDVLQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLL

AARAIVAIENPADSVISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGTFTNQIQAAREPR

LLVVTDPRADHQLPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR

EVLRMRGTISREHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA

25 TQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAQATEWVGATTDWS

SEQ ID NO: 2 puede ser una secuencia de péptido/proteína de ratón (*Mus musculus*) LRP/LR y puede tener la siguiente secuencia:

MSGALDVLQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLL

AARAIVAIENPADSVISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGTFTNQIQAAREPR

LLVVTDPRADHQLPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR

EVLRMRGTISREHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA

30 AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAQATEWVGATTEWS

35 Debe entenderse que LRP/LR está muy conservado, y también se pueden utilizar homólogos o fragmentos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y/u homólogos de los fragmentos, a fin de realizar la invención descrita, ilustrada y/o ejemplificada aquí.

LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas que tiene al menos 80 % de homología con las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del mismo.

40 LRP/LR puede comprender homólogos o fragmentos de los mismos, y homólogos de los fragmentos, en los que LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

45 La secuencia de péptido/proteína de LRP/LR o un homólogo o fragmento del mismo, o un homólogo del fragmento, se puede ligar a, o enlazar con, o unir a, o conjugar con, o asociar con, una secuencia de proteína adicional, secuencia de aminoácidos, péptido, proteína, o anticuerpo. Alternativa y/o adicionalmente, la secuencia de péptido/proteína de LRP/LR puede formar parte de una secuencia de péptido/proteína más grande y/o más larga. En una determinada realización de la invención, LRP/LR se puede ligar a, o enlazar con, o unir a, o conjugar con, o asociar con, la proteína FLAG, de manera que, en uso, el LRP/LR se puede etiquetar con FLAG. La proteína FLAG puede incluir una secuencia de péptido/proteína que incluye al menos un motivo de secuencia DYKDDDDK (SEQ ID NO: 3). Se contemplan otras proteínas marcadoras aparte de FLAG para todas las realizaciones de esta descripción.

50

Debe entenderse que la etapa de transfectar la célula para producir precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento, puede tener lugar a través de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo la introducción en la célula del agente de transfección. La etapa de transfectar la célula puede aumentar LRP/LR para provocar la sobreexpresión de LRP/LR.

5 El fragmento del listado de secuencias de péptidos/proteínas se expone en SEQ ID NO: 4, que corresponde a un fragmento de SEQ ID NO: 1 de 102 a 295, y/o SEQ ID NO: 5, que corresponde a un fragmento de SEQ ID NO: 2 de 102 a 295.

10 SEQ ID NO: 4 puede ser una secuencia de péptido/proteína para un fragmento de LRP/LR humano, y puede tener la siguiente secuencia:

RFTPGTFTNQIAAFREPR

LLVVTDPRAHDHQLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR

EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAAEKAVTKKEEFQGEWTAPAPEFTA

TQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAAQATEWVGATTDWS

15 SEQ ID NO: 5 puede ser una secuencia de péptido/proteína para un fragmento de LRP/LR de ratón, y puede tener la siguiente secuencia:

RFTPGTFTNQIAAFREPR

LLVVTDPRAHDHQLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR

EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAAEKAVTKKEEFQGEWTAPAPEFTA

AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAAQATEWVGATTEWS.

20 El método se extiende generalmente al aumento de la expresión de LRP/LR en las células diana.

Según un segundo aspecto de esta descripción, se proporciona un agente biofarmacéutico que incluye un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes, en el que LRP/LR y/o el fragmento del mismo son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita. En uso, la administración del agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en la célula diana.

25

LRP/LR puede encapsularse en un medio de administración.

30 El medio de administración puede incluir nanopartículas. Las nanopartículas pueden funcionalizarse con restos químicos, bioquímicos o biológicos para asegurar la administración específica del sitio a la célula diana.

Los restos pueden actuar como ligandos para asegurar la administración específica del sitio en la célula diana.

35 La célula diana puede ser al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: células endoteliales de vasos sanguíneos, células de músculos lisos de vasos sanguíneos, células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y células gamma ( $\gamma$ ).

40 El medio de administración puede formularse en una composición farmacéutica, la cual puede incluir además un vehículo farmacéutico para administración parenteral o no parenteral al sujeto.

La administración no parenteral puede incluir al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: administración oral, nasal, rectal, vaginal, óptica, y transdérmica. Típicamente, la administración no parenteral puede ser oral. La administración parenteral puede incluir al menos una de administración intravenosa, subcutánea e intramuscular. Típicamente, la administración parenteral puede ser intravenosa.

45

La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

50 La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API).

El sujeto puede ser un ser humano, animal, reptil, ave o anfibio. Típicamente, el sujeto puede ser un ser humano y/o animal, preferiblemente un ser humano.

LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o comprende un fragmento del mismo como se expone en el primer y segundo aspectos aquí anteriormente.

5 Según un tercer aspecto de esta descripción, se proporciona un agente biofarmacéutico que incluye un agente de transfección para expresar un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, el agente de transfección para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes, en el que el agente de transfección es para administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita.

El agente de transfección puede encapsularse en un medio de administración.

15 El medio de administración puede incluir nanopartículas. Las nanopartículas pueden funcionalizarse con restos químicos, bioquímicos o biológicos para asegurar la administración específica del sitio a la célula diana.

Los restos pueden actuar como ligandos para asegurar la administración específica del sitio en la célula diana.

20 La célula diana puede ser al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: células endoteliales de vasos sanguíneos, células de músculos lisos de vasos sanguíneos, células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y células gamma ( $\gamma$ ).

El medio de administración se puede formular en una composición farmacéutica, la cual puede incluir además un vehículo farmacéutico para administración parenteral o no parenteral al sujeto.

25 La administración no parenteral puede incluir al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: administración oral, nasal, rectal, vaginal, óptica, y transdérmica. Típicamente, la administración no parenteral puede ser oral. La administración parenteral puede incluir al menos una de administración intravenosa, subcutánea e intramuscular. Típicamente, la administración parenteral puede ser intravenosa.

30 La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

35 La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API).

El agente de transfección puede ser plásmido pCIneo-moLRP::FLAG.

40 LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o comprende un fragmento del mismo como se expone en el primer y segundo aspectos aquí anteriormente.

45 Según un cuarto aspecto de esta descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente de transfección para el receptor de laminina de alta afinidad precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, y un vehículo, la composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes, en el que LRP/LR y/o el fragmento del mismo son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita.

50 La composición farmacéutica en la que LRP/LR está encapsulado proporcionando un medio de administración.

La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

55 La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API).

LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o comprende un fragmento del mismo como se expone en el primer y segundo aspectos aquí anteriormente.

60 Según un quinto aspecto de esta descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente de transfección para expresar precursor de receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, y un vehículo, la composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes.

65 La composición farmacéutica en la que el agente de transfección está encapsulado proporcionando un medio de administración.

La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

5 La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API).

El sujeto puede ser un ser humano, animal, reptil, ave o anfibio. Típicamente, el sujeto puede ser un ser humano y/o animal, preferiblemente un ser humano.

10 LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o comprende un fragmento del mismo como se expone en el primer y segundo aspectos aquí anteriormente.

15 El agente de transfección puede ser plásmido pCIneo-moLRP::FLAG.

Según un sexto aspecto, sin embargo no reivindicado, de esta descripción, se proporciona un método para tratar y/o prevenir aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes, incluyendo el método las siguientes etapas:

20 (i). transfectar la célula para producir precursor de receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo; o

(ii). proporcionar a la célula LRP/LR y/o fragmentos del mismo,

25 de manera que, en uso, se proporciona una disminución en la concentración de lípidos en una célula diana tratando y/o previniendo en ella aterosclerosis y/o resistencia a insulina y/o diabetes.

El agente de transfección y/o el LRP/LR y/o el fragmento de LRP/LR son agentes biofarmacéuticos.

30 La etapa de transfectar puede incluir encapsular un agente de transfección para la administración específica del sitio a la célula, y la etapa de proporcionar puede incluir encapsular el LRP/LR para la administración específica del sitio a la célula.

35 La encapsulación puede ser por medio de nanopartículas para formar un medio de administración para el agente de transfección y/o el LRP/LR. Las nanopartículas pueden funcionalizarse con restos químicos, bioquímicos o biológicos para asegurar la administración específica del sitio a la célula.

Los restos pueden actuar como ligandos para asegurar la administración específica del sitio en la célula.

40 La célula diana puede ser al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: células endoteliales de vasos sanguíneos, células de músculos lisos de vasos sanguíneos, células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y células gamma ( $\gamma$ ).

45 El medio de administración se puede formular en una composición farmacéutica, la cual puede incluir además un vehículo farmacéutico para administración parenteral o no parenteral al sujeto.

50 La administración no parenteral puede incluir al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: administración oral, nasal, rectal, vaginal, óptica y transdérmica. Típicamente, la administración no parenteral puede ser oral. La administración parenteral puede incluir al menos una de administración intravenosa, subcutánea e intramuscular. Típicamente, la administración parenteral puede ser intravenosa.

La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

55 La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API).

El sujeto puede ser un ser humano, animal, reptil, ave o anfibio. Típicamente, el sujeto puede ser un ser humano y/o animal, preferiblemente un ser humano.

60 El agente de transfección puede ser plásmido pCIneo-moLRP::FLAG.

LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del mismo como se expone en el primer aspecto de esta descripción aquí anteriormente.

65

Según un séptimo aspecto de esta descripción, se proporciona el uso de (i). precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, o (ii). un agente de transfección para la expresión de LRP/LR, en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/o obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes.

5 Según un octavo aspecto de esta descripción, se proporciona una composición farmacéutica para la administración específica del sitio de un agente biofarmacéutico a un sitio diana específico dentro de un ser humano o animal, incluyendo la composición farmacéutica:

10 el agente biofarmacéutico encapsulado por una matriz portadora, de tal manera que, en uso, la matriz portadora facilita la administración específica del sitio del biofármaco e impide concomitantemente su degradación antes de alcanzar, o en, el sitio diana,

15 en la que el agente biofarmacéutico es al menos uno del siguiente grupo: (i). precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, (ii). un agente de transfección para la expresión de LRP/LR, y (iii). un anticuerpo específico anti-LRP/LR.

20 El agente biofarmacéutico puede ser adicional o alternativamente cualquier medio para aumentar o disminuir la expresión de LRP/LR dentro del cuerpo humano o animal. El agente biofarmacéutico puede ser ácido nucleico. El agente biofarmacéutico puede ser, por ejemplo, ARNip y/o ARNhc.

La matriz portadora puede ser una matriz portadora polimérica.

25 La matriz portadora polimérica puede incluir nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas pueden incluir polímeros sintéticos o naturales.

30 Las nanopartículas poliméricas pueden ser biodegradables para proporcionar, en uso, un riesgo reducido de una respuesta inmunogénica a dichas nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas pueden ser biocompatibles para mitigar el riesgo de cualquier respuesta inmunogénica a dichas nanopartículas poliméricas.

35 Las nanopartículas poliméricas pueden ser estímulos sensibles de tal manera que, en uso, las nanopartículas experimentan un cambio conformacional tras la exposición a ciertos estímulos para facilitar la provisión del agente biofarmacéutico a su sitio diana. Las nanopartículas pueden ser sensibles a estímulos que incluyen, por ejemplo: pH, temperatura, y corriente eléctrica.

40 Las nanopartículas poliméricas pueden ser hidrófobas o hidrófilas, dependiendo del sitio diana específico.

Las nanopartículas poliméricas pueden estar reticuladas. Típicamente, para la reticulación se usa un agente de reticulación. Sin embargo, la reticulación puede tener lugar por medio de irradiación ultravioleta (U.V.).

45 Las nanopartículas poliméricas pueden estar liofilizadas. La liofilización proporciona típicamente porosidad para facilitar la difusión del biofármaco lejos de la cápsula de nanopartículas y al sitio diana.

50 Las nanopartículas poliméricas pueden ser una cualquiera o más seleccionada, pero sin limitarse a, del siguiente grupo: eudragit, goma arábiga, carragenina, celulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), quitina, pectina, amilopectina, caucho natural, polietileno, polipropileno, poliestireno, poliamida, poliacrilonitrilo, cloruro de polivinilo, alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno (PEG), poli(D-lactida) (PDLA), ácido poliláctico (PLLA), poligalacturonato, metilcelulosa (poliacetales), poli(ε-caprolactona), fosfolípidos, polisacáridos, polisacáridos polianiónicos, carboximetilcelulosa, carboximetilamilosa, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, heparina, sulfato de heparina, poli(metacrilato de hidroxietilo), colágeno, fibrinógeno, albúmina, fibrina, acrilamida, copolímeros a base de hidroxipropilmetacrilamida, poli(acrilamida), poli(N-isopropilacrilamida) (pNIPAAm), polivinilpirrolidona, poli(ácido metacrílico-g-etilenglicol), poli(N-2-hidroxipropilmetacrilamida), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), quitosano, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (HEMA), polifazeno, fosforilcolina, ácido hialurónico (HA), metacrilato de hidroxietilo (HEMA), metilen-bis-acrilamida (MBAAm), poli(ácido acrílico) (PAAc), poli(acrilamida) (PAAm), poli(acrilonitrilo) (PAN), óxido de polibutileno (PBO), policaprolactona (PCL), polietilenimina (PEI), poli(metacrilato de etilo) (PEMA), fumarato de propileno (PF), poli(metacrilato de glucosietilo) (PGEMA), poli(hidroxibutirato) (PHB), poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), poli(hidroxipropilmetacrilamida) (PHPMA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(N-vinilpirrolidona) (PNVP), óxido de polipropileno (PPO), poli(acetato de vinilo) (PVAc), poli(vinilamina), sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, polilisina, gelatina, carboximetilquitina, dextrano, agarosa, pululano, poliésteres, PEG-bis-PEG, PEG-PLA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLA-PEG-PLA, poli(PF-co-EG), poli(tereftalato de PEG/PBO), PEG-bis-(acrilato de PLA), PEG6CD, PEG-g-poli(AAm-co-vinilamina), poli(NIPAAm-co-AAc), poli(NIPAAm-co-EMA), PNVP, poli(MMA-co-HEMA), poli(AN-co-sulfonato de alilo),

poli(biscarboxi-fenoxi-fosfaceno), poli(sulfato de GEMA), poli(PEG-co-péptidos), alginato-g-(PEO-PPO-PEO), poli(PLGA-co-serina), acrilato de colágeno, alginato, acrilato de alginato, poli(HPMA-g-péptido), HA-g-NIPAAm, y poli(vinil metil éter) (PVME), y/o derivados de uno cualquiera o más de los mencionados anteriormente.

5 En un ejemplo de realización de la descripción, las nanopartículas poliméricas pueden ser nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).

PLGA es biodegradable, biocompatible, y puede atravesar la barrera hematoencefálica (BBB).

10 Las nanopartículas se pueden funcionalizar con un primer grupo funcional. El primer grupo funcional puede ser al menos uno de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: restos químicos, bioquímicos y biológicos.

Los restos químicos pueden incluir restos orgánicos, inorgánicos, o una combinación de restos orgánicos e inorgánicos.

15 Los restos bioquímicos pueden incluir al menos uno de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: aminoácidos, péptidos, polipéptidos, oligopéptidos, proteínas, enzimas, anticuerpos, o secuencias de ARN o ADN que codifican uno cualquiera de los mencionados anteriormente.

20 Típicamente, el primer grupo funcional, en uso, actúa como un ligando para facilitar la administración específica del sitio de la composición farmacéutica. Debe entenderse que los grupos funcionales pueden diferir dependiendo del sitio diana. En uso, el primer grupo funcional se enlaza con, o se une a, o se conjuga con, o se asocia con, el sitio diana.

25 Adicional o alternativamente, se proporciona en el biofármaco para incluir al menos un segundo grupo funcional.

El segundo grupo funcional puede ser al menos uno de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: restos químicos, bioquímicos y biológicos. De esta manera, no sólo las nanopartículas ayudarán a la administración específica del sitio, sino que el biofármaco también ayudará a la administración específica de sitio.

30 Los restos químicos pueden incluir restos orgánicos, inorgánicos, o una combinación de restos orgánicos e inorgánicos.

35 Los restos bioquímicos pueden incluir al menos uno de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: aminoácidos, péptidos, polipéptidos, oligopéptidos, proteínas, enzimas, anticuerpos, y secuencias de ARN o ADN que codifican uno cualquiera de los mencionados anteriormente. En uso, el segundo grupo funcional se enlaza con, o se une a, o conjuga con, o se asocia con, el sitio diana.

40 El sitio diana específico puede ser una célula, que incluye al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: células cerebrales, células endoteliales de vasos sanguíneos, células de músculos lisos de vasos sanguíneos, células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y gamma ( $\gamma$ ).

La composición farmacéutica puede incluir además un vehículo farmacéutico para administración parenteral o no parenteral al sujeto.

45 La administración no parenteral puede incluir al menos una de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: administración oral, nasal, rectal, vaginal, óptica y transdérmica. Típicamente, la administración no parenteral puede ser oral.

50 La administración parenteral puede incluir al menos una de administración intravenosa, subcutánea e intramuscular. Típicamente, la administración parenteral puede ser intravenosa.

La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante de manera que, en uso, en el sitio diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

55 La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API). El ingrediente farmacéutico activo (API) puede incluirse para tratar y/o prevenir afecciones comórbidas tales como, pero sin limitarse a: inflamación y dolor.

60 El API puede ser al menos uno de, pero sin limitarse a, el siguiente grupo: enfuvirtida; octreotida; ciclosporina; insulina; glucagón; péptido-1 similar a glucagón (GLP-1); antibióticos que incluyen ciprofloxacina u otras fluoroquinolonas; antibióticos peptídicos tales como polimixina y colistina; sueroalbúmina bovina (BSA); felodipina, nimodipina; interferón beta; calcitonina de salmón; calcitonina de anguila; calcitonina de pollo; calcitonina de rata; calcitonina humana; calcitonina porcina, o cualquier variante génica de calcitonina; hormona paratiroidea; análogo de hormona paratiroidea PTH 1-31NH<sub>2</sub>; análogo de hormona paratiroidea PTH 1-34NH<sub>2</sub>; insulina de cualquier variante génica; vasopresina; desmopresina; buserelina; factor liberador de hormona luteinizante; eritropoyetina; activadores

del plasminógeno tisular; factor de crecimiento humano; adrenocorticotropina; diversas interleucinas; encefalina; etanercept; adalimumab; rituximab; infliximab; abatacept; trasztuzumab; feglimicina; heparina; así como otras vacunas conocidas.

5 El API también puede ser un analgésico tal como acetaminofeno o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Los AINE incluyen aspirina (Anacin, Ascriptin, Bayer, Bufferin, Ecotrin, Excedrin), salicilatos de colina y magnesio (CMT, Tricosal, Trilisate), salicilato de colina (Arthropan), celecoxib (Celebrex), diclofenaco potásico (Cataflam), diclofenaco sódico (Voltaren, Voltaren XR), diclofenaco sódico con misoprostol (Arthrotec), diflunisal (Dolobid), etodolaco (Lodine, Lodine XL), fenoprofeno cálcico (Nalfon), flurbiprofeno (Ansaid), ibuprofeno (Advil, Motrina, Motrina IB, Nuprin), indometacina (Indocin, Indocin SR), ketoprofeno (Actron, Orudis, Orudis KT, Oruvail), salicilato de magnesio (Arthritab, Bayer Select, Doan's Pills, Magan, Mobidin, Mobogesic), meclofenamato de sodio (Meclomen), ácido mefenámico (Ponstel), meloxicam (Mobic), nabumetona (Relafen), naproxeno (Naprosyn, Naprelan), naproxeno sódico (Aleve, Anaprox), oxaprozina (Daypro), piroxicam (Feldene), rofecoxib (Vioxx), salsalato (Amigesic, Anaflex 750, Disalcid, Marthritic, Mono-Gesic, Salflex, Salsitab), salicilato sódico (diversos genéricos), sulindaco (Clinoril), tolmetina sódica (Tolectin) y Valdecocixib (Bextra).

La composición farmacéutica puede comprender además un inhibidor de citocromo P450 3A4 (CYP3A4). El inhibidor del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) se puede seleccionar del grupo que consiste en polietilenglicol, poliamina, polimetacrilato de metilo, y derivados de los mismos, en el que el inhibidor está presente en una cantidad que es eficaz para inhibir sustancialmente el biofármaco y/o el API de ser metabolizado presistémicamente dando como resultado una mayor biodisponibilidad del biofármaco y/o API.

La composición farmacéutica puede comprender además un inhibidor de la bomba de eflujo de P-glicoproteína (P-gp).

En cierta realización, en la que la composición farmacéutica se formula para administración oral, la composición farmacéutica puede incluir además un revestimiento a su alrededor, preferiblemente un revestimiento entérico. El recubrimiento, en uso, evita la degradación del agente biofarmacéutico en el estómago.

El recubrimiento puede incluir el inhibidor del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) y/o el inhibidor de la bomba de eflujo de P-glicoproteína (P-gp).

El agente de transfección puede ser plásmido pCIneo-moLRP::FLAG.

Debe entenderse que se pueden usar otros agentes de transfección. Se entiende que FLAG es una etiqueta particular, y podría sustituirse por otras etiquetas si es necesario.

El anticuerpo específico anti-LRP/LR puede incluir igG1-iS18. Debe entenderse que igG1-iS18 está disponible comercialmente.

LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o comprende un fragmento del mismo como se expone en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas que tienen al menos un 80 % de homología con las secuencias como se exponen en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento de las mismas.

LRP/LR puede comprender homólogos o fragmentos de los mismos, y homólogos de los fragmentos, en los que LRP/LR puede comprender un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 1 puede ser una secuencia de péptido/proteína para LRP/LR humano y puede tener la siguiente secuencia:

```
MSGALDVLQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRRTWEKLLL
AARAIVAIENPADSVISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGTFTNQAAFREPR
LLVVTDPRADHQLPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR
EVLRMRGTTISREHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA
TQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAAQATEWVGATTDWS
```

SEQ ID NO: 2 puede ser una secuencia de péptido/proteína para LRP/LR de ratón (*Mus musculus*) y puede tener la siguiente secuencia:

MSGALDVLQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTEWELLL  
 AARAIVAIENPADSVISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGTFTNQIAAFREPR  
 LLVVTDPRADHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR  
 EVLRMRGTISREHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAA EKAVTKKEEFQGEWTAPAPEFTA  
 AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAQATEWVGATTEWS

5 Debe entenderse que LRP/LR está muy conservado, y los homólogos o fragmentos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y/u homólogos de los fragmentos, también se pueden utilizar para realizar la descripción descrita, ilustrada y/o ejemplificada aquí.

10 La secuencia de péptido/proteína de LRP/LR, o un homólogo o fragmento del mismo, o un homólogo del fragmento, se puede ligar a, o enlazar con, o unir a, o conjugar con, o asociar con una secuencia de proteína, secuencia de aminoácidos, péptido, proteína, o anticuerpo adicional.

15 Alternativa y/o adicionalmente, la secuencia de péptido/proteína de LRP/LR puede formar parte de una secuencia de péptido/proteína más grande y/o más larga. En una cierta realización de la invención, LRP/LR se puede ligar a, o enlazar con, o unir a, o conjugar con, o asociar con la proteína FLAG, tal como de manera que, en uso, la LRP/LR se puede etiquetar con FLAG. La proteína FLAG puede incluir una secuencia de péptido/proteína que incluye al menos un motivo de secuencia DYKDDDDK (SEQ ID NO: 3). El solicitante contempla emplear otras etiquetas.

20 El fragmento del listado de secuencias de péptidos/proteínas se expone en SEQ ID NO: 4, que corresponde a un fragmento de SEQ ID NO: 1 de 102 a 295, y/o en SEQ ID NO: 5, que corresponde a un fragmento de SEQ ID NO: 2 de 102 a 295.

SEQ ID NO: 4 puede ser una secuencia de péptido/proteína para un fragmento de LRP/LR humano, y puede tener la siguiente secuencia:

RFTPGTFTNQIAAFREPR  
 LLVVTDPRADHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR  
 EVLRMRGTISREHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAA EKAVTKKEEFQGEWTAPAPEFTA  
 TQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAQATEWVGATTDWS

25 SEQ ID NO: 5 puede ser una secuencia de péptido/proteína para un fragmento de LRP/LR de ratón, y puede tener la siguiente secuencia:

RFTPGTFTNQIAAFREPR  
 LLVVTDPRADHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAR  
 EVLRMRGTISREHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKKEEQAAA EKAVTKKEEFQGEWTAPAPEFTA  
 AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATEDWSAAPTAQATEWVGATTEWS.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN**

35 A continuación se describirán realizaciones de la descripción a título de ejemplo solamente y con referencia a los dibujos que se acompañan, en los que:

- Figura 1 muestra en el Ejemplo 1 la sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1;
- Figura 2 muestra en el Ejemplo 1 que la sobreexpresión de LRP::FLAG aumentó significativamente la actividad telomerasa en células THP-1 tanto tratadas con oxLDL como no tratadas;
- 40 Figura 3 muestra en el Ejemplo 1 que la sobreexpresión de LRP::FLAG aumenta la viabilidad celular en células THP-1 tratadas con oxLDL;
- 45 Figura 4 muestra en el Ejemplo 1 el ADN extraído que se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar los efectos de la sobreexpresión de LRP::FLAG sobre la fragmentación del ADN;

- Figura 5 muestra en el Ejemplo 1 que la sobreexpresión de LRP::FLAG disminuyó significativamente la captación de lípidos oxLDL por las células THP-1;
- 5 Figura 6 muestra en el Ejemplo 2 la sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1 usando transferencia Western;
- Figura 7 muestra en el Ejemplo 2 que la sobreexpresión de LRP::FLAG aumentó significativamente la actividad telomerasa en células THP-1 que imitan el estado diabético;
- 10 Figura 8 muestra en el Ejemplo 2 que la sobreexpresión de LRP::FLAG disminuyó significativamente el contenido de lípidos en células THP-1 que imitan el estado diabético de tipo II; y
- Figura 9 muestra en el Ejemplo 2 que la sobreexpresión de LRP::FLAG indujo un aumento en la captación de glucosa en células THP-1 que imitan el estado diabético.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

El contenido del Sumario anterior se repite completamente aquí a modo de referencia y para evitar la repetición innecesaria. Sin embargo, se proporcionan aquí aspectos no limitativos de la descripción para incluir un agente biofarmacéutico que incluye un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes, en el que LRP/LR, y/o el fragmento del mismo, son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita, y en el que la célula diana es al menos una del siguiente grupo: células endoteliales de los vasos sanguíneos, células de los músculos lisos de los vasos sanguíneos, células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y células gamma ( $\gamma$ ). En uso, el agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en la célula diana.

Un ejemplo de un aspecto incluye un agente biofarmacéutico que incluye un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis, en el que LRP/LR, y/o el fragmento del mismo, son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita, y en el que la célula diana es al menos una del siguiente grupo: células endoteliales de vasos sanguíneos y células de músculos lisos de vasos sanguíneos. En uso, el agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en la célula diana.

35 Otro ejemplo de un aspecto incluye un agente biofarmacéutico que incluye un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes, en el que LRP/LR, y/o el fragmento del mismo, son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita, y en el que la célula diana es al menos uno del siguiente grupo: células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y células gamma ( $\gamma$ ). En uso, el agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en la célula diana.

LRP/LR está encapsulado típicamente en un medio de administración que comprende nanopartículas, estando preferiblemente las nanopartículas funcionalizadas con restos químicos, bioquímicos o biológicos para asegurar la administración específica del sitio a la célula diana, en el que los restos actúan como ligandos para asegurar el suministro específico del sitio en la célula diana. El medio de administración se puede formular en una composición farmacéutica, la cual incluye un vehículo farmacéutico para la administración parenteral o no parenteral al sujeto.

La composición farmacéutica puede incluir además un ingrediente farmacéutico activo (API). El API puede tratar aterosclerosis y/u obesidad y/o resistencia a insulina y/o diabetes, y/o afecciones comórbidas de las mismas.

La composición farmacéutica puede incluir además un antioxidante de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.

LRP/LR típicamente comprende un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, o comprende un fragmento del mismo como se expone en la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5.

La LRP/LR puede formar parte de un agente de transfección para expresar un precursor de receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, preferiblemente el agente de transfección es plásmido pCIneo-moLRP::FLAG. En otras palabras, se puede usar un agente de transfección para regular positivamente LRP/LR.

Las nanopartículas son típicamente nanopartículas poliméricas y biodegradables para proporcionar, en uso, un riesgo reducido de una respuesta inmunogénica a dichas nanopartículas poliméricas, y además en las que las nanopartículas poliméricas son biocompatibles para mitigar el riesgo de cualquier respuesta inmunogénica a dichas nanopartículas poliméricas, y además en las que dichas nanopartículas poliméricas son uno o más seleccionados del siguiente grupo: eudragit, goma arábica, carragenina, celulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC),

5 hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), quitina, pectina, amilopectina, caucho natural, polietileno, polipropileno, poliestireno, poliamida, poliacrilonitrilo, cloruro de polivinilo, alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno (PEG), poli(D-lactida) (PDLA), ácido poliláctico (PLLA), poligalacturonato, metilcelulosa (poliacetales), poli(ε-caprolactona), fosfolípidos, polisacáridos, polisacáridos polianiónicos, carboximetilcelulosa, carboximetilamilosa, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, heparina, sulfato de heparina, poli(metilacrilato de hidroxietilo), colágeno, fibrinógeno, albúmina, fibrina, acrilamida, copolímeros a base de hidroxipropilmetacrilamida, poli(acrilamida, poli(N-isopropilacrilamida) (pNIPAAm), polivinilpirrolidona, poli(ácido metacrílico-g-etilenglicol), poli(N-2-hidroxipropilmetacrilamida), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), quitosano, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (HEMA), polifazeno, fosforilcolina, ácido hialurónico (HA), metacrilato de hidroxietilo (HEMA), metilen-bis-acrilamida (MBAAm), poli(ácido acrílico) (PAAc), poli(acrilamida (PAAm), poli(acrilonitrilo) (PAN), óxido de polibuteno (PBO), policaprolactona (PCL), polietilenimina (PEI), poli(metacrilato de etilo) (PEMA), fumarato de propileno (PF), poli(metacrilato de glucosiletilo) (PGEMA), poli(hidroxibutirato) (PHB), poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), poli(hidroxipropilmetacrilamida) (PHPMA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(N-vinilpirrolidona) (PNVP), óxido de polipropileno (PPO), poli(acetato de vinilo) (PVAc), poli(vinilamina), sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, polilisina, gelatina, carboximetilquitina, dextrano, agarosa, pululano, poliésteres, PEG-PLA-PEG, PEG-PLGA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLA-PEG-PLA, poli(PF-co-EG), poli(tereftalato de PEG/PBO), PEG-bis-(acrilato de PLA), PEG6CD, PEG-g-poli(AAm-co-vinilamina), poli(NIPAAm-co-AAc), poli(NIPAAm-co-EMA), PNVP, poli(MMA-co-HEMA), poli(AN-co-sulfonato de alilo), poli(biscarboxi-fenoxi-fosfaceno), poli(sulfato de GEMA), poli(PEG-co-péptidos), alginato-g-(PEO-PPO-PEO), poli(PLGA-co-serina), acrilato de colágeno, alginato, acrilato de alginato, poli(HPMA-g-péptido), HA-g-NIPAAm, y poli(vinil metil éter) (PVME), y/o derivados de uno cualquiera o más de los mencionados anteriormente.

25 Típicamente, el medio de administración se formula para su administración oral, e incluye al menos parcialmente a su alrededor un revestimiento que incluye un inhibidor de citocromo P450 3A4 (CYP3A4) seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, poliamina, polimetacrilato de metilo y derivados de los mismos, y en el que el revestimiento incluye además un inhibidor de la bomba de eflujo de P-glucoproteína (P-gp).

30 El agente de transfección y/o el LRP/LR y/o el fragmento de LRP/LR sustancialmente como se describen aquí son todos ellos ejemplos de agentes biofarmacéuticos empleados como parte de esta descripción. Debe entenderse que LRP/LR está muy conservado, y también pueden utilizarse homólogos o fragmentos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y/u homólogos de los fragmentos, a fin de realizar la descripción descrita, ilustrada y/o ejemplificada aquí.

35 También se pueden emplear secuencias sustancialmente idénticas. Como se usa aquí, una secuencia sustancialmente idéntica es una secuencia de aminoácidos o nucleótida que difiere de una secuencia de referencia sólo en una o más sustituciones conservativas, o en una o más sustituciones, deleciones o inserciones no conservativas ubicadas en posiciones de la secuencia que no destruyen o reducen sustancialmente la actividad de uno o más de los polipéptidos expresados o de los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico.

40 En los ejemplos a continuación, el agente de transfección es el plásmido pCIneo-moLRP::FLAG. Debe entenderse que se contempla por el solicitante otro agente de transfección para su uso en el aumento de la expresión de LRP/LR en las células diana. Realizaciones ejemplares detalladas de la descripción, que no limitan el alcance de la descripción, se proporcionan aquí a continuación como Ejemplos 1 y 2.

## 45 EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - aterosclerosis

#### Materiales y métodos

50 Cultivo celular para células THP-1 (monocitos leucémicos humanos)

Para todos los procedimientos experimentales llevados a cabo, se usó la línea celular de monocitos humanos (THP-1). Esta línea celular se escogió por su capacidad para captar fácilmente oxLDL (lipoproteína de baja densidad oxidada) y convertirse en células espumosas, que es el componente principal de las placas ateroscleróticas. Se usó medio RPMI con 15 % de suero fetal bovino (FBS), 1 % de aminoácidos no esenciales MEM, para proporcionar los nutrientes esenciales para cultivar tanto células THP-1 no transfectadas como transfectadas. Además, se usó 2 % de penicilina/estreptomicina en un intento por prevenir la contaminación bacteriana. Las células THP-1 crecen tanto adherentemente como en suspensión, y por lo tanto requieren medios extra para crecer; por lo tanto, estas células se cultivaron en un matraz de 5 ml usando 15 ml de medios. Las células se almacenaron en una incubadora preestablecida a 37 °C con CO<sub>2</sub> a 5 %, con el fin de imitar las condiciones *in vivo* presentes en el cuerpo humano. Los cambios en medio se realizaron de dos a tres veces a la semana. Adicionalmente, cuando los matraces alcanzaron una confluencia de aproximadamente 70-80 %, se realizó una división 1:10.

65 Para los cambios de medio y las pasadas celulares, los matraces se rasparon suavemente usando un raspador de células, y el medio se colocó en tubos de centrifuga y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm. El medio antiguo se desechó, y el pelete se resuspendió en 2 ml de disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (D-PBS),

con el fin de eliminar los desechos, y se centrifugó a 4000 rpm durante otros 10 minutos. El pelete se resuspendió después en 1 ml de medio, y si la confluencia estaba por debajo de 70 %, el 1 ml completo se puso de nuevo en el matraz. En matraces confluentes, las células se dividieron en una relación de 1:10. El resto de las células se peletizaron y resuspendieron en 90 % de FBS con 10 % de DMSO, y se congelaron a -80 °C como disoluciones madre.

#### Sobreexpresión de LRP::FLAG y tratamiento de células THP-1

Con el fin de sobreexpresar LRP::FLAG, las células THP-1 se transfectaron con el plásmido pCIneo-moLRP::FLAG usando el kit y el protocolo de transfección Xfect. Para la transfección, se escogieron matraces que estaban a aproximadamente 70 % de confluencia. Brevemente, se añadió amortiguador de reacción Xfect a 5 µg del plásmido pCIneo-moLRP::FLAG con el fin de preparar 100 µl de muestra. Después, se añadieron 1,5 µl de polímero Xfect a la mezcla, y los reactivos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que se formaran los complejos de nanopartículas. La mezcla de reacción se añadió entonces gota a gota al matraz. Las células se trataron con 10 µl de geneticina (50 mg/ml) una vez cada 3 semanas con el fin de promover la transcripción del plásmido y asegurar que se había producido la transfección.

Para inducir la formación de placas ateroscleróticas, las células THP-1 se trataron con oxLDL (Bio-Rad). En resumen, las células no transfectadas y transfectadas se sembraron en placas de 6, 48 o 96 pocillos, y se dejaron recuperar y crecer durante 24-48 horas. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 70-80 %, se añadió un tratamiento que consistía en 50 µg/µl de oxLDL a cada pocillo de las placas respectivas, y las células se incubaron durante 48 horas. Después, las células de cada pocillo se recogieron como peletes, o se realizaron experimentos en los pocillos. Para cada experimento, se usaron los siguientes tratamientos: no transfectadas no tratadas, transfectadas no tratadas, no transfectadas tratadas, y transfectadas tratadas.

#### Ensayo de proteínas Bicinchoninic acid™ (BCA)

El ensayo BCA se realizó para obtener la concentración de proteína extraída de cada tratamiento celular y asegurar una carga igual para la transferencia Western. Para esta técnica, las células de los matraces que eran aproximadamente 70 % confluentes se rasparon y centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. Los peletes se resuspendieron entonces en amortiguador de lisis RIPA (que consistía en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, mezclado con NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, y 0,1 % de SDS). El SDS en el amortiguador linealiza las proteínas extraídas y proporciona una carga negativa proporcional a la masa molecular de la proteína. A continuación, se cargaron 5 µl de cada lisado, junto con 20 µl de agua destilada, en una placa de 96 pocillos. Adicionalmente, se cargaron 25 µl de un conjunto de patrones (0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml y 1 mg/ml), constituidos por diluciones en serie (1:10) de sueroalbúmina bovina (BSA). Esto se hizo para construir una curva patrón, que se utilizó para determinar la concentración de proteína de los lisados desconocidos. Después, se añadieron a cada pocillo 200 µl de una mezcla de ácido bicinonínico y sulfato de cobre (930 µl: 30 µl), y la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Esto permitió que los enlaces peptídicos redujeran el Cu<sup>2+</sup> hasta Cu<sup>+</sup> con el fin de producir un cambio de color proporcional a la cantidad de proteína presente. Se usó el lector de placas Sunrise Teccan ELISA para medir el cambio de color a 562 nm, y la concentración de las muestras se obtuvo a partir de la curva patrón.

#### Transferencia Western y SDS-PAGE

Se usa SDS PAGE y transferencia Western para la detección inmunológica y cuantificación de proteínas. Es una técnica bien establecida que es simple de usar y es particularmente útil en este estudio ya que permite la detección de LRP::FLAG para confirmar la transfección. Además, es útil para detectar cambios en los marcadores de CVD en células que sobreexpresan LRP::FLAG, y por esta razón se escogió por encima de otras técnicas de detección de proteínas. Los inconvenientes de esta técnica incluyen el potencial de unión no específica de anticuerpos, la longitud del procedimiento, y que puede verse afectada por contaminantes. La técnica hace uso de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), seguido de transferencia sobre una membrana de PVDF y detección con un complejo de anticuerpo específico que se dirige contra la proteína de interés. El LRP::FLAG y el control de carga de β-actina, que se extrajo de las células THP-1, se diluyeron hasta una concentración final de 100 µl/ml. Esto permitió una separación igual y precisa de la proteína durante la SDS-PAGE.

#### SDS-PAGE

Se realizó SDS-PAGE con el fin de linealizar y separar las diferentes proteínas basándose en su masa molecular. El SDS del amortiguador RIPA se une proporcionalmente al tamaño de las proteínas, dándoles una relación de carga a masa igual y permitiendo que se separen únicamente basándose en su tamaño molecular. Esto permite la detección precisa de proteínas con pesos moleculares conocidos usando un marcador de peso molecular. Se preparó un gel de poliacrilamida al 10 % en dos partes. En primer lugar, el gel de separación se obtuvo mezclando 4,8 ml de agua destilada, 2,5 ml de acrilamida al 40 %, 2,5 ml de amortiguador de separación (187 g de base Tris, pH 8,8, y SDS al 0,4 % en 1 litro de agua destilada), 100 µl de SDS al 10 %, y 100 µl de APS al 3 %, y 5 µl de TEMED. Esto se añadió después a las placas y se dejó polimerizar. Después, el gel de apilamiento se preparó añadiendo 3,65 ml de agua destilada a 625 µl de acrilamida al 40 %, 625 µl de amortiguador de apilamiento (60,5 g de base Tris, pH 6,8, y SDS

al 4 % en 1 litro de agua destilada), 50 µl de SDS al 10 %, y 50 µl de APS y 5 µl de TEMED. Esto se añadió en la parte superior del gel de separación, se insertó un peine, y se dejó polimerizar el gel. El gel de apilamiento permitió que las proteínas se acumularan en una única banda en el fondo del pocillo, mientras que el gel de separación permitió la separación de las diferentes proteínas como bandas individuales a lo largo del gel. El lisado de la extracción se mezcló después con colorante de carga, y las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 minutos, para permitir que el colorante se intercalara con las proteínas. Después, se cargaron 5 µl de cada muestra y un marcador de peso molecular en los pocillos. Las proteínas se separaron a 120 V en amortiguador de pasada hasta que el frente de colorante estaba aproximadamente a 1 cm del fondo del gel (aproximadamente 45 minutos).

10 Transferencia Western

Después de separar las proteínas, se transfirieron a una membrana de PVDF, en la que se pudieron incubar con los anticuerpos apropiados (tabla 5.4.1). En primer lugar, la membrana se colocó en metanol (para activar) y después, junto con papel secante, se colocó en amortiguador de transferencia (para equilibrar). Después, la membrana, con el gel colocado en la parte superior, se colocó entre el papel secante, que se colocó en el aparato secante de transferencia semiseca, y se realizó la electrotransferencia a 120 V durante 45 minutos. Una vez completada la transferencia, la membrana de PVDF se bloqueó con 10 ml de BSA al 3 %, para evitar la unión de anticuerpos no específicos. La membrana se incubó entonces con el anticuerpo primario apropiado (tabla 5.4.1) a 4 °C durante la noche. Después, se realizaron cinco lavados con PBS-tween durante 5 minutos cada uno. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario apropiado, si es aplicable (tabla 5.4.1), y durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se hicieron otros cinco lavados. A continuación, la membrana se incubó con 4 ml de sustrato Clearance Western ECL (Bio-Rad) en la oscuridad durante 1 minuto, y después se visualizó con el sistema de formación de imágenes ChemiDock (Bio-Rad) en el que se tomaron las imágenes. El análisis densitométrico permite la cuantificación de los niveles de proteína. Sin embargo, la administración tardía del tratamiento con oxLDL, junto con la contaminación constante, dio como resultado una cantidad de tiempo insuficiente para realizar el análisis densométrico y cuantificar la proteína extraída.

Tabla 5.4.1: Una lista de los anticuerpos primarios y secundarios usados en el protocolo de transferencia Western.

Proteína diana	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Factor de dilución para ambos anticuerpos.
LRP::FLAG	Anti-FLAG murino (Sigma-Aldrich®)	Anti-IgG murina-HRP (Sigma-Aldrich®)	1:4000
p-actina	Anti-β-actina-peroxidasa murino (Sigma-Aldrich®)	Ninguno de ellos es ninguno	1:10000

30 Detección de la actividad telomerasa

Los telómeros acortados son un sello distintivo de la CVD, y están provocados en gran medida debido a la actividad disminuida de la enzima telomerasa. Se usó qPCR para evaluar el efecto de la sobreexpresión de LRP::FLAG sobre la actividad de telomerasa en las células tratadas diferencialmente. Se usó el kit de detección de telomerasa de TRAPEze RT® (Merck Millipore™) para extraer telomerasa activa y permitir el alargamiento del sustrato telomérico con el fin de proporcionar una indicación relativa de la actividad telomerasa. Esta técnica es muy precisa para determinar la actividad telomerasa, ya que extiende los sustratos con respecto a la cantidad de proteína disponible, y por esta razón se escogió la técnica. Las células se sembraron inicialmente en placas de 6 pocillos y se trataron con oxLDL. Después de 48 horas, los pocillos se peletizaron y se resuspendieron en 200 µl de amortiguador de lisis Chaps. La muestra se incubó entonces durante 30 minutos a 4 °C con el fin de extraer la proteína. Después, la muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, y la concentración de proteína se determinó usando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Las muestras de proteína se diluyeron después hasta 500 ng/µl, y se incubaron 30 µl de muestras de proteína durante 20 minutos a 100 °C con el fin de proporcionar un control negativo tratado térmicamente en el que la telomerasa se desactiva. Una mezcla de control y reacción se obtuvo usando agua de grado PCR, Taq polimerasa y mezcla de control o reacción. En una placa de 96 pocillos, la mezcla de control se añadió a las muestras tratadas térmicamente y al control negativo de chaps, mientras que la mezcla de reacción se añadió a todas las muestras de proteína, los patrones y el control positivo. La placa se cubrió después con un cubreobjetos, y se colocó en la máquina de qPCR Arya. Se usaron los siguientes parámetros: una etapa de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C, después 45 ciclos de amplificación, consistiendo cada uno en: 10 segundos para la desnaturalización a 95 °C, 10 segundos para la hibridación a 58 °C, y 60 segundos para el alargamiento a 72 °C. Los datos se normalizaron a la curva estándar y se analizaron usando la prueba de la t de student.

55 Recuento celular

Se requiere determinar el número de células para sembrar una cantidad igual de células para ensayos, tales como el ensayo MTT y tinción de Oil Red, para obtener datos precisos. Se usó un hemocitómetro para determinar la cantidad de células necesarias para la siembra. Brevemente, las células se rasparon, y se mezclaron 10 µl de suspensión

celular con 10 µl de azul de tripano filtrado. Después, las células se contaron con un hemocitómetro, y la concentración celular se determinó usando la ecuación:

$$\text{Concentración celular} \left( \frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \text{células por 16 cuadradas} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

La concentración celular se usó después para sembrar una concentración igual de células en cada pocillo de las placas usadas para asegurar que los datos obtenidos son precisos.

Detección de cambios en la viabilidad celular en células que sobreexpresan LRP::FLAG

El ensayo de viabilidad celular de MTT es una técnica bien establecida que se usa para determinar la viabilidad celular. Este ensayo hace uso de MTT, (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), un producto químico que se convierte en formazán insoluble en las mitocondrias de las células vivas (van Meerloo et al., 2011). Las células tratadas con oxLDL experimentan apoptosis a medida que se convierten en células espumosas (Wintergerst et al., 2000); de este modo, la detección de la viabilidad celular puede determinar si la sobreexpresión de LRP::FLAG rescata las células de la apoptosis. Para este ensayo, se sembraron 8000 células en una placa de 48 pocillos, se trataron con 50 µg/µl de oxLDL, y se incubaron durante 48 horas. Después, se disolvieron 7 mg de MTT (Duchefa Biochemie) en 1,5 ml de PBS, y después se esterilizaron por filtración. A continuación, se añadieron 100 µl de la disolución de MTT 0,5 mg/ml a cada pocillo, y la placa se incubó a 37 °C durante aproximadamente 3 horas. Finalmente, los cristales de formazán que se formaron se disolvieron en 250 µl de DMSO, y los cambios de color se detectaron a 590 nm usando el lector de placas Sunrise Teccan ELISA. Los datos obtenidos se analizaron usando la prueba de la *t* de Student, y después se representaron gráficamente en un histograma.

Evaluación del contenido de lípidos en células que sobreexpresan LRP::FLAG

En las células tratadas, la captación de oxLDL da como resultado un aumento en el contenido de lípidos en las células debido al resto lipídico de la lipoproteína (Grahame y Schlesinger, 2012). Adicionalmente, oxLDL promueve la captación de colesterol y triacilglicerol en las células (Batt et al., 2004). Por lo tanto, la evaluación del contenido de lípidos en las células proporciona una posible visión sobre cómo la sobreexpresión de LRP::FLAG afecta a la captación de oxLDL, y subsiguientemente a la formación de placas ateroscleróticas. El kit de tinción de lípidos Oil Red O de Sigma-Aldrich® tiñe los lípidos en las células, permitiendo una medida cuantitativa de oxLDL presente en las células. Esta técnica es una técnica rápida y sencilla que puede determinar con precisión el contenido de lípidos. Además, la tinción se extrajo con el fin de cuantificar la cantidad de lípido presente, dando una indicación más precisa de los efectos de la sobreexpresión de LRP::FLAG. El inconveniente de esta técnica es que el gran número de lavados requeridos puede eliminar algunas de las células, dando como resultado datos sesgados. Esta técnica se escogió por encima de otras ya que proporciona datos tanto cualitativos como cuantitativos. Una vez que se obtuvo el número de células usando un hemocitómetro, se sembraron 16000 células transfectadas y no transfectadas en una placa de 96 pocillos, tratándose los pocillos apropiados con oxLDL e incubándose durante 48 horas. Después, las células se lavaron con 100 µl de PBS dos veces, y después se incubaron con formalina al 10 % a temperatura ambiente durante 45 minutos para fijarlas. Después del periodo de incubación, las células se lavaron dos veces con agua destilada, seguido de 5 minutos de incubación con isopropanol al 60 %. A continuación, se preparó una disolución de Oil Red de trabajo de 3 partes de disolución madre y 2 partes de agua destilada, y se añadieron 200 µl a cada pocillo, y se incubaron durante 15 minutos. Las células se lavaron 3 veces con agua, y se tomaron imágenes con un microscopio óptico invertido. Adicionalmente, la tinción se extrajo usando isopropanol al 100 %, y se cuantificó a 490 nm con el fin de determinar con precisión los cambios en el contenido de lípidos. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de la *t* de Student, y se representa en un histograma.

Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos durante la experimentación se sometieron a análisis estadístico crítico, usando Microsoft Excel 2010, para asegurar que los datos eran relevantes y significativos. Además, cada experimento se realizó al menos por triplicado para asegurar la precisión de los datos, así como para calcular la desviación estándar. Se usó la prueba de la *t* de student de dos colas para el análisis a un intervalo de confianza del 95 %. Los valores en los que \**p*<0,05 se consideraron estadísticamente significativos, mientras que los valores en los que \*\**p*<0,01 y \*\*\**p*<0,001 se consideraron altamente significativos.

## RESULTADOS

Confirmación de la sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1 transfectadas.

Para determinar si LRP/LR tiene un papel potencial en CVD, se transfectaron establemente células THP-1 usando el plásmido pCIneo-moLRP::FLAG con el fin de sobreexpresar LRP::FLAG en las células THP-1. Después de la transfección, se realizó transferencia Western con el fin de confirmar la sobreexpresión de LRP::FLAG (Figura 1). β-actina (control de carga) estaba presente tanto en células THP-1 transfectadas como no transfectadas (carriles 1-8), mientras que LRP::FLAG estaba presente sólo en las células transfectadas (carriles 5-8), lo que indica que la

transfección fue exitosa y que LRP::FLAG estaba sobreexpresada. La sobreexpresión de LRP::FLAG por el plásmido pCIneo-LRP::FLAG se evaluó en células THP-1 transfectadas (carriles 1-4) y no transfectadas (carriles 5-8). LRP::FLAG se detectó usando el anticuerpo primario murino anti-FLAG y el anticuerpo secundario murino anti-IgG-HRP, mientras que la  $\beta$ -actina se detectó usando el anticuerpo murino anti-actina-peroxidasa.

5 La sobreexpresión de LRP::FLAG aumenta significativamente la actividad telomerasa en células THP-1 transfectadas tratadas con oxLDL

10 Un factor clave en la CVD es los telómeros críticamente acortados, que se produce debido al impedimento de la actividad telomerasa por altos niveles de estrés oxidativo. Para determinar si la sobreexpresión de LRP::FLAG afectaba posteriormente a la actividad telomerasa, se realizó qPCR en células THP-1 transfectadas y no transfectadas que se trataron con oxLDL. Se observó una disminución significativa de 57,43 % en la actividad telomerasa en células tratadas no transfectadas, con respecto a células THP-1 no transfectadas no tratadas. Además, se observó un aumento de 272,72 % y 283,47 % en la actividad telomerasa en las células transfectadas no tratadas y tratadas respectivamente cuando se comparó con las células THP-1 no transfectadas y no tratadas (Figura 2).

15 El gráfico representa los cambios en la actividad telomerasa relativa después de la sobreexpresión de LRP::FLAG. Los datos se normalizaron para representar el gráfico. Se encontró una disminución significativa de 57,43 % en la actividad telomerasa en células no transfectadas (azul) cuando se trataron con oxLDL (\*\* $p < 0,01$ ), mientras que la actividad telomerasa aumentó significativamente en células que sobreexpresan LRP::FLAG (rojo) independientemente del tratamiento con oxLDL (\*\* $p < 0,01$ ). La transfección de células aumentó significativamente la actividad telomerasa en 3,8 veces, lo que indica que LRP::FLAG puede desempeñar un papel en el mantenimiento de la actividad telomerasa en un entorno de CVD.

20 La sobreexpresión de LRP::FLAG aumenta significativamente la viabilidad celular en células THP-1 tratadas con oxLDL

25 Una de las características distintivas de la captación de oxLDL en las células es la inducción de apoptosis, y por lo tanto la viabilidad celular disminuida. Las células se trataron con oxLDL con el fin de imitar un entorno aterosclerótico y estudiar el efecto que la sobreexpresión de LRP::FLAG tiene en CVD. Con el fin de evaluar el efecto que tiene la sobreexpresión de LRP::FLAG sobre la viabilidad celular, se realizó el ensayo de viabilidad celular de MTT usando células THP-1 tanto transfectadas como no transfectadas. Se encontró una disminución significativa de 45,53 % en la viabilidad celular entre las células THP-1 no transfectadas no tratadas y tratadas con oxLDL. Cuando las células se transfectaron, la viabilidad celular permaneció al nivel aproximadamente normal (no transfectadas no tratadas) independientemente del tratamiento (Figura 3). El gráfico representa el cambio en la viabilidad celular cuando las células se tratan y/o transfectan. Las células no transfectadas (azul) tratadas con oxLDL muestran una disminución significativa de 1,8 veces en la viabilidad celular (\*\* $p < 0,001$ ). No se observó una disminución significativa en la viabilidad celular después del tratamiento con oxLDL cuando las células se transfectaron (rojo), lo que indica que LRP::FLAG rescata las células de la citotoxicidad inducida por oxLDL.

El efecto de la sobreexpresión de LRP::FLAG sobre la fragmentación de ADN

30 La formación de placas ateroscleróticas ocurre cuando los monocitos se convierten en células espumosas a través de apoptosis. Durante la apoptosis, el ADN se fragmenta, y el ADN fragmentado da como resultado un frotis cuando se resuelve por electroforesis en gel de agarosa. Por lo tanto, se usó la detección de cambios en la fragmentación del ADN a través de electroforesis en gel de agarosa para evaluar el papel que desempeña la sobreexpresión de LRP::FLAG en la fragmentación del ADN. Sin embargo, el ADN permaneció atrapado dentro de los pocillos del gel (Figura 4). Se esperaba una reducción en la tinción de las células tratadas transfectadas cuando se comparaban con las células tratadas no transfectadas; sin embargo, debido a limitaciones de tiempo, este experimento no pudo repetirse.

35 Los ADN extraídos de las no transfectadas no tratadas (carriles 2-4), no transfectadas tratadas con oxLDL (carriles 5-7), transfectadas no tratadas (carriles 8-10), y transfectadas tratadas con oxLDL (carriles 11-13) se atraparon en los pocillos. Esto puede haber ocurrido debido a que los fragmentos de ADN genómico son demasiado grandes para el gel, dando como resultado que el ADN permanezca en los pocillos. El uso de una enzima de restricción puede haber resuelto este problema. Además, esta técnica tiene una baja sensibilidad, por lo que cualquier fragmento que saliera del pocillo puede no haber sido detectado debido a la baja concentración de ADN extraído.

40 La sobreexpresión de LRP::FLAG reduce significativamente el contenido de lípidos en células THP-1 tratadas con oxLDL

45 La formación de placas ateroscleróticas requiere monocitos para captar oxLDL, lo que da como resultado un contenido de lípidos celulares aumentado. Este sello distintivo se investigó, usando el ensayo de tinción de lípidos Oil Red, para evaluar si la sobreexpresión de LRP::FLAG desempeña o no un papel en la formación de placas ateroscleróticas. El ensayo mostró que el tratamiento con oxLDL dio como resultado un aumento en el contenido de

lípidos (tinción roja) en las células no transfectadas en comparación con las células no transfectadas no tratadas (Figura 5 A a-b). Además, la transfección dio como resultado un contenido de lípidos disminuido tanto en células THP-1 tratadas con oxLDL como en células sin tratamiento, en comparación con las células no transfectadas y no tratadas (Figura 5 A a, c y d). Además, la cuantificación de las manchas mostró un aumento significativo en el contenido de lípidos entre células de THP-1 no transfectadas no tratadas y tratadas. Se observó una disminución significativa en el contenido de lípidos entre las células no transfectadas tratadas y transfectadas tratadas, mientras que las células transfectadas no tratadas volvieron al nivel de lípidos normal (células THP-1 no transfectadas no tratadas) (Figura 5 B).

El panel A muestra cualitativamente las diferencias observadas cuando las células THP-1 se trataron y/o transfectaron. Las imágenes escogidas son representativas de las manchas presentes en los 6 pocillos. Las imágenes muestran un aumento en la tinción roja en células no transfectadas que se tratan con oxLDL (b) en comparación con células no transfectadas y no tratadas (a). Las células que se transfectan muestran una disminución en la tinción de Oil Red independientemente del tratamiento (c y d). El panel B muestra una representación cuantitativa de las células teñidas. Las células no transfectadas (azul) tratadas con oxLDL tenían un aumento significativo en la concentración de lípido de oxLDL dentro de las células (\*\* $p < 0,01$ ). La transfección dio como resultado una disminución significativa (\*\* $p < 0,01$ ) en el contenido de lípidos en las células, devolviendo la concentración al nivel de células no transfectadas y no tratadas (rojo).

## Discusión

Se sabe que la longitud de los telómeros se reduce significativamente en monocitos propensos a la captación de oxLDL, y se ha demostrado que estos monocitos tienen una reducción en la telomerasa (Fitzpatrick et al., 2007). También se ha demostrado que la actividad telomerasa está aumentada, con un incremento posterior en la longitud de los telómeros, una vez que se han formado placas pero sin efecto observable en las placas (Huzen et al., 2011). Por consiguiente, no se espera que un aumento de LRP/LR tenga ningún efecto sobre las placas. Por lo tanto, es sorprendente e inesperado que el aumento de la actividad telomerasa mediante el uso de LRP::FLAG provoque una reducción en la formación de placas ateroscleróticas y rescate células de la apoptosis inducida por oxLDL.

## Sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1

Se usaron células de monocitos leucémicos humanos (THP-1) por su capacidad para captar fácilmente oxLDL y convertirse en células espumosas. Para evaluar la función de LRP::FLAG en estas células, se transfectaron usando el constructo pCIneo-moLRP::FLAG, y la transfección se confirmó mediante transferencia Western. La transferencia Western mostró que LRP::FLAG se expresaba en las células THP-1 transfectadas y no en las células no transfectadas (Figura 1).

## El efecto de LRP::FLAG sobre la actividad telomerasa

Tras la confirmación de la transfección, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de LRP::FLAG sobre la actividad telomerasa en un modelo de cultivo de células cardiovasculares (aterosclerótico).

La actividad telomerasa en monocitos es baja debido al hecho de que estas células tienen un bajo recambio (Demissie et al., 2006). Como resultado, los telómeros se dañan y erosionan cuando oxLDL es absorbido por estas células. Además, oxLDL disminuye la actividad telomerasa debido a la inducción de un estado oxidativo en las células, dando como resultado el reclutamiento de la subunidad hTERT a las mitocondrias (Cong et al., 2002). Esto evita que funcione en la enzima telomerasa que está situada en el núcleo. Se usó el análisis qPCR para evaluar cómo la sobreexpresión de LRP::FLAG influía en la actividad telomerasa. Los resultados confirmaron que la actividad telomerasa relativa aumentó en las células THP-1 transfectadas (Figura 2). De hecho, cuando las células THP-1 no transfectadas se trataron con oxLDL, se observó una reducción significativa en la actividad telomerasa relativa (Figura 2).

Estos estudios muestran que oxLDL disminuye la actividad telomerasa de una manera dependiente de la concentración. Sin estar limitados por la teoría, esto puede ser a través de la inactivación de PI3K/Akt por medio de la desfosforilación. Curiosamente, se demostró además que cuando las células THP-1 se transfectaron, la actividad telomerasa aumentó drásticamente independientemente del tratamiento. Sin estar limitados por la teoría, esto es debido probablemente a que LRP::FLAG induce un aumento en la expresión de hTERT. Puesto que hTERT es el factor limitante en la telomerasa, la concentración aumentada de hTERT puede haber sido responsable del aumento de la actividad telomerasa. Sin embargo, puesto que hTERT tiene efectos teloméricos adicionales, el aumento en su concentración probablemente no es la única causa del aumento de la actividad telomerasa (Cong et al., 2002).

Se encontró que el aumento en la actividad telomerasa era suficiente para revertir los efectos del tratamiento con oxLDL. Además, se observó que la actividad telomerasa aumentó 3,8 veces entre las células no transfectadas no tratadas y las células transfectadas tratadas (Figura 2), y fue evidente tanto en células THP-1 transfectadas no tratadas como tratadas. El aumento observado de la actividad telomerasa probablemente daría como resultado un aumento en la longitud de los telómeros, que contrarresta la longitud de los telómeros acortada observada asociada

con la aterosclerosis. Esto provoca una reducción en la formación de placas y/o reversión y/o prevención de la aterosclerosis.

#### El efecto de LRP::FLAG sobre la viabilidad celular

Con el fin de determinar los efectos del aumento de la actividad telomerasa en aterosclerosis, se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo de MTT. Las células THP-1 no transfectadas tratadas con oxLDL tenían una disminución significativa de 1,8 veces en la viabilidad celular (Figura 3). Esto es coherente con la bibliografía, que ha mostrado que oxLDL induce apoptosis por activación rápida de la ruta apoptótica de caspasa-3 (Wintergerst et al., 2000).

En las células transfectadas no tratadas, la viabilidad celular permaneció similar a la de las células no transfectadas no tratadas, indicando que la transfección no causa sobreproliferación. Esto es una indicación de que la sobreexpresión de LRP::FLAG no provoca que las células se vuelvan tumorigénicas, lo que es sorprendente. De manera similar, no hay un cambio significativo en la viabilidad celular entre las células no transfectadas no tratadas y las células transfectadas tratadas, lo que indica que la transfección rescata células de la apoptosis inducida por oxLDL. Puesto que los monocitos experimentan apoptosis para convertirse en células espumosas, su rescate de la apoptosis es esencial para prevenir la formación de placas ateroscleróticas. El aumento en la viabilidad celular se debe probablemente al aumento de la actividad telomerasa previamente mostrada, que causa el alargamiento de los telómeros.

Curiosamente, se detectó un ligero aumento en la viabilidad celular de las células transfectadas tratadas (Figura 3). Aunque insignificante, este aumento se debe probablemente a la sobreproliferación que induce oxLDL en las células. Sin estar limitados por la teoría, se muestra que la transfección aumenta la viabilidad celular en células tratadas con oxLDL probablemente rescatando células de la apoptosis inducida por oxLDL. Esto sugiere que LRP::FLAG tiene un papel en la prevención/reducción de los efectos de la aterosclerosis en un modelo de cultivo celular cardiovascular (particularmente un aterosclerótico).

#### El efecto de LRP::FLAG sobre el contenido de lípidos

Un sello distintivo de la aterosclerosis es el contenido de lípidos aumentado en las células. Esto ocurre cuando el contenido de lípidos de oxLDL es absorbido por las células, por el aumento de LOX-1 y ACAT1,2, aumentando el contenido de colesterol y triacilglicerol celular (Batt et al., 2004). Para confirmar adicionalmente que la sobreexpresión de LRP::FLAG y el incremento subsiguiente en la actividad telomerasa desempeñan un papel en la aterosclerosis o en la enfermedad cardiovascular, se evaluó el contenido de lípidos celulares.

Para evaluar esto, se usó la tinción de lípidos Oil Red para obtener una medida cualitativa así como cuantitativa del contenido de lípidos (Figura 5). Puesto que el contenido de lípidos aumenta en las placas ateroscleróticas, una disminución en el contenido de lípidos proporciona pruebas de que la transfección ayuda en la reversión y/o prevención de la formación de placas ateroscleróticas. Se encontró que el tratamiento con oxLDL causaba un contenido de lípidos aumentado en las células THP-1 no transfectadas. Esto corresponde con la bibliografía, que mostró que la captación de oxLDL provoca un aumento del contenido de lípidos debido al componente lipídico de oxLDL, así como la posterior captación de lípidos que provoca (Batt et al., 2004). Las células transfectadas, cuando se trataron con oxLDL, mostraron una reducción en el contenido de lípidos que fue significativamente menor (11 %) que las células tratadas no transfectadas. Una posible razón para esto es que LRP::FLAG puede desempeñar un papel en el aumento del metabolismo de lípidos en las células.

#### Conclusión

En conclusión, se demostró que la sobreexpresión de LRP::FLAG aumentó la actividad telomerasa en un modelo de cultivo de células ateroscleróticas THP-1. Adicionalmente, la sobreexpresión de LRP::FLAG aumentó la viabilidad de las células que se trataron con oxLDL. Además, se demostró que la transfección rescata las células tratadas con oxLDL del aumento del contenido de lípidos que se observa característicamente en las placas ateroscleróticas. El ensayo de tinción con Oil Red reveló que la sobreexpresión de LRP::FLAG en células tratadas con o sin oxLDL provocó una disminución significativa en el contenido de lípidos celulares, que normalmente aumenta en aterosclerosis. Estos hallazgos muestran que LRP/LR probablemente desempeña un papel en la aterosclerosis, y la sobreexpresión de LRP::FLAG puede ofrecer un tratamiento terapéutico novedoso potencial para reducir o impedir la formación de placas ateroscleróticas.

Se ha demostrado que el aumento de la longitud de los telómeros después de la formación de placas no tiene efecto sobre las propias placas. Por consiguiente, no se esperaba que el aumento de LRP/LR tuviera ningún efecto sobre las placas y/o su formación. Por lo tanto, es inesperado y sorprendente que el aumento de la actividad telomerasa proporcionando LRP/LR a una célula y/o el aumento de LRP/LR provoque una disminución en el contenido de lípidos y/o rescate células de la apoptosis inducida por oxLDL.

## REFERENCIAS

- AUBERT, G. y LANSDORP, P. M. 2008. Telomeres and aging. *Physiological reviews*, 88, 557-579. BENTZON, J. F., OTSUKA, F., VIRMANI, R. y FALK, E. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research*, 114, 1852-1866.
- 5 BLACKBURN, E. H., GREIDER, C. W. y SZOSTAK, J. W. 2006. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature medicine*, 12, 1133-1138.
- BLASCO, M.A., 2005. Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *The EMBO journal*, 24(6), pp.1095-1103.
- 10 BREITSCHOPF, K., ZEIHNER, A.M. y DIMMELER, S., 2001. Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS letters*, 493(1), pp.21-25.
- 15 CHEN, Q., VAZQUEZ, E. J., MOGHADDAS, S., HOPPEL, C. L. y LESNEFSKY, E. J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 36027-36031.
- CONG, Y.-S., WRIGHT, W. E. y SHAY, J. W. 2002. Human telomerase and its regulation. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66, 407-425.
- 20 CONTE, M.S., POMPOSELLI, F.B., CLAIR, D.G., GERAGHTY, P.J., MCKINSEY, J.F., MILLS, J.L., MONETA, G.L., MURAD, M.H., POWELL, R.J., REED, A.B. y SCHANZER, A., 2015. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. *Journal of vascular surgery*, 61(3), pp.2S-41S.
- 25 COUNTER, C. M., GUPTA, J., HARLEY, C. B., LEBER, B. y BACCHETTI, S. 1995. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*, 85, 2315-2320.
- DE LANGE, T. 2015. A loopy view of telomere evolution. *Frontiers in genetics*, 6, 321.
- 30 DEMISSIE, S., LEVY, D., BENJAMIN, E. J., CUPPLES, L. A., GARDNER, J. P., HERBERT, A., KIMURA, M., LARSON, M. G., MEIGS, J. B. y KEANEY, J. F. 2006. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging cell*, 5, 325-330.
- 35 EKBLOM, P., LONAI, P. y TALTS, J. F. 2003. Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biology*, 22, 35-47.
- ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A. y NAGATA, S., 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), pp.43-50.
- 40 EPEL, E. S., LIN, J., WILHELM, F. H., WOLKOWITZ, O. M., CAWTHON, R., ADLER, N. E., DOLBIER, C., MENDES, W. B. y BLACKBURN, E. H. 2006. Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology*, 31, 277-287.
- 45 FITZPATRICK, A. L., KRONMAL, R. A., GARDNER, J. P., PSATY, B. M., JENNY, N. S., TRACY, R. P., WALSTON, J., KIMURA, M. y AVIV, A. 2007. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *American journal of epidemiology*, 165, 14-21.
- GRAHAME, T. J. y SCHLESINGER, R. B. 2012. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Particle and fibre toxicology*, 9, 21.
- 50 GREIDER, C. W. 1998. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 90-92.
- 55 HAYFLICK, L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 37, 614-636.
- 60 HUZEN, J., PEETERS, W., DE BOER, R.A., MOLL, F.L., WONG, L.S., CODD, V., DE KLEIJN, D.P., DE SMET, B.J., VAN VELDHUISEN, D.J., SAMANI, N.J. y VAN GILST, W.H., 2011. Circulating leukocyte and carotid atherosclerotic plaque telomere length. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), pp. 1219-1225.
- 65 ITOH, G., TAMURA, J., SUZUKI, M., SUZUKI, Y., IKEDA, H., KOIKE, M., NOMURA, M., JIE, T. e ITO, K., 1995. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *The American journal of pathology*, 146(6), p.1325.

- JOVANOVIC, K., CHETTY, C. J., KHUMALO, T., DA COSTA DIAS, B., FERREIRA, E., MALINDISA, S. T., CAVENEY, R., LETSOLO, B. T. y WEISS, S. F. 2015. Novel patented therapeutic approaches targeting the 37/67 kDa laminin receptor for treatment of cancer and Alzheimer's disease. *Expert opinion on therapeutic patents*, 25, 567-582.
- 5 KVELL K., PONGRÁ CZ J., SZÉKELY M., BALASKO M., PÉTERVÁRI E., BAKO G. 2011. Ageing and gene expression, *medical scienc*, [http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/001\\_1A\\_Gerontologia\\_en\\_book/ch02s04.html](http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/001_1A_Gerontologia_en_book/ch02s04.html), [accessed 17/10/201]
- 10 LI, Y., YANG, J. B., JIA, C., YU, G. Y., PEI, Z., LEI, L., WANG, Z. Z., CHANG, C. C., YANG, X. Y. y CHANG, T. Y. 2004. Enhancement of human ACAT1 gene expression to promote the macrophage-derived foam cell formation by dexamethasone. *Cell research*, 14, 315-323.
- 15 MATTHEWS, C., GORENNE, I., SCOTT, S., FIGG, N., KIRKPATRICK, P., RITCHIE, A., GODDARD, M. y BENNETT, M. 2006. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis. *Circulation research*, 99, 156-164.
- 20 MATTHYS, K. y BULT, H. 1997. Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 6, 3-21. MAZIBUKO Z., OTGAAR T.C., FERREIRA E., y WEISS S.F.T., 2017. Investigating a possible role of LRP::FLAG in a diabetes cell culture model. Unpublished.
- 25 NAIDOO, K., MALINDISA, S. T., OTGAAR, T. C., BERNERT, M., DIAS, B. D. C., FERREIRA, E., REUSCH, U., KNACKMUSS, S., LITTLE, M. y WEISS, S. F. 2015. Knock-down of the 37kDa/67kDa laminin receptor LRP/LR impedes telomerase activity. *PloS one*, 10, e0141618.
- NICHOLS, M., TOWNSEND, N., SCARBOROUGH, P. y RAYNER, M. 2012. European cardiovascular disease statistics.
- 30 OTGAAR T.C., FERREIRA E., MALINDISA S. BERNERT, M., LETSOLO B. y WEISS S.F.T. 2017. 37kDa LRP::FLAG enhances telomerase activity and reduces senescent markers in vivo, *oncotarget*, 10.18632/oncotarget.21278.
- 35 PIRILLO, A., NORATA, G. D. y CATAPANO, A. L. 2013. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 2013.
- SALPEA, K. D. y HUMPHRIES, S. E. 2010. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*, 209, 35-38.
- 40 SAVAGE, D.B., PETERSEN, K.F. y SHULMAN, G.I., 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews*, 87(2), pp.507-520.
- SHAMMAS, M. A. 2011. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14, 28.
- 45 TEDGUI, A. y MALLAT, Z. 1999. Atherosclerotic plaque formation. *La Revue du praticien*, 49, 2081-2086.
- VAN MEERLOO, J., KASPERS, G. J. y CLOOS, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 237-245.
- 50 VANA, K., ZUBER, C., PFLANZ, H., KOLODZIEJCZAK, D., ZEMORA, G., BERGMANN, A.-K. y WEISS, S. 2009. LRP/LR as an alternative promising target in therapy of prion diseases, Alzheimer's disease and cancer. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 9, 69-80.
- 55 VASA, M., BREITSCHOPF, K., ZEIHNER, A. M. y DIMMELER, S. 2000. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circulation research*, 87, 540-542.
- WANG, X., SUN, Y., YANG, H., LU, Y. y LI, L., 2016. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes by modulating the TLR4/NF-κB pathway. *Scientific reports*, 6.
- 60 WINTERGERST, E.S., JELK, J., RAHNER, C. y ASMIS, R., 2000. Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *The FEBS Journal*, 267(19), pp.6050-6059.
- 65 YANG, J., ZHANG, L., YU, C., YANG, X.F. y WANG, H., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research*, 2(1), p. 1.

YEH, J.-K. y WANG, C.-Y. 2016. Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases. *Genes*, 7, 58. ZUBER, C., LUDEWIGS, H. y WEISS, S. 2007. Therapeutic approaches targeting the prion receptor LRP/LR. *Veterinary microbiology*, 123, 387-393.

ZETTLER, M.E., PROCIUK, M.A., AUSTRIA, J.A., MASSAELI, H., ZHONG, G. y PIERCE, G.N., 2003. OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284(2), pp.H644-H653.

**EJEMPLO 2** - obesidad, resistencia a insulina y/o diabetes:

Materiales y métodos

Cultivo celular

La línea de células monocíticas de leucemia humana THP-1 se usó para el Ejemplo 2 debido a que cuando se trata con glucosa alta (HG) activa monocitos e induce la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa a través de estrés oxidante y factor de transcripción nuclear- $\kappa\beta$  (Shanmugum, 2003). Esta línea celular (monocitos) crece normalmente en suspensión pero se vuelve adherente a células endoteliales, lo que da como resultado disfunción endotelial observada en individuos con diabetes tipo dos (II), cuando se mantiene en factor de glucosa alto (Shanmugum, 2003). Las células THP-1 se cultivaron en RPMI (Thermofisher Scientific) suplementado con FBS a 10 % (Sigma) para mejorar el crecimiento, penicilina-estreptomina a 2 % (Thermofisher Scientific) para prevenir la contaminación bacteriana, y aminoácidos no esenciales MEM a 1 % (lonza). Para inducir un estado diabético, las células THP-1 se mantuvieron en glucosa 20 mM, y después se usaron en procedimientos experimentales posteriores. Esto generó cuatro condiciones diferentes de células THP-1: (i). no transfectadas no tratadas, (ii). no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, (iii). no transfectadas tratadas con glucosa, y (iv) células transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG tratadas con glucosa.

Estas células se cultivaron en CO<sub>2</sub> a 5 % a 37 °C para imitar condiciones *in vivo*. Las células se cultivaron cambiando el medio de cultivo dos veces a la semana para reponer los nutrientes. Las células THP-1 también se subcultivaron cuando fue necesario (alcanzaron una confluencia del 70-80 %), y se sembraron a una densidad apropiada para procedimientos experimentales posteriores. La siembra y el subcultivo de células implicaron el raspado de células y la centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos. El medio se descartó entonces seguido de la resuspensión de las células con 2 ml de disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) para eliminar el medio en exceso. Esto se centrifugó después a 4500 rpm durante 10 minutos antes de descartar el sobrenadante y resuspender el pelete celular en medio de cultivo celular reciente. Después, las células se resuspendieron con medio reciente, y se transfirieron nuevamente al matraz.

Transfección

Las células se transfectaron con plásmido pCIneo-moLRP-FLAG para inducir la sobreexpresión de la proteína LRP::FLAG. Este procedimiento demostró que la sobreexpresión de LRP::FLAG aumenta la actividad telomerasa y reduce el contenido de lípidos en las células, y por lo tanto reduce el estado diabético. El procedimiento de transfección se realizó entonces usando el reactivo de transfección Xfect (Clontech). El amortiguador de reacción Xfect se añadió a 5 µg de plásmido pCIneo-moLRP::FLAG para obtener un volumen total de 100 µl. A esto le siguió entonces la adición de 1,5 µl de polímero Xfect, que se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Esto se hizo para permitir que se formaran los complejos de nanopartículas. Después, este reactivo de transfección Xfect se añadió suavemente a las células en el matraz. Las células se incubaron después durante 72 horas a 37 °C con una mezcla maestra que comprende el constructo pCIneo-moLRP-FLAG y el reactivo Xfect. Esto permitió la transcripción y traducción de LRP::FLAG, dando como resultado de ese modo la sobreexpresión de proteína LRP::FLAG en las células THP-1. Con el fin de que las células transcribieran continuamente el plásmido LRP::FLAG, las células se trataron ocasionalmente con 50 µg/ml de geneticina. Las células transfectadas se usaron después para procedimientos experimentales posteriores.

Recuento celular

El recuento celular se realizó para asegurar que se usó el mismo número de células para experimentos posteriores. El procedimiento implicó teñir las células con azul de tripano filtrado (0,4 %). Esto permitió la tinción de las células muertas en azul mientras que las células viables permanecen sin teñir ya que su membrana todavía está intacta, por lo que son selectivas en los compuestos que pasan a través de la membrana. Se usaron alrededor de 10 µl de la muestra, y se mezclaron con 10 µl de azul de tripano. Después, se colocaron 10 µl de esta disolución en el hemocitómetro, y se contó el promedio de células viables y muertas en los 16 cuadrados pequeños bajo un microscopio. Para calcular el número total de células viables, se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular} \left( \frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \text{células por 16 cuadrados} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

La concentración celular se usó después para sembrar una concentración igual de células en cada pocillo de las placas usadas para asegurar que los datos obtenidos son precisos.

5 Preparación de lisado proteico

Las células se rasparon para facilitar el desprendimiento de células. Las células se centrifugaron después a 6600 rpm durante 15 minutos. El medio se desechó, y el pelete se resuspendió con PBS y se centrifugó. El sobrenadante se desechó después mientras el pelete se resuspendió en 210 µl de amortiguador de lisis no desnaturizante (CHAPS), y se incubó a 4 °C durante 30 minutos. A esto le siguió entonces la centrifugación a 4 °C a 12000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante que contenía el extracto de proteína se transfirió entonces a un nuevo tubo Eppendorf, y se desechó el pelete que contenía los desechos celulares. El lisado proteico se usó en aplicaciones posteriores, incluyendo actividad telomerasa y ensayo de glucosa. Para la actividad telomerasa, el lisado proteico extraído se cuantificó mediante espectroscopía Nanodrop, mediante el Nanodrop ND-1000, para asegurar que las muestras se diluyeron a concentraciones iguales de 500 ng/µl de proteína.

Ensayo de proteínas Bicinchoninic acid™ (BCA):

20 Se realizó BCA con el fin de asegurar que se usaron concentraciones iguales de proteína para experimentos posteriores tales como SDS-PAGE y transferencia Western. La razón por la que se usó este procedimiento sobre otros ensayos de proteínas es debido a que la cadena principal peptídica en el ensayo de BCA también contribuye a la formación de color, ayudando a minimizar la variabilidad causada por las diferencias de composición de la proteína. También es muy sensible y no se ve afectado por diferentes composiciones de proteína.

25 El procedimiento implica la resuspensión de los peletes celulares obtenidos de matraces confluentes (confluencia del 70-80 %) con 100 µl de amortiguador RIPA. Se usó amortiguador RIPA para lisar las células de manera que se recogiera el lisado celular, puesto que el amortiguador RIPA contiene SDS que linealiza proteínas y da entonces una carga negativa global. Después, se diluyeron 5 µl de lisado extraído con 20 µl de agua destilada, y se cargaron por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se prepararon patrones de BCA de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 mg/ml, y se cargaron 25 µl de cada patrón por duplicado en la placa. A esto le siguió entonces la adición de 200 µl de BCA en cada pocillo, que se incubó entonces durante 30 min a 37 °C. La placa se leyó entonces a 562 nm en un lector de placas ELISA. Después, la curva patrón se representó y se usó para extrapolar la concentración de proteína de las muestras. Las muestras se diluyeron después hasta una concentración final de 2 mg/ml, que se usó entonces para experimentos posteriores tales como SDS PAGE y transferencia Western.

35 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y transferencia Western

Se usaron SDS-PAGE y transferencia Western para analizar la presencia y contenido de proteína en las células THP-1 transfectadas y no transfectadas.

40 Este procedimiento experimental se usó para confirmar la sobreexpresión de LRP::FLAG. Esto se realizó entre las células THP-1 transfectadas no tratadas, no transfectadas no tratadas, transfectadas tratadas, y no transfectadas tratadas. Se logró empleando SDS-PAGE, para separar las proteínas basándose en el tamaño, y la transferencia Western, que hace uso de un anticuerpo primario y secundario para la detección de proteínas específicas.

45 SDS-PAGE

50 El lisado extraído se diluyó con amortiguador RIPA a 2 mg/ml. RIPA contiene SDS que linealiza proteínas añadiendo una carga negativa proporcional a su tamaño y forma. Dado que las muestras extraídas recibieron una carga negativa general, cuando se expusieron a corriente eléctrica, se separan en bandas basadas en el tamaño a través de la migración de proteínas desde el ánodo al cátodo. Puesto que el peso molecular de LRP::FLAG y β-actina es ± 40 kDa y 42 kDa respectivamente, la muestra se cargó en gel de poliacrilamida al 10 % (p/v).

55 SDS-PAGE se compone de un gel de separación y apilamiento. El gel de separación se preparó añadiendo 2,5 ml de acrilamida al 40 % con 4,8 ml de agua destilada, 2,5 ml de amortiguador de separación, 100 µl de APS al 10 %, y 5 µl de TEMED. El gel de separación se vertió después entre las placas de moldeo de gel y se cubrió con isopropanol para eliminar las burbujas, ya que evitan la polimerización. A continuación, se dejó polimerizar. Después, el gel de apilamiento se preparó mezclando 625 µl de acrilamida al 40 % con 3,65 ml de agua destilada, 625 µl de amortiguador de apilamiento, 50 µl de APS, y 5 µl de TEMED. A continuación, se desechó el isopropanol, y el gel de apilamiento se vertió sobre el gel de separación polimerizado. A continuación, se insertó el peine y se dejó polimerizar el gel. Una vez que el gel había polimerizado, las placas se colocaron en el aparato de electroforesis. A continuación, se añadió el amortiguador de pasada y se retiraron los peines. Después, se mezclaron 2 mg/ml del lisado extraído obtenido en la sección 3.4 con 1x colorante de carga, y después se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. La muestra calentada se agitó con vórtex, y se cargaron 5 µl de la muestra en los pocillos del gel junto con 2 µl del marcador de peso molecular. El gel se resolvió a 120 V durante 45 min (hasta que el frente de colorante estaba a 1 cm del fondo del gel).

## Transferencia Western

5 Se aplicó transferencia electroforética en gel de SDS-PAGE con el fin de transferir las proteínas resueltas desde el gel a la membrana de PVDF. Inicialmente, la membrana de PVDF se empapó y se activó en metanol durante 2 min. Después, se ensamblaron membranas de PVDF sobre el dispositivo de electrotransferencia, y los geles se colocaron en la parte superior de las membranas, y se realizó la electrotransferencia durante 45 min a 120 V. A esto le siguió entonces el bloqueo de la membrana de PVDF usando 10 ml de disolución de bloqueo de BSA al 3 % durante 1 hora, para evitar la unión no específica del anticuerpo primario. Después, la membrana de PVDF se incubó con 2 µl de anticuerpo primario específico para nuestra proteína de interés, durante la noche a 4 °C. El anticuerpo primario no unido se eliminó con 5 lavados de 10 ml de PBS Tween durante 5 minutos cada uno. A esto le siguió entonces la adición de 2 µl de anticuerpo secundario anti-humano conjugado con la enzima HRP en 10 ml de BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, se realizaron 5 lavados de 10 ml de PBS Tween durante 5 minutos cada uno para eliminar el anticuerpo secundario no unido. A esto le siguió la adición del sustrato quimioluminiscente, y su señal se detectó y analizó usando el software Biorad Chemi-doc. Se realizó densitometría para cuantificar los niveles de proteína, y esto se realizó usando el software ImageJ™ de células no transfectadas y células transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG.

20 Evaluación de la actividad telomerasa usando qPCR en células que sobreexpresan LRP::FLAG

PCR cuantitativa/en tiempo real

25 La actividad telomerasa en células THP-1 transfectadas no tratadas, no transfectadas no tratadas, transfectadas tratadas, y no transfectadas tratadas se detectó para determinar si la sobreexpresión de LRP::FLAG potencia la actividad telomerasa en un entorno diabético. La actividad telomerasa se determinó usando el kit de detección de actividad telomerasa: TRAPeze RT® (Merck Millipore™) según el protocolo del fabricante. Se usaron semirreacciones, y se analizó la actividad telomerasa usando qPCR en tiempo real.

30 El kit de detección de la actividad telomerasa está compuesto por un amortiguador, cebadores Amplifluor, y un sistema de dos enzimas que permite la detección de la fluorescencia por qPCR en tiempo real. Para que la telomerasa extraída añadiera repeticiones teloméricas al extremo 3' del sustrato, se incubaron 2 µl de lisado extraído (contiene telomerasa) obtenido de la sección 3.2 con 12,5 µl de mezcla de reacción a 37 °C en una placa de 96 pocillos. La mezcla de reacción también se añadió a patrones y control positivo. Se usó telomerasa inactivada por calor como control, y se usaron agua y chaps como control negativo. Se añadieron alrededor de 2 µl de estos controles en una placa de 96 pocillos, y se incubaron con 12,5 µl de mezcla de control a 37 °C. El control inactivado por calor se realizó incubando 30 µl de lisado extraído a 100 °C durante 20 minutos. La mezcla de reacción se realizó añadiendo 2,5 µl de mezcla de reacción TRAPeze RT 5X, 0,2 µl de Taq polimerasa, y 8,8 µl de agua de calidad para PCR en cada pocillo. Mientras tanto, la mezcla de control se realizó añadiendo 2,5 µl de mezcla de reacción de control TRAPeze RT 5X, 0,2 µl de Taq polimerasa, y 7,8 µl de agua de calidad para PCR en cada pocillo. La actividad telomerasa de las células THP-1 se realizó por duplicado (3 repeticiones biológicas y 2 repeticiones técnicas), y se analizó utilizando el Roche LightCycler 480, que se hizo funcionar durante 45 ciclos. Los datos generados se normalizaron a la curva patrón generada a partir de muestras TSR8 que se diluyeron en serie. Los datos se analizaron usando la prueba de la *t* de Student.

45 Evaluación del contenido de lípidos usando tinción de Red Oil en células que sobreexpresan LRP::FLAG.

Tinción de Oil Red

50 El contenido de lípidos en las células THP-1 se detectó para determinar si la sobreexpresión de LRP::FLAG redujo el contenido de lípidos (estado diabético) en las células transfectadas que imitan la diabetes tipo II. Se sembraron 8000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos como se describe en la sección 3.1. Se usó un volumen de 100 µl por pocillo para todos los componentes de tinción de Oil Red usados en este procedimiento. El medio se retiró suavemente, y las células se lavaron una vez con PBS. Después, se añadió formalina a las células, y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente para fijar las células sobre la placa. Durante el tiempo de incubación, la disolución de trabajo Oil Red se preparó mezclando 3,6 ml de la disolución madre con 20 ml de isopropanol y 2,4 ml de agua destilada. Una vez que terminó el tiempo de incubación, se desechó la formalina, y las células se lavaron entonces dos veces usando agua. Las células se permeabilizaron entonces incubándolas con isopropanol al 60 % durante 5 minutos. El isopropanol al 60 % se desechó después, y las células se tiñeron entonces con disolución de trabajo Oil Red. Esto se incubó con agitación suave durante 15 minutos. Después, se desechó la disolución Oil Red O, y las células se lavaron 3 veces con agua, seguido de la adición de hematoxilina para teñir los núcleos en azul, y se incubaron durante 1 minuto para permitir la visualización. La hematoxilina se desechó después, y las células se lavaron con agua 3 veces. Las células se cubrieron entonces con agua, y se visualizaron al microscopio para visualizar y examinar la acumulación de lípido intracelular. La tinción se cuantificó entonces añadiendo 100 µl de isopropanol al 100 % y usando un lector de placas ELISA para leer con precisión la placa a la longitud de onda de 572 nm. Los datos se analizaron usando la prueba de la *t* de Student.

Evaluación de la captación de glucosa en células que sobreexpresan LRP::FLAG.

#### ELISA colorimétrico

- 5 Este ensayo basado en placa se realizó para determinar si la sobreexpresión de LRP::FLAG da como resultado una captación de glucosa mejorada en células cultivadas en glucosa alta. Por lo tanto, se evaluó la captación de glucosa usando ELISA colorimétrico entre las células THP-1 no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, no tratadas no transfectadas, tratadas con glucosa no transfectadas, y tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG. El ELISA colorimétrico se escogió por ser rápido, altamente sensible y específico. La captación de glucosa por las células THP-1 se evaluó usando el kit de ensayo de glucosa de Calbiochem®. Este kit está compuesto de amortiguador, sonda de glucosa, patrón de glucosa, y mezcla de enzima de glucosa que oxida la glucosa presente y produce un producto que reacciona con la sonda para producir cambio de color. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.
- 10
- 15 Alrededor de 20  $\mu$ l del lisado extraído se cargaron después por cuadruplicado, y después se añadieron 30  $\mu$ l de amortiguador de ensayo de glucosa para hacer un volumen total de 50  $\mu$ l mientras que se usaron amortiguador chaps y de glucosa como control negativo. Después, se añadieron 50  $\mu$ l de mezcla de reactivo de glucosa, que se preparó mezclando 46  $\mu$ l de amortiguador de ensayo de glucosa con 2  $\mu$ l de sonda de glucosa y 2  $\mu$ l de mezcla de enzima de glucosa, a todas las placas que contenían el lisado extraído y los controles. Esto se incubó entonces a 37  $^{\circ}$ C durante 30 minutos, y se cubrió con lámina como reactivo sensible a la luz. La placa se leyó después usando el lector de placas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) a una absorbancia de 570 nm. Los datos obtenidos del lector de placas ELISA se analizaron usando la prueba de la *t* de Student.
- 20

#### RESULTADOS

- 25 Sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1 usando transferencia Western

Las células THP-modelo de cultivo celular se transfectaron de forma estable con plásmido pCIneo-moLRP::FLAG. Esto se hizo para inducir la sobreexpresión de LRP::FLAG, que se confirmó usando transferencia western.  $\beta$ -actina se determinó como el control de carga para confirmar que la carga de proteína es la misma a lo largo del gel y asegurar que los resultados no se deben a errores de carga o transferencia de proteína. La  $\beta$ -actina se detectó en células transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG y no transfectadas, tal como se muestra en la Figura 6. La LRP::FLAG sólo se detectó en células transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, lo que mostró que el procedimiento de transfección era satisfactorio (carril 1-4). La Figura 6 muestra la sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1 usando transferencia Western. Los análisis de transferencia Western de  $\beta$ -actina y de la sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1 transfectadas (carril 1-4) y THP-1 no transfectadas (carril 5-8). La detección de la proteína LRP::FLAG se logró usando anticuerpo primario murino anti-FLAG y anticuerpo secundario anti-IgG murina acoplado a HRP. Además, el control de carga ( $\beta$ -actina) también se determinó tanto en las células transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG como en las no transfectadas. La  $\beta$ -actina se detectó usando anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa anti- $\beta$ -actina. Se determinó que LRP::FLAG se expresaba sólo en células THP-1 transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG.

30

35

40

La sobreexpresión de LRP::FLAG aumentó significativamente la actividad telomerasa en células THP-1 independientemente del tratamiento de glucosa.

45

La actividad de los telómeros se determinó entre las células THP-1 no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, no tratadas no transfectadas, tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, y tratadas con glucosa no transfectadas. Se encontró que la sobreexpresión de LRP::FLAG dio como resultado un aumento en la actividad telomerasa de células THP-1 no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, y tratadas con glucosa no transfectadas con respecto a las células THP-1 no tratadas no transfectadas (Figura 7). Un aumento en la actividad telomerasa entre células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG y tratadas con glucosa no transfectadas. La Figura 7 muestra que la sobreexpresión de LRP::FLAG aumentó significativamente la actividad telomerasa en células THP-1 que imitan el estado diabético. Los resultados demostraron un aumento de 4,7 y 1,7 veces en la actividad telomerasa de células THP no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG ( $p = 1 \times 10^{-4}$ ) y tratadas con glucosa no transfectada ( $p = 8 \times 10^{-4}$ ), respectivamente cuando se compara con células no tratadas no transfectadas. El solicitante también observó un aumento significativo de 4,7 veces entre las células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG y no tratadas no transfectadas ( $p = 1 \times 10^{-4}$ ) y un aumento de 2,8 veces entre las células tratadas con glucosa no transfectadas y células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG ( $p = 4 \times 10^{-5}$ ). Los datos representados fueron con respecto a células THP-1 no tratadas no transfectadas que se establecieron como 100 %.

50

55

60

La sobreexpresión de LRP::FLAG disminuyó significativamente el contenido de lípidos en células THP-1 transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG.

65

El contenido de lípidos se determinó en células THP-1 no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, no tratadas no transfectadas, tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, y tratadas con glucosa no transfectadas. Para evaluar el contenido de lípidos, se usó tinción de Oil Red para teñir los lípidos, que se cuantificó en el lector de placas de ELISA. La tinción de Oil Red demostró que la sobreexpresión de LRP::FLAG disminuyó significativamente el contenido de lípidos mostrado como una tinción rosa en células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG en comparación con células tratadas con glucosa no transfectadas, como se muestra en la Figura 8.

La Figura 8 muestra que la sobreexpresión de LRP::FLAG disminuyó significativamente el contenido de lípidos en células THP-1 que imitan el estado diabético tipo 2. (a) las imágenes obtenidas a un aumento de 10 ilustran un alto contenido de lípidos (mostrado en tinción rosa) en células tratadas con glucosa no transfectadas en comparación con células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, células no tratadas no transfectadas, y células no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG. El contenido de lípidos mostrado en tinción rosa de células THP-1 tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG disminuyó hasta aproximadamente el mismo nivel que las células THP-1 no tratadas no transfectadas. (b) se encontró que las células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG tenían una disminución significativa de 1,21 veces en el contenido de lípidos en comparación con las células tratadas con glucosa no transfectadas ( $p = 4 \times 10^{-5}$ ). También se observa una disminución de 1,1 veces entre las células no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG y las no tratadas no transfectadas, y un aumento de 1,04 en el contenido de lípidos entre las células no tratadas no transfectadas y las células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG ( $p=0,008$ ). Un aumento significativo de 1,3 veces en el contenido de lípidos entre las células no tratadas no transfectadas y las células tratadas con glucosa no transfectadas ( $p = 3,7 \times 10^{-6}$ ). Los datos representados fueron con respecto a células THP-1 no tratadas no transfectadas que se establecieron como 100 %.

La sobreexpresión de LRP::FLAG indujo un aumento en la captación de glucosa en células THP-1 que imitan el estado diabético

Se encontró que la sobreexpresión de LRP::FLAG tenía un efecto sobre la capacidad de la célula para captar glucosa, y se confirmó mediante un ensayo de glucosa basado en ELISA. La captación de glucosa de las células THP-1 se determinó entre las células no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, no tratadas no transfectadas, tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, y tratadas con glucosa no transfectadas. El ensayo de glucosa basado en ELISA demostró un aumento significativo de la captación de glucosa en células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG con respecto a células tratadas con glucosa no transfectadas y entre células no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG y no tratadas no transfectadas. Adicionalmente, se observa un aumento de glucosa en medios en los que se cultivaron células THP-1 no tratadas no transfectadas con respecto a los medios de células THP-1 no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG 1.

La Figura 9 muestra que la sobreexpresión de LRP::FLAG indujo un aumento en la captación de glucosa en células THP-1 que imitan el estado diabético. Se determinó que las no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG tenían un aumento de 1,18 veces en la captación de glucosa con respecto a las células no tratadas no transfectadas ( $p = 0,03$ ). Los resultados también demostraron un aumento de 1,1 veces entre las células tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG y las células tratadas con glucosa no transfectadas ( $p = 7 \times 10^{-4}$ ), y una disminución de 1,12 veces en el contenido de glucosa entre medios de células no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG y células no tratadas no transfectadas.

#### DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:

La transferencia Western reveló la sobreexpresión de LRP::FLAG en células THP-1 transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG. Esto muestra que el procedimiento de transfección fue exitoso. Los resultados muestran un aumento en la actividad telomerasa en THP-1 no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG, tratadas con glucosa no transfectadas, y tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG. Esto muestra que la actividad telomerasa se potenció, alargando de este modo los telómeros. De forma concomitante con este aumento en la actividad telomerasa, se descubrió además que la sobreexpresión de LRP::FLAG redujo el contenido de lípidos en células THP-1.

Se muestra además que la activación telomerasa dependiente de LRP::FLAG da como resultado una reducción significativa en el contenido de lípidos de las tratadas con glucosa transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG hasta aproximadamente el mismo nivel que el control (células THP-1 no tratadas no transfectadas y no tratadas transfectadas con pCIneo-moLRP::FLAG). Se ha encontrado que el contenido de lípidos de las células en la diabetes aumenta, lo que también está asociado con la resistencia a insulina (Gavin et al, 2017). Estudios han demostrado que un aumento en el contenido de lípidos conduce a resistencia a insulina (Palmer et al., 2015).

Por lo tanto, al sobreexpresar LRP::FLAG en células THP-1, se aumentó la actividad telomerasa. Sin estar limitados por la teoría, esto podría haber dado como resultado la reducción de especies de ROS, que también desempeñan un papel en la regulación del metabolismo de lípidos al aumentar la expresión de la proteína activadora de la

escisión *proteína de unión a elementos reguladores de esteroides* (SREBP) que activa la ácido graso sintasa (FAS) (Ryu et al., 2015). FAS es un gen lipogénico que estimula la lipogénesis, y esto contribuye a la resistencia a insulina. Se sabe que los niveles de FFA aumentados disminuyen la  $\beta$ -oxidación mitocondrial en células del músculo esquelético y células hepáticas. Esto da como resultado un aumento de (DAG) y (LCCoA), que induce la fosforilación de serina/treonina de los sitios IRS-1, inhibiendo así la fosforilación de IRS-1 y la activación de la señalización de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P). (Savage et al. 2007). La inhibición de la activación de PI3P en el esqueleto da como resultado una síntesis disminuida de GLUT4, y en consecuencia una captación reducida de glucosa por los músculos esqueléticos. La inhibición de la activación de PI3P en células hepáticas conduce a una fosforilación reducida de la proteína O de la caja forkhead (FOXO), que a su vez da como resultado un aumento de la gluconeogénesis hepática (Savage et al. 2007). Por lo tanto, pero sin estar limitados por la teoría, la sobreexpresión de LRP::FLAG puede conducir a especies de ROS reducidas, que pueden conducir a la reducción del metabolismo lipídico y contenido de lípidos, tal como se muestra. El contenido reducido de lípidos podría haber suprimido posiblemente la resistencia a insulina, posiblemente mejorando la sensibilidad a insulina.

La mejora de la sensibilidad a insulina y la reducción de la resistencia a insulina dan como resultado un aumento de la captación de glucosa y una reducción de la producción de glucosa por las células. La insulina activa las rutas de MAPK, PI3K-Akt y CAP/Cbl y la proteína G pequeña TC10 para aumentar la captación de glucosa. La MAPK inhibe la gluconeogénesis, PI3K-Akt aumenta GLUT-4 y CAP/Cbl y la proteína G pequeña TC10 aumenta la supresión de la lipogénesis (Hajjiaghaalipour et al.,2015). Esto va en línea con nuestros resultados en los que se observa una mayor captación de glucosa en células THP-1 transfectadas con pCIneo-moLRP-FLAG que imitan la diabetes tipo II. Este aumento de la captación de glucosa por las células significa que se redujo el estado hiperglucémico (un sello distintivo principal de la diabetes).

Por lo tanto, el uso de LRP::FLAG, que aumenta los niveles de hTERT y la actividad telomerasa, puede conducir a ROS reducida, y por lo tanto da como resultado la reducción del estado hiperglucémico observado en la diabetes tipo II, como se muestra en la Figura 7.

La reducción de la concentración de lípidos en las células diabéticas mejorará la señalización alterada de la insulina en las mismas, tratando y/o previniendo la obesidad, la resistencia a insulina y/o la diabetes.

## REFERENCIAS

Abdul-Ghani, M.A. y DeFronzo, R.A. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Biomedical and Biotechnology J.* 2010: 1-19

Aburasayn, H., Batran, R.A.I. y Ussher, J.R. (2016). Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 311(2): E423-435

Blackburn, E. H. (1997) *Biochemistry* (Moscow, Russ. Fed.). 62: 1196-1201.

Chawla, A., Chawla, R. y Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab.* 20(4): 546-551.

Chetty, C., Khumalo, T., Da Costa Dias, B., Reusch, U., Knackmuss, S., Little, M. y Wiess, S.F.T. (2014). Anti-LRP/LR Specific Antibody IgG1-iS18 Impedes Adhesion and Invasion of Liver Cancer Cells. *PLoS ONE.* 9(5): e96268.

Cong, Y., y Shay, J. W. (2008). Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell research.* 18(7): 725-732.

Cong, Y. S., Wen, J. y S. Bacchetti. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet.* 8:137-142.

Cong, Y. S., Wright, W.E. y Shay, J.W. (2002). Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3): 407-425.

Correria-Melo, C. y Passes, T.F (2015). Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta.* 1847(11):1373-1379.

Counter, C.M., Avilion, A.A., Lefeuvrel, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., y Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11: 1921-1929.

Cullinan, K. (2017). Big increase in diabetes death. <http://www.news24.com/SouthAfrica/News/tb-diabetes-leading-causes-of-natural-deaths-in-2015-stats-sa-20170228>

- Cusanelli, E. y Chartrand, P. (2015). Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Frontiers in Genetics*. 6: 143.
- 5 Da Costa Dias, B., Jovanovic, K., Gonsalves, D., Moodley, K., Reusch, U., Knackmuss, S., Penny, C., Weinberg, M.S., Little, M., y Weiss, S.F.T. (2013). cytotoxicity. *Sci. Rep.* 3: 1-8.
- Da Costa Dias, B., Jovanovic, K., Gonsalves, D., Moodley, K., Reusch, U., Knackmuss, S., Weinberg, M.S., Little, M., y Weiss, S.F.T. (2014). The 37kDa/67kDa Laminin Receptor acts as a receptor for A b 42 internalization. *Sci. Rep.* 4: 1-11.
- 10 de Jesus, B.B., Schneeberger, K., Vera, E., Tejera, A., Harley, C.B. y Blasco, M.A. (2011). The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Ageing cell*. 10(4): 604-621
- 15 De Lange, T. (2009). How telomeres solve the end protection problem. *Science*. 329(5955): 948-952.
- Dia, J., Carver, M. y Yang, D. (2008). Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie*. 90(8): 1172-1183.
- 20 Elks, C.E. y Scott, R.A. (2014). The Long and Short of Telomere Length and Diabetes. *Diabetes*. 63(1): 65-67.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A.J. y Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 105: 141-150
- 25 Feng, J., Funk, W.D., Wang, S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., et al. (1995). The RNA Component of Human Telomerase. *Science*. 80(269): 1236-1241.
- Fidler, I.J. and Radinsky, R. (1990). Genetic control of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 82: 166-168.
- 30 Fonseca, V.A. (2009). Defining and Characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 23(Suppl 2): S151-S156.
- Ford, J.H. (2010). Saturated fatty acid metabolism is key link between cell division, cancer, and senescence in cellular and whole organism aging. *Age (Dordr)*. 32:231-237
- 35 Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Galadari, A. y Thayyullathil, F. (2013). Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids Health Dis.* 12:98
- Gauczynski, S., Nikles, D., El-gogo, S., Papy-garcia, D., Alban, S., Barritault, D., Lasme, C.I., y Weiss, S. (2006). The 37-kDa / 67-kDa Laminin Receptor Acts as a Receptor for Infectious Prions and Is Inhibited by Polysulfated Glycanes. *JID*. 194: 702-709.
- 40 Gauczynski, B.Y.S., Hundt, C., Leucht, C., y Weiss, S. (2001a). Interaction of prion proteins with cell surface receptors, olecular chaperones, and other molecules. *Adv. Protein Biochem.* 57: 229-272.
- 45 Gavin, J.R., Weiden, P.J., Xavier Pi-Sunyer, F., y Newcomer, J.W. (2017). New Insight in Diabetes and Psychiatric Illness: Integrating Management Pathophysiology of Insulin Resistance. [http://www.medscape.org/viewarticle/442813\\_2](http://www.medscape.org/viewarticle/442813_2). Retrieved March 2017.
- 50 Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., Hill, C. y Carolina, N. (1999). Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell*. 97: 503-514.
- Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M. y Arya, A. (2015). Modulation of Glucose Transporter Protein by Dietary Flavonoids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Biol Sci.* 11(5): 508-524
- 55 Harley, C.B., Futcher, A.B., y Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nat.* 345: 458M60.
- Janoušková, E., Nečasová, I., Pavloušková, J., Zimmermann, M., Hluchy, M., Marini, V., Nováková, M. y Hofr, C. (2015). Human Rap1 modulates TRF2 attraction to telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.* 43(5): 2691-2700.
- 60 Jovanovic, K., Gonsalves, D., Da, B., Dias, C., Moodley, K., Reusch, U., Knackmuss, S., Penny, C., Weinberg, M.S., Little, M., Wiess, S.F.T. (2013). Anti-LRP / LR specific antibodies and in Alzheimer 's disease. *Sci Rep.* 3:2699.
- 65 Jovanovic, K., Loos, B., Da Costa Dias, B., Penny, C., y Weiss, S.F.T. (2014). High Resolution Imaging Study of Interactions between the 37 kDa / 67 kDa Laminin Receptor and APP , Beta- Secretase and Gamma-Secretase in Alzheimer ' s Disease. *PLoS One*. 9: 1-10.

- 5 Jovanovic, K., Chetty, C.J., Khumalo, T., Da Costa Dias, B., Ferreira, E., Malindisa, S.T., Caveney, R., Letsolo, B. T. y Weiss, S.F.T. (2015) Novel patented therapeutic approaches targeting the 37kDa/67 kDa laminin receptor for treatment of Cancer and Alzheimer's Disease. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 25(5):567-582.
- 10 Khumalo, T., Ferreira, E., Jovanovic, K., Veale, R. B. y Weiss, S. F. T. (2015). "Knockdown of LRP/LR Induces Apoptosis in Breast and Oesophageal Cancer Cells." *PloS one* 10: 10: e0139584.
- 15 Kirchner, H., Shaheen, F., Kalscheuer, H., Schmid, S. M., Oster, H., y Lehnert, H. (2017). The Telomeric Complex and Metabolic Disease. *Genes*. 8(7): 176.
- 20 Kuhlow, D., Florian, S., von Figura, G., Weimer, S., Schulz, N., Petzke, K. J., Zarse, K., Pfeiffer, A., Rudolph, K. L. y Ristow, M. (2010). Telomerase deficiency impairs glucose metabolism and insulin secretion. *Aging* 2. *Aging* (Albany NY). 2(10):650-658
- 25 Li, Y. y Tergaonkar, V. (2014). Noncanonical Functions of Telomerase: Implications in Telomerase-Targeted Cancer Therapies. *Cancer Res*. 74: 1639.
- 30 Mbazima, V., Da Costa Dias, B., Omar, A., Jovanovic, K. y Weiss, S.F.T. (2010). Interactions between PrP(c) and other ligands with the 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 15:1150-1163.
- 35 Mejia, C.F. (2006). Molecular basis of type-2 diabetes. *Molecular endocrinology*. 87-108.
- 40 Mercurio, A.M. (1995). Laminin receptors: Achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol*. 5: 419-423.
- 45 Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, P. Steiner, S. D. Caddle, L. Ziaugra, R. L. Beijersbergen, M. J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D. A. Haber, y R. A. Weinberg. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 90:785-795.
- 50 Miwa, S., Czapiewski, R., Wan, T., Bell, A., Hill, K.N., von Zglinicki, T. y Saretzki, G. (2016). Decreased mTOR signalling reduces mitochondrial ROS in brain via accumulation of the telomerase protein TERT within mitochondria. *Aging*. 8(10):2551-2567.
- 55 Moodley, K., y Weiss, S.F.T. (2013). Downregulation of the non-integrin laminin receptor reduces cellular viability by inducing apoptosis in lung and cervical cancer cells. *PLoS One*. 8(3): e57409.
- 60 Naidoo, K., Malindisa, S.T., Otgaar, T.C., Bernert, M., Da Costa Dias, B., Ferreira, E., Reusch, U., Knackmuss, S., Little, M., Weiss, S.F.T y Letsholo, B.T. (2015) Knock-Down of the 37kDa/67kDa Laminin Receptor LRP/LR Impedes Telomerase Activity. *PLoS One* 10(11): e0141618.
- 65 Naidoo, K., Weiss, S.F.T., y Boitelo, L.T. (2014). University of the Witwatersrand, assignee. Modifying telomerase activity. South African Provisional Patent Application. 2014/08860.
- 70 O'Sullivan, R.J. y Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(3): 171-181.
- 75 Otgaar, T.C., Ferreira, E., Malindisa, S.T., Bernert, M., Letsolo, B.T., S.F.T. Weiss, S.F.T. (2017). 37 kDa LRP::FLAG enhances telomerase activity and reduces senescent markers in vitro. *Oncotarget*. 10:18632/0ncotarget.21278.
- 80 Palmer, A.K., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Chini, E.N., Xu, M. y Kirkland, J.L. (2015). Cellular senescence in type 2 diabetes: A therapeutic opportunity. *Diabetes*. 65(64):2289-2298.
- 85 Ryu, J.M., Lee, H.J., Jung, Y.H., Lee, K.H., Kim, D.I., Kim, J.Y., Ko, S.H., Choi, G.E., Chai, I.I., Song, E.J., Oh, J.Y., Lee, S. y Han, H.J. (2015). Regulation of Stem Cell Fate by ROS-mediated Alteration of Metabolism. *Int J Stem Cells*. 8(1): 24-35.
- 90 Salpea, K.D. and Humphries. (2010). Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*. 209:35-39.
- 95 Santos, J.H., Meyer, J.N. y Van Houten, B. (2006). Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide- induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Human Molecular Genetics*. 15(11): 1757-1768.
- 100 Savage, D.B., Petersen, K.F. y Shulman, G.I. (2007). Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 87: 507-520.

- Shay, J.W., Zou, Y., Hiyama, E. y Wright, W.E. (2001). Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*. 10(7): 677-685.
- 5 Tomas-Loba, A., Flores, I., Ferna, P.J., Cayuela, L., Maraver, A., Serrano, M., Tejera, A., Borra, C., Matheu, A., Klatt, P., et al. (2008). Telomerase Reverse Transcriptase Delays Aging in Cancer-Resistant Mice. *Cell*. 135: 609-622.
- 10 Van Steensel, B., Smogorzewska, A., y De Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*. 92: 401-413.
- Van Deursen, M. (2014). "The role of senescent cells in ageing". *Nature*. 509(7501): 439-446.
- 15 von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W. y Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*. 220: 186-193.
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci*. 27(7): 339-344.
- 20 Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B. y Morin, G.B. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*. 17:498-502.
- 25 Weiss, S.F.T.(2017).Bad Boy with a Twist: Targeting the 37kda/67 KDa Laminin Receptor for Treatment of Cancer and Neurodegenerative Diseases and for Changing Telomere Dynamics. *Cell Cellular Lif Sci J*. 2(2): 000114
- Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 26(2): 19-39.
- 30 Xu, Y. (2011). Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. *Chem. Soc. Rev*. 40: 2719-2740.
- 35 Yokoi, T., Fukuo, K., Yasuda, O, et al. (2006). Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells. *Diabetes* 55:1660-1665.
- Zhao, J., Zhu, Y., Lin J., Matsuguchi, T., Blackburn, E., Zhang, Y., Cole, S.A., Best, L.G., Lee, E.T. y Howard,B.V. (2013).Short leukocyte telomere length predicts risk of diabetes in American Indians: the Strong Heart Family Study. *Diabetes*. 63:354-362.
- 40 El solicitante cree que la materia objeto de la descripción descrita aquí al menos mejora una de las desventajas conocidas en el estado actual de la técnica.

## REIVINDICACIONES

1. Un agente biofarmacéutico que incluye un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de la obesidad, en el que el LRP/LR, y/o el fragmento del mismo, son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita, en el que la célula diana es al menos una del siguiente grupo: células endoteliales de vasos sanguíneos, células de los músculos lisos de vasos sanguíneos, células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ) y células gamma ( $\gamma$ ), de manera que, en uso, la administración del agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en la célula diana, y en el que el fragmento se expone en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
2. El agente biofarmacéutico para uso según la reivindicación 1, en el que el LRP/LR está encapsulado en un medio de administración que comprende nanopartículas, estando preferiblemente las nanopartículas funcionalizadas con restos químicos, bioquímicos o biológicos para asegurar la administración específica del sitio a la célula diana, en el que los restos actúan como ligandos para asegurar la administración específica del sitio en la célula diana.
3. El agente biofarmacéutico para uso según la reivindicación 2, en el que el medio de administración se formula en una composición farmacéutica, la cual incluye un vehículo farmacéutico para la administración parenteral o no parenteral al sujeto.
4. El agente biofarmacéutico para uso según la reivindicación 3, en el que la composición farmacéutica incluye además un ingrediente farmacéutico activo (API).
5. El agente biofarmacéutico para uso según la reivindicación 4, en el que la composición farmacéutica incluye además un antioxidante de manera que, en uso, en la célula diana el antioxidante elimina especies de oxígeno reactivas.
6. El agente biofarmacéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el LRP/LR comprende un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
7. El agente biofarmacéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el LRP/LR forma parte de un agente de transfección para expresar un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, estando el fragmento expuesto en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, preferiblemente el agente de transfección es el plásmido pCIneo-moLRP::FLAG.
8. El agente biofarmacéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que las nanopartículas son nanopartículas poliméricas y biodegradables para proporcionar, en uso, un riesgo reducido de una respuesta inmunogénica a dichas nanopartículas poliméricas, y además en el que las nanopartículas poliméricas son biocompatibles para mitigar el riesgo de cualquier respuesta inmunogénica a dichas nanopartículas poliméricas, y además en el que dichas nanopartículas poliméricas son una o más seleccionadas del siguiente grupo: eudragit, goma arábica, carragenina, celulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), quitina, pectina, amilopectina, caucho natural, polietileno, polipropileno, poliestireno, poliamida, poliacrilonitrilo, cloruro de polivinilo, alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno (PEG), poli(D-lactida) (PDLA), ácido poliláctico (PLLA), poligalacturonato, metilcelulosa (poliacetales), poli( $\epsilon$ -caprolactona), fosfolípidos, polisacáridos, polisacáridos polianiónicos, carboximetilcelulosa, carboximetilamilosa, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, heparina, sulfato de heparina, poli(metilacrilato de hidroxietilo), colágeno, fibrinógeno, albúmina, fibrina, acrilamida, copolímeros a base de hidroxipropilmetacrilamida, poli(acrilamida), poli(N-isopropilacrilamida) (pNIPAAm), polivinilpirrolidona, poli(ácido metacrílico-g-etilenglicol), poli(N-2-hidroxipropilmetacrilamida), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), quitosano, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (HEMA), polifazeno, fosforilcolina, ácido hialurónico (HA), metacrilato de hidroxietilo (HEMA), metileno-bis-acrilamida (MBAAm), poli(ácido acrílico) (PAAc), poli(acrilamida) (PAAm), poli(acrilonitrilo) (PAN), óxido de polibutileno (PBO), policaprolactona (PCL), polietilenimina (PEI), poli(metacrilato de etilo) (PEMA), fumarato de propileno (PF), poli(metacrilato de glucosietilo) (PGEMA), poli(hidroxibutirato) (PHB), poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), poli(hidroxipropilmetacrilamida) (PHPMA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(N-vinilpirrolidona) (PNVP), óxido de polipropileno (PPO), poli(acetato de vinilo) (PVAc), poli(vinilamina), sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, polilisina, gelatina, carboximetilquitina, dextrano, agarosa, pululano, poliésteres, PEG-PLA-PEG, PEG-PLGA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLA-PEG-PLA, poli(PF-co-EG), poli(tereftalato de PEG/PBO), PEG-bis-(acrilato de PLA), PEG6CD, PEG-g-poli(AAm-co-vinilamina), poli(NIPAAm-co-AAc), poli(NIPAAm-co-EMA), PNVP, poli(MMA-co-HEMA), poli(AN-co-sulfonato de alilo), poli(biscarboxi-fenoxi-fosfaceno), poli(sulfato de GEMA), poli(PEG-co-péptidos), alginato-g-(PEO-PPO-PEO), poli(PLGA-co-serina), acrilato de colágeno, alginato, acrilato de alginato, poli(HPMA-g-péptido), HA-g-NIPAAm, y poli(vinil metil éter) (PVME), y/o derivados de uno cualquiera o más de los mencionados anteriormente.
9. El agente biofarmacéutico para uso según la reivindicación 8, en el que el medio de administración se formula para administración oral, e incluye al menos parcialmente a su alrededor un revestimiento que incluye un inhibidor del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, poliamina, polimetacrilato

de metilo, y derivados de los mismos, y en el que el revestimiento incluye además un inhibidor de la bomba de eflujo de P-glicoproteína (P-gp).

5 10. Un agente biofarmacéutico que incluye un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis, en el que el LRP/LR, y/o el fragmento del mismo, son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita, y en el que la célula diana es al menos una del siguiente grupo: células endoteliales de vasos sanguíneos y células de músculos lisos de vasos sanguíneos, en uso el agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en la célula diana, y en el que el LRP/LR comprende un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del mismo como se expone en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

15 11. Un agente biofarmacéutico que incluye un precursor del receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa / receptor de laminina de alta afinidad (LRP/LR), y/o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de la resistencia a insulina y/o diabetes, en el que el LRP/LR, y/o el fragmento del mismo, son para la administración a una célula diana de un sujeto que lo necesita, y en el que la célula diana es al menos una del siguiente grupo: células pancreáticas que incluyen células alfa ( $\alpha$ ), células beta ( $\beta$ ), células delta ( $\delta$ ), y células gamma ( $\gamma$ ), en uso el agente biofarmacéutico reduce el contenido de lípidos en la célula diana, y en el que el LRP/LR comprende un listado de secuencias de péptidos/proteínas como se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del mismo como se expone en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

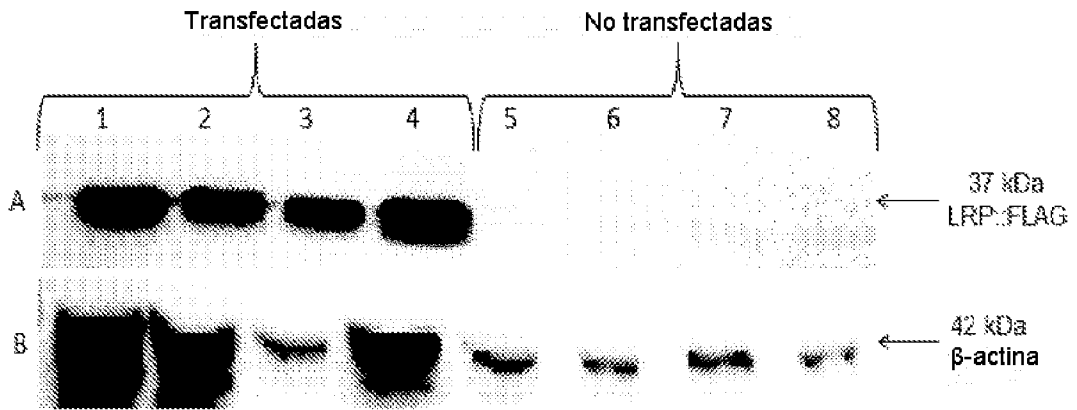


FIGURA 1

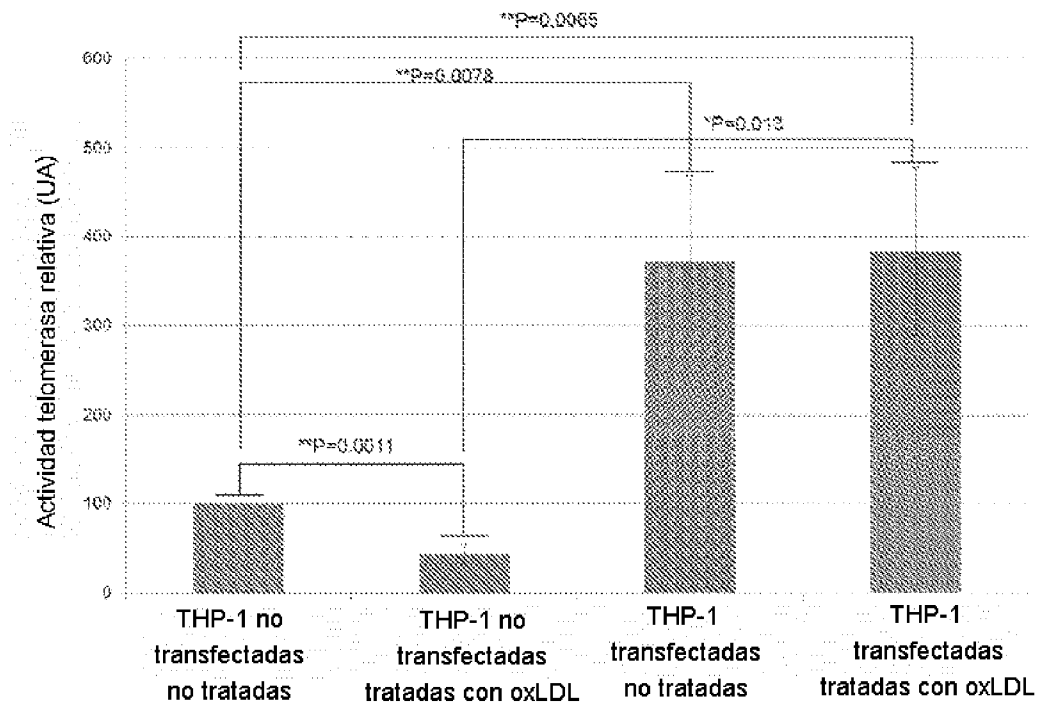


FIGURA 2

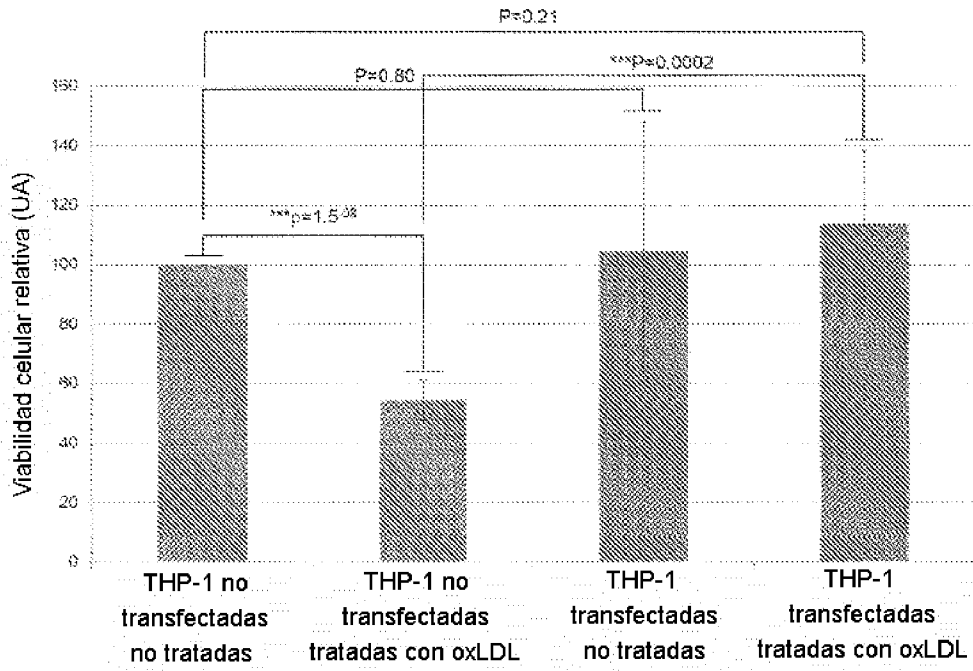


FIGURA 3

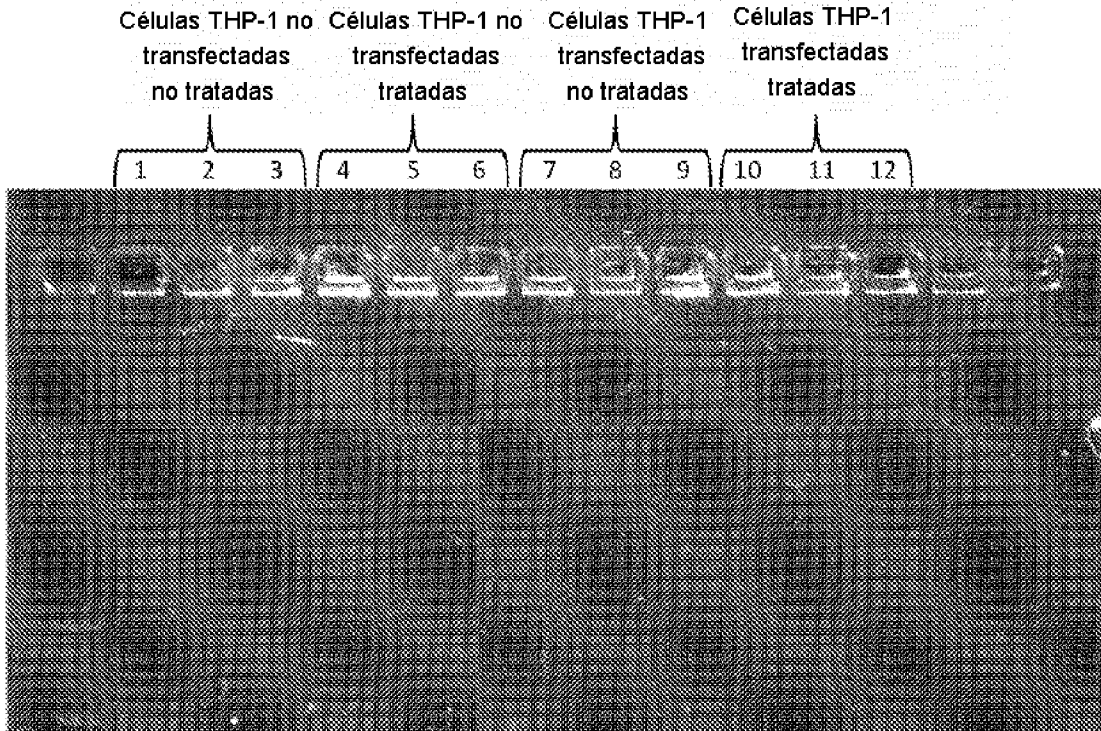


FIGURA 4

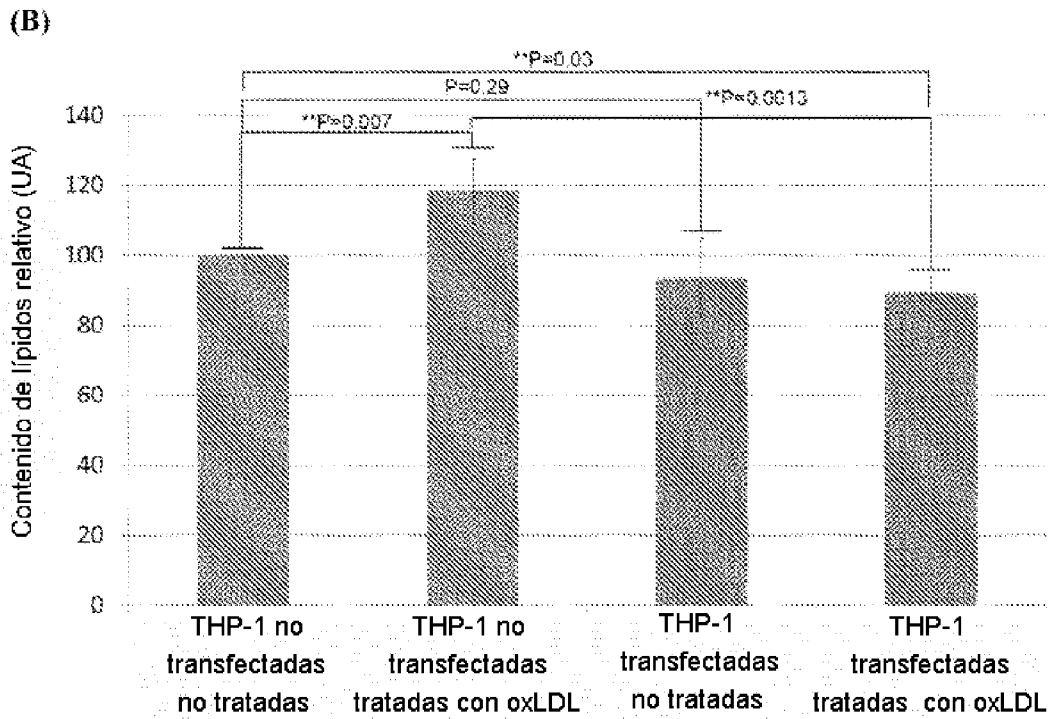
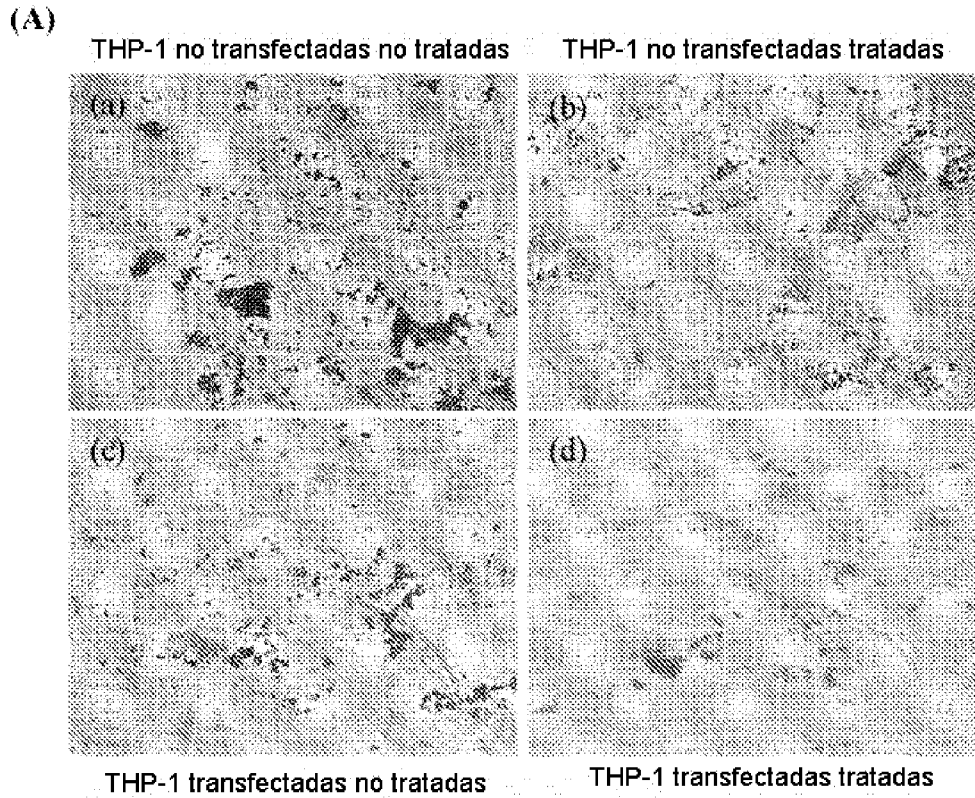


FIGURA 5 A y B

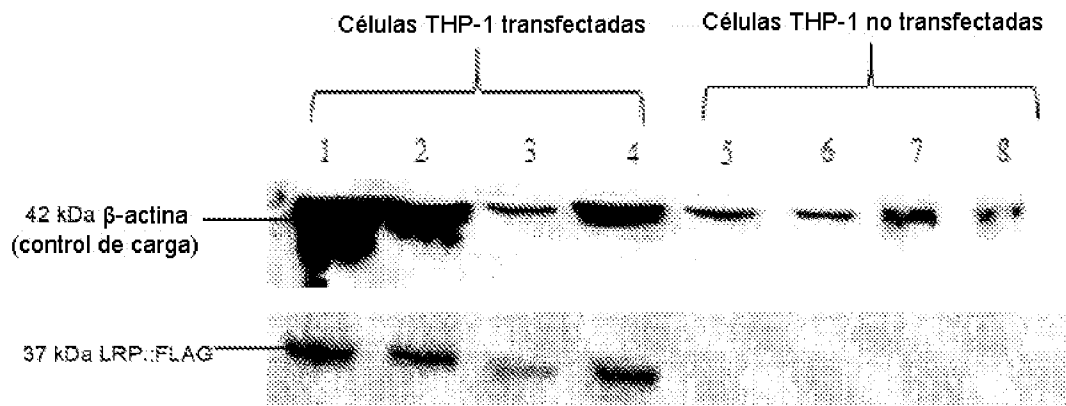


FIGURA 6

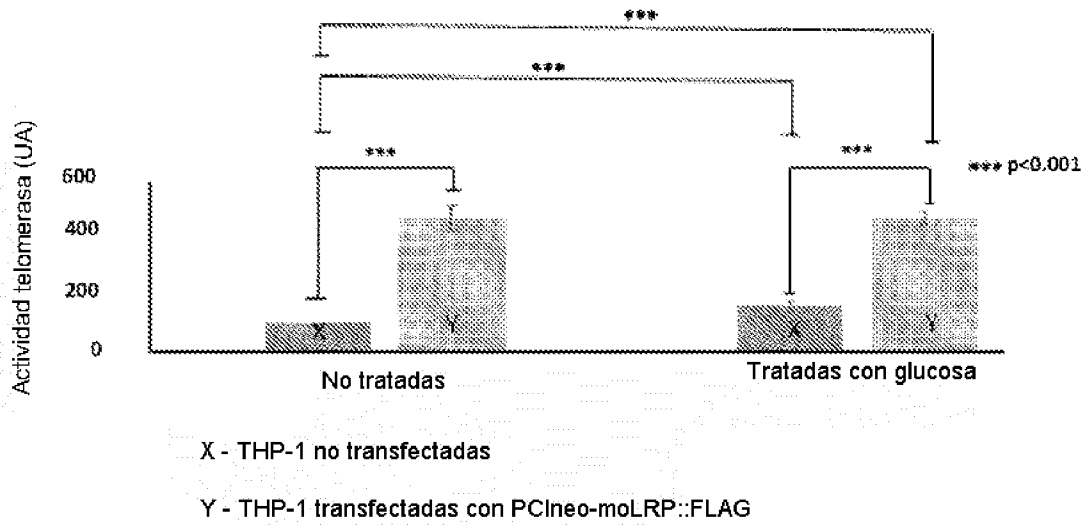


FIGURA 7

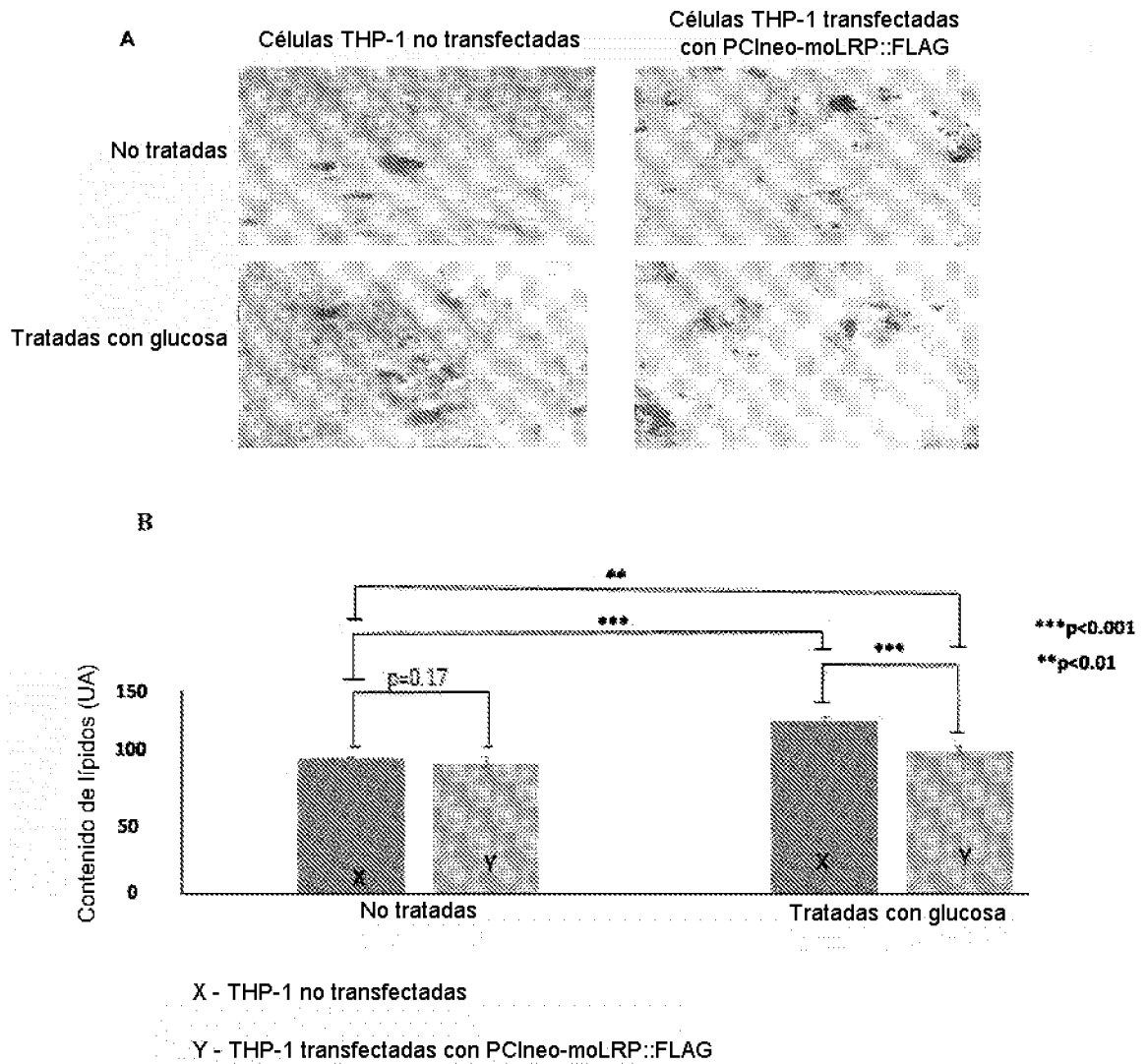
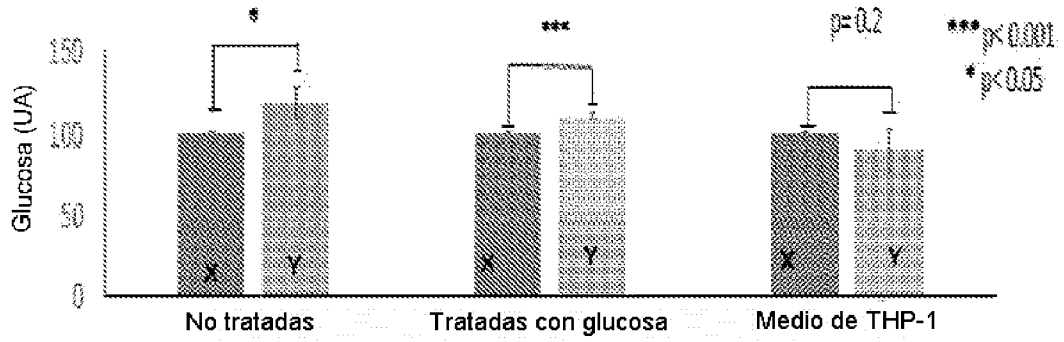


FIGURA 8 A y B



X - THP-1 no transfectadas

Y - THP-1 transfectadas con PCIneo-moLRP::FLAG

Figura 9