



FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

Diseño de protocolo de aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares de plasma en individuos con Alzheimer

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2025

Autor: Guillermo Pérez Lacárcel

Modalidad: Experimental

Tutora: Inmaculada Cuchillo Ibáñez

Co-tutora: Rocío Pérez Gonzále

Índice

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA).....	3
2.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs).....	5
3. OBJETIVOS.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	7
4.2 AISLAMIENTO DE VESÍCULAS.....	7
4.2.1 PRE-PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PLASMA.....	7
4.2.2 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS (SEC).....	8
4.2.3 FORMACIÓN DEL POOL Y CONCENTRACIÓN DEL POOL.....	9
4.3 CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	10
4.3.1 ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA TOTAL POR NANODROP.....	10
4.3.2 WESTERN BLOT.....	11
4.3.3 PROTOCOLO WESTERN BLOT DEFINITIVO PARA EL ANÁLISIS DE VEs	15
4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE IMAGEJ (FIJI).....	16
5. RESULTADOS.....	20
5.1 CARACTERIZACIÓN DE VEs Y SELECCIÓN DE LAS FRACCIONES 1-4....	20
5.1.1 PRUEBA 1.....	20
5.1.2 PRUEBA 2.....	23
5.1.3 PRUEBA 3.....	24
5.1.4 PRUEBA 4.....	25
5.1.5 PRUEBA 5.....	26
5.2 WESTERN BLOT DE LOS SETS.....	28
5.2.1 SET-1 MUESTRAS.....	28
5.2.2 SET-2 MUESTRAS.....	29
5.2.3 SET-3 MUESTRAS.....	31
5.2.4 NORMALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	32
5.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS WESTERN BLOTS.....	33
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	38
6.1 VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO DE AISLAMIENTO VEs.....	38
6.2 PRESENCIA DE APOE EN VEs.....	38
6.3 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	38
7. CONCLUSIONES.....	39
8. BIBLIOGRAFÍA.....	40

1. RESUMEN

Las vesículas extracelulares (VEs) son estructuras lipídicas secretadas por las células que contiene una gran variedad de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estas sustancias pueden reflejar procesos fisiológicos y patológicos del entorno celular. Las vesículas pueden atravesar la barrera hematoencefálica, pudiendo ser fuentes prometedoras biomarcadores para enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. En este trabajo, se ha investigado el contenido proteico de las vesículas extracelulares con especial interés en la apolipoproteína E (ApoE), en una cohorte de portadores de la mutación E280A en el gen PSEN1 asociada a Alzheimer familiar.

Se utilizaron muestras de plasma EDTA de individuos clasificados en tres grupos distintos: controles no portadores, portadores asintomáticos (sanos) y portadores con deterioro cognitivo leve. Las vesículas fueron aisladas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y concentradas mediante filtros Amicon. Las vesículas, se caracterizaron con marcadores vesiculares (CD9, CD63 y Alix) y se evaluó la presencia de ApoE en condiciones reductoras no reductoras. Finalmente la cuantificación se realizó con imageJ y se aplicó un análisis estadístico para comparar los grupos.

El protocolo permito aislar VEs confirmando su presencia mediante los marcadores, especialmente CD63. ApoE fue detectada tanto en vesículas como en formas solubles de plasma. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ApoE entre los tres grupos de estudio.

Aunque la proteína ApoE no demostró utilidad diagnóstica como biomarcador de VEs para la enfermedad de Alzheimer, el protocolo realizado en este ensayo constituye una buena base sólida para futuras investigaciones. La optimización del aislamiento y caracterización de VEs puede contribuir a la innovación de estrategias diagnosticas para patologías neurodegenerativas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología compleja y crónica que se desarrolla como una enfermedad neurodegenerativa. Neuropatológicamente, se caracteriza por la pérdida de sinapsis y neuronas en la corteza cerebral, afectando principalmente el lóbulo temporal, el lóbulo parietal, partes de la corteza frontal, así como el hipocampo y otras regiones subcorticales. (Cunnane et al., 2019). A nivel mundial, más de 50 millones de personas padecen demencia, y se estima que esta cifra se duplicará cada 20 años, alcanzando los 150 millones para 2050. Esto supondrá un aumento significativo en los costos para la comunidad y los sistemas de salud gubernamentales, así como en la carga emocional y física para las familias y cuidadores. (Cunnane et al., 2019).

Esta patología está vinculada a la atrofia cerebral, la formación de ovillos neurofibrilares (NFT) dentro de las neuronas, y la acumulación de placas amiloides extracelulares.

Los NFT, constituidos por proteína tau hiperfosforilada, no son exclusivos del Alzheimer, ya que también están presentes en otras enfermedades neurodegenerativas denominadas taupatías.

Las placas amiloides están compuestas en su mayoría por agregados de un péptido de 4 kDa y 39-43 aminoácidos, conocido como beta-amiloide ($A\beta$). Los péptidos $A\beta$, en especial la variante $A\beta_{42}$, tienden a agruparse con facilidad. (Cunnane et al., 2019).

En los últimos años, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) ha avanzado por el desarrollo de biomarcadores en distintos fluidos corporales y a partir de técnicas de neuroimagen. En el líquido cefalorraquídeo (LCR), se han realizado nuevos ensayos de tau fosforilada (p-tau) que reflejan con precisión la carga de ovillos neurofibrilares, mientras que el cociente $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ha demostrado ser más fiable que el uso de $A\beta_{42}$ de forma aislada, mejorando la correlación con resultados de PET amiloide. En sangre, los niveles de $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$ también se reconocen como indicadores relevantes, con patrones que varían según la edad y la acumulación cerebral de amiloide. (Dafre & Wasnik, 2023). Además, se han identificado biomarcadores alternativos como la banda amida I y determinados lípidos cerebrales (fosfatidilcolina, ceramidas, sulfatidas), que podrían ofrecer vías diagnósticas menos invasivas. Factores neurotróficos como el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y proteínas asociadas a la memoria como KIBRA también han mostrado alteraciones en fases tempranas de la enfermedad, asociadas a reducción del volumen hipocámpal y disfunción sináptica. (Dafre & Wasnik, 2023). Por otro lado, la neuroimagen ha permitido detectar alteraciones estructurales y funcionales en redes neuronales, lo que refuerza su papel como herramienta clave en la evaluación de la progresión de la EA. (Dafre & Wasnik, 2023).

En este trabajo se ha investigado la proteína ApoE en sangre como un posible marcador diagnóstico del Alzheimer.. ApoE desempeña una función similar en el cerebro que en la periferia: la mediación de la captación y redistribución del colesterol. De hecho, se ha demostrado que la homeostasis de lipoproteínas a través de apoE y sus receptores es esencial para un crecimiento saludable de las neuronas, la plasticidad y la reparación. La ausencia de ApoE o de receptores de lipoproteína de baja densidad (LDL) ha demostrado, en ratones transgénicos, afectar gravemente la densidad sináptica y causar déficits severos en la memoria de trabajo y en la memoria asociativa. Esta proteína se une a la familia de receptores de LDL como ligando, incluyendo el receptor de LDL y proteínas similares al receptor de LDL (LRP-1, LRP-2/megalina y otras). (Cunnane et al., 2019). LRP-1 se expresa principalmente en neuronas, mientras que las células gliales expresan mayormente el receptor de LDL. Estos receptores (particularmente LRP-1) no se usan solo para el metabolismo de lipoproteínas, sino que también se unen a algunas proteínas implicadas en el desarrollo del cerebro. (Cunnane et al., 2019).

2.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

Las VEs son vesículas formadas por una bicapa lipídica secretadas por prácticamente todas las células. Los tipos principales de VEs se pueden clasificar como exosomas o microvesículas dependiendo de su origen celular (*Su, Wang, Li, & Chen, 2025*). Las VEs representan una fracción muy pequeña del plasma y del suero sanguíneo, aproximadamente 50 nanolitros por cada mililitro de plasma (*Nieuwland et al., 2024*). El aislamiento de VEs se basa en cuatro principios físicos y bioquímicos fundamentales:

- **Tamaño:** se refiere al diámetro de las vesículas, asumiendo una forma esférica.
- **Densidad:** las VEs poseen una densidad característica que puede utilizarse para separarlas mediante centrifugación en gradientes de densidad.
- **Carga:** la superficie de las VEs suele presentar una carga negativa, lo cual permite su separación mediante métodos que discriminan según potencial zeta.
- **Composición molecular / Inmunofenotipo:** las VEs contienen biomoléculas específicas (en especial proteínas transmembrana o asociadas a la membrana), que pueden detectarse mediante el uso de anticuerpos específicos.

(*Nieuwland et al., 2024*).

Las vesículas extracelulares son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a la sangre (Figura1), lo que nos da la oportunidad de extraer estas vesículas de la sangre y averiguar qué ocurre dentro de las células del sistema nervioso central. Estas vesículas en concreto, portan marcadores que indican que vienen del sistema nervioso central y que han atravesado la barrera hematoencefálica. (*Shi, Sheng, Stewart, Zabetian, & Zhang, 2019*). Por ello, las VEs se consideran a día de hoy, como una fuente prometedora de biomarcadores para detectar posibles patologías, como por ejemplo, el Alzheimer. (*Su, Wang, Li, & Chen, 2025*)

En este trabajo se han utilizado muestras de plasma de una cohorte transversal que incluye portadores asintomáticos o con deterioro cognitivo leve de una mutación familiar de Alzheimer, así como sujetos control no portadores de la mutación. Las VEs se han aislado por tamaño a través de la técnica de cromatografía por exclusión de tamaño.

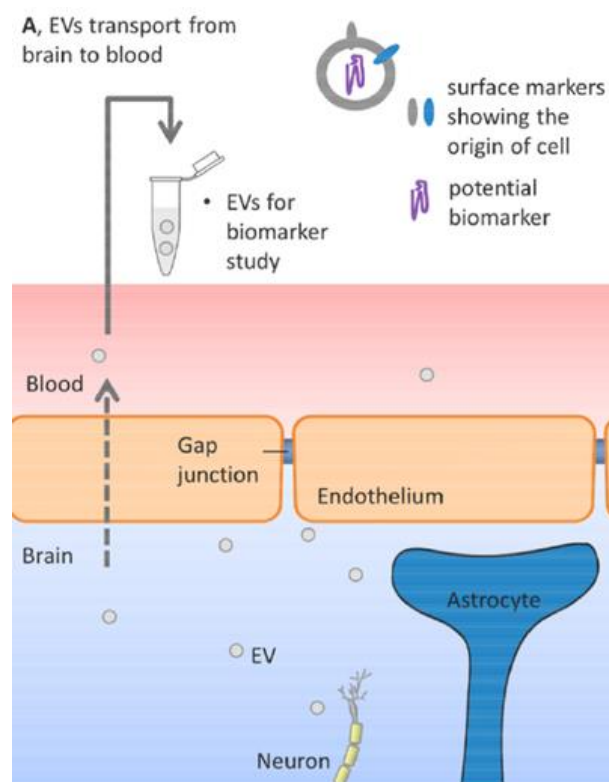


Figura 1. Posibles aplicaciones clínicas que aprovechan la transferencia bidireccional de vesículas extracelulares (VEs) entre el cerebro y la sangre periférica.

Las VEs del sistema nervioso central (SNC), que transportan firmas moleculares específicas de enfermedades del SNC, pueden ser trasladadas desde el cerebro hacia la sangre periférica y aisladas/analizadas mediante marcadores de superficie específicos del SNC o de tipos celulares cerebrales. Su carga de proteínas y ácidos nucleicos probablemente refleja procesos intracelulares patogénicos fundamentales en las células cerebrales de origen, y podría servir como una nueva fuente de biomarcadores para enfermedades del SNC. (Norman et al., 2023)

3. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Aislar y caracterizar las VE de plasma en una cohorte de portadores de una mutación de Alzheimer familiar en diferentes estadios de la enfermedad, y sujetos control no portadores.
2. Comparar el contenido proteico de ApoE en las fracciones de VEs en los diferentes grupos a estudio con el objetivo de identificar posibles diferencias relacionadas con la enfermedad de Alzheimer

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Para el desarrollo de este TFG se han utilizado muestras de plasma EDTA de una cohorte transversal de sujetos portadores de la mutación en el gen que codifica para la proteína Presinilina 1 (PSEN1) E280A, la forma más común de alzhéimer familiar (FAD). Esta mutación consiste en un cambio de glutámico a alanina (E → A) en el codón 280 que altera la función del complejo γ -secretasa, implicado en el procesamiento de APP, favoreciendo la producción de A β 42, y se ha identificado en una gran familia de la región de Antioquia (Colombia), compuesta por unos 6000 familiares consanguíneos, de los cuales más de 1000 son portadores de dicha mutación (Quiroz et al., 2024). Los grupos de nuestro estudio fueron portadores de la mutación sin síntomas (“sanos”), portadores de la mutación con deterioro cognitivo leve (“DCL”) y sujetos controles no portadores de la mutación (“Controles”). Los datos demográficos pueden encontrarse en la Tabla 1.

		Portadores de la mutación PSEN1) E280A	
	Controles no portadores de la mutación	Sanos	DCL
N (mujeres/hombres)	10 (5/5)	20 (10/10)	10 (4/6)
Age (Mediana $\pm$ Desviación típica)	36 $\pm$ 6	50,5 $\pm$ 7	48,5 $\pm$ 6

Tabla 1. Tabla demográfica de la cohorte experimental

4.2 AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PLASMA

Las VE han sido aisladas a partir de 500 μ l de plasma mediante cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, del inglés, *Size Exclusion Chromatography*)

4.2.1 PRE-PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PLASMA

Las muestras de plasma, almacenadas en un ultracongelador -80°C, se descongelaron de manera gradual en un frigorífico de 4°C, y se pre-procesaron mediante dos centrifugaciones seriadas. En primer lugar, se realizó una centrifugación a 2000 x g durante 30 minutos a 4°C para eliminar posibles restos celulares. A continuación, se separó sobrenadante para realizar una centrifugación a 12000 g durante 30 min/4°C para eliminar las VEs grandes o fragmentos celulares. Tras esta centrifugación, se recogió sobrenadante para pasarlo por la columna de SEC. Durante los tiempos de las centrifugaciones se rotularon los tubos Eppendorf necesarios para la recogida de fracciones y filtraron los buffers necesarios para SEC.

4.2.2 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN DE TAMAÑOS (SEC)

Para el aislamiento de las VEs por SEC (Figura 2) se ha usado un colector automático de fracciones para aumentar la reproducibilidad experimental. Específicamente, se ha utilizado el “Automatic fraction collector V2 (AFC)” de la casa comercial Izon.

Es importante calibrar el aparato antes de usarlo. Antes de proceder a la calibración, se debe colocar la columna SEC que se vaya a usar. También hay que tener en cuenta que la columna que se va a usar en el proceso tiene que estar previamente atemperada a temperatura ambiente para su correcto funcionamiento.

Para la calibración, se debe poner un peso de 10 g en el centro de la plataforma donde se pone el carrusel, ya que este usa este peso de referencia para detectar la cantidad que se vierte de la columna con la muestra, en los tubos Eppendorfs que se encuentran el carrusel. También es necesario ajustar donde va a verter el tubo colector las gotas que salen de la columna, para ello, se debe alinear el tubo colector, con una ranura que tiene el carrusel que indica correctamente el punto donde se va a verter el contenido que salga de la columna al tubo Eppendorf de recogida.

Tras la calibración, se colocan en el carrusel, los 13 tubos Eppendorfs necesarios para el fraccionamiento del plasma. En primer lugar, se hace un lavado de la columna, con 17 ml de PBS con ayuda de una pipeta Pasteur.

Una vez preparada la columna, se añadieron, con cuidado de no formar burbuja, los 500 μ l de plasma que habíamos pre-procesado mediante dos centrifugaciones. Una vez que todo el plasma se ha introducido en la columna, se añadieron 7-8 ml de PBS. A medida que el plasma se desplaza por la columna, se van separando los componentes por tamaño, de manera que las partículas de mayor tamaño son las que saldrán primero. Es importante que la parte superior de la columna, nunca se quede seca, ya que esto podría afectar a los resultados. El colector de fracciones generará de manera automática 13 fracciones de 400 μ l. La cantidad de proteína de cada fracción se cuantificó a través del nanodrop. Estas medidas permitieron seleccionar las fracciones ricas en VEs (fracciones 1-4) y descartar las fracciones más ricas en proteínas (fracciones 5-13).

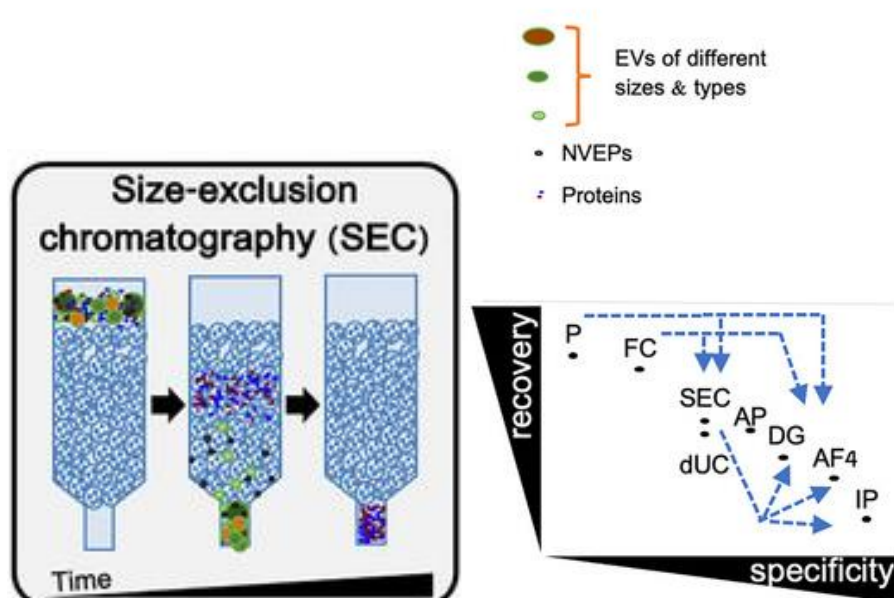


Figura 2. La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) separa las vesículas extracelulares (VEs) por tamaño de muchas (aunque no de todas) las partículas no vesiculares (NVEPs), pero todos los tipos de VEs se recuperan juntos. Esto está relacionado con un cuadro de especificidad y recuperación de las vesículas. (Welsh et al., 2024)

Una vez procesada la primera muestra, se procede a la limpieza de la columna. Cada columna SEC se puede utilizar para 5 muestras de plasma, limpiándola entre muestra y muestra. Se necesitaron 8 días para procesar las 40 muestras de plasma de nuestro grupo experimental, a razón de 5 muestras por día (una columna SEC por día). Para la limpieza de la columna se colocaban en la columna primero, 8.5 ml de hidróxido de sodio 0.5 M para eliminar los restos proteicos que hayan podido quedar atorados en la columna de la muestra anterior. Luego, se vuelve a lavar la columna con 17 ml de PBS y ya estaría lista para el procesamiento de la siguiente muestra.

4.2.3 FORMACIÓN DEL POOL DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN VES Y CONCENTRACIÓN

Las fracciones 1-4, correspondientes a las fracciones más enriquecidas en VEs, se combinaron en un volumen total de 1,6 ml para proceder a su concentración con ayuda de una columna concentradora con 100 Kda de tamaño de poro (Amicon, MerckMillipore). Para ello, los cinco pools de muestras de VEs obtenidos en un día, se centrifugaron en el columna Amicon durante 2 min a 5000 g para reducir el volumen final a aproximadamente 200 µl. En ocasiones se ha tenido que centrifugar alguna que otra muestra 1 minuto más para poder llegar a los 200 µl del volumen. Esto es probablemente debido a la variabilidad interindividual del plasma de cada individuo, con diferentes concentraciones proteicas.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

4.3.1 ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA TOTAL POR NANODROP

Una vez se obtienen las 13 muestras, estas se analizan en un aparato llamado nanodrop, que consiste en un aparato que detecta la cantidad de proteína que hay en cada una de las muestras. Se usa una absorbancia de 280 nm para detectar las proteínas con un sistema de medición de 1 Absorbancia es igual a 1 mg de proteína por ml. Las mediciones se realizaron con 1 μ l de cada fracción para obtener valores de concentración de proteína.

Se ha representado en las figuras 3 y 4, los resultados proporcionados por el nanodrop. Es una representación de los tres grupos de estudio, con una media de cada una de las 13 fracciones. Se puede observar visualmente como de la fracción 1 a la 4 se observa un pico, distintivo a la presencia de vesículas. En un principio se iban a estudiar las primeras 3 fracciones, sin embargo, con estos resultados, se ha llegado a la conclusión de utilizar también la fracción cuatro, aunque pueda suponer en cierto modo un posible riesgo a que la muestra pueda contaminarse con otras sustancias del plasma que no sean de interés. A partir de la fracción 5, la concentración de proteínas asciende cada vez más hasta llegar a la última fracción.

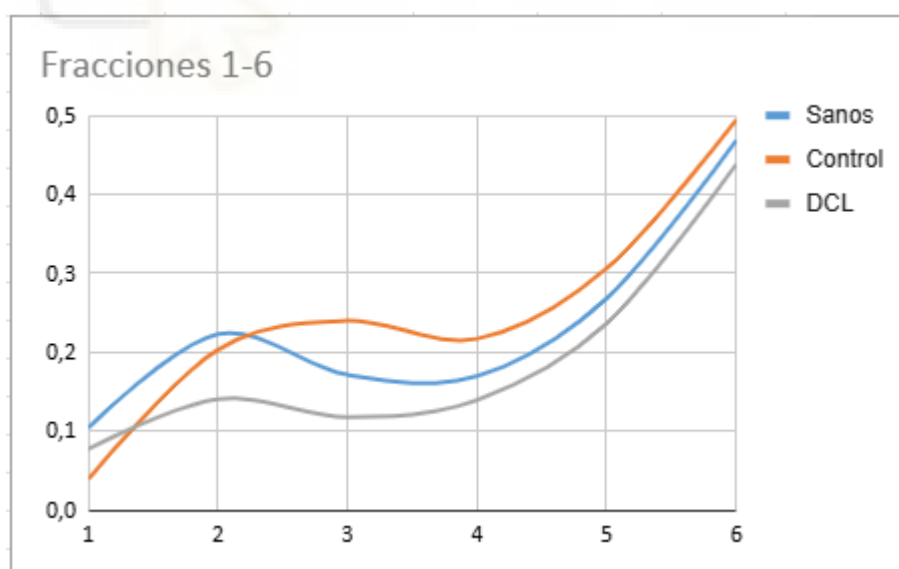


Figura 3. Fracciones 1-6 nanodrop

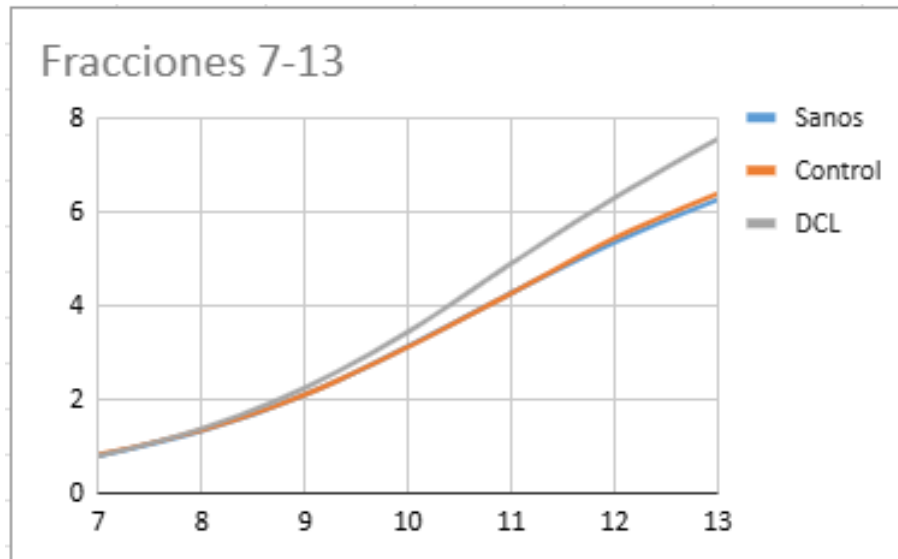


Figura 4. Fracciones 7-13 nanodrop

4.3.2 WESTERN BLOT

Para caracterizar las VEs utilizamos western blot para la detección de las proteínas CD9 y CD63, proteínas transmembranas frecuentes en las VEs. Para ello, hemos utilizado anticuerpos específicos anti-CD9 y anti-CD63.

- **Procedimiento llevado a cabo en el Instituto de investigación sanitaria y biomédica de Alicante (ISABIAL)**

BUFFERS

- **1xTris/glycine/SDS Running Buffer (2L)**
Del Stock 10X Biorad: 200 ml Stock + 1800 ddH₂O
- **Transfer Buffer para el Trans-Turbo (transferencia semiseca rápida) (500 ml)**
Del Stock Trans-Blot 5X: 100ml Stock + 100ml Ethanol + 300 mL ddH₂O to
- **TBS 1x (500 ml)**
50 ml TBS 10x + 450 ml H₂O
- **TBS-Tween 1x (500 ml)**
50 ml TBS 10x + 450 ml ddH₂O + 500 µl Tween (viscoso) y mezclar bien por agitación o con ayuda magnética.
- **No Stain Labeling Buffer**
10 mL Labeling Buffer in 1x (0,5 mL No Stain labeling buffer 20x + 9,5 mL UltraPure water (MILLI Q), 20 µl No-Stain Activator y 20 µl No-Stain Derivatizer

1. Preparación de muestras para Western blot

Primero se preparan las alícuotas de 20 µl del pool de fracciones 1-4 concentradas en sample buffer 6x (4µl). Se hace un spin a cada una y se lleva a calentar a 96 grados unos 5 minutos. Después de los 5 minutos se les hace otro spin rápido estando listas para cargarlas en los geles para la electroforesis.

2. Electroforesis

Las alícuotas se cargaron en un gel del 10% "TGX kit bio-rad - No Stain Free". Al ser un gel precast, primero hay que asegurarse de quitar la cinta protectora de la base del gel y usar las herramientas correspondientes para quitar el peine para que los pocillos queden derechos. Montamos el set para la electroforesis, poner running buffer hasta un poco más de la mitad procurando que el hueco entre los dos geles esté lleno del todo y que no baje el nivel. A continuación, usando las puntas para western blot, vertemos las alícuotas en cada pocillo. La electroforesis se dejó 15 minutos a 80 volts para dejar pasar la muestra al gel, y luego a 200 voltios hasta que salga el frente de los geles.

3. Transferencia a membrana de PVDF

Se preparó el buffer transfer de 2 litros en una probeta de 2 litros con 200ml de tris glicina, 100 ml de metanol, 1 ml de SDS y luego se enrasa hasta llegar a 2000 ml con agua fría. Para la transferencia, se usó una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.45 μm y baja fluorescencia. Recordar activar la membrana con etanol durante 2 minutos, una vez pasados los dos minutos, retirar la membrana y añadir H_2O agitando durante unos segundos, hasta que la membrana deje de flotar.

Se humedece el aparato con líquido de transferencia por la superficie donde se coloca el sándwich. Para montar la transferencia se siguió el orden de la imagen de abajo (Figura 5) Se coloca un papel humedecido en tampón de transferencia encima de donde se ha humedecido el aparato, encima de este papel, se coloca la membrana de PVDF, encima de la membrana se coloca el gel donde están las proteínas ya separadas. Para finalizar, se coloca otro papel grueso humedecido sobre el gel, formando así el sandwich. Se pasa un rodillo sobre el sandwich, para asegurar que no haya burbujas en la preparación. Cerramos el aparato de electro transferencia semiseca y se conectan los electrodos a una fuente de alimentación. La transferencia se realizó en 10 minutos con 25 volts.

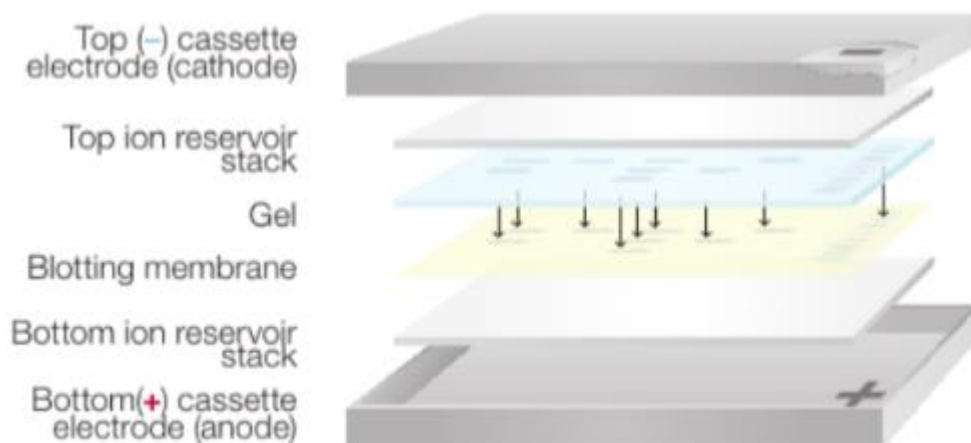


Figura 5. Montaje del sandwich en una transferencia semiseca

4. Bloqueo

Se bloquea la membrana con Everyblot 7 ml durante 5 minutos en agitación para asegurar que nada se una a las membranas y dejar paso libre a los anticuerpos. Justo después de bloquear, si es necesario, cortamos la membrana horizontalmente por una

zona determinada para después poder analizar cada sección con el anticuerpo correspondiente a la proteína que se encuentra en esa sección de la membrana.

5. Poner anticuerpo primario

Colocar anticuerpos primarios preparados en 7ml de Everyblot *overnight* a 4 grados en agitación. Al día siguiente, se recupera la solución de anticuerpo primario y se indica su uso.

6. Poner anticuerpo secundario

Se hacen tres lavados de entre 5 y 10 minutos con *tris-buffered saline-tween* (TBS-T). Centrifugar el anticuerpo secundario con un spin rápido y diluirlo en 7ml de TBS-T con 0.35 gramos de leche bien disuelta. Incubar el anticuerpo secundario. Posteriormente lavar 2 veces durante 10 minutos con TBS-T para membranas con anticuerpo secundario HRP Rabbit/Goat o 3 veces para membranas con HRP Mouse/Rat, seguido de dos lavados con TBS durante 10 minutos.

7. Tinción membrana Stain free

Lavar la membrana 2 veces con agua miliQ durante 2 min en agitación (60rpm). Agregar a los 10ml de Labeling Buffer 20ul de No-Stain Activator seguidos de 20ul de No-Stain Derivatizer y mezclar antes de aplicarlo a la membrana. Incubar la membrana con el Labeling Buffer durante 10 min en agitación. Lavar la membrana 3 veces con agua miliQ durante 2 min en agitación.

8. Revelado con quimioluminiscencia

Preparar la solución de revelado en un volumen de 4 ml por membrana completa. Inmediatamente antes de aplicarla porque uno de los reactivos es sensible a la luz (colocarlo de último). Colocar la membrana en una superficie plana (sobre plástico), y agregar la solución de revelado poco a poco asegurándose de esparcir bien, gota a gota, la solución sobre toda la superficie de la membrana. Una vez depositada, comprobar que cubre correctamente toda la membrana y dejarla durante 5 min en oscuridad.

Retirar el excedente de reactivo de la membrana con ayuda de un papel absorbente y colocar la membrana entre dos trozos de Parafilm. Sobre el parafilm, pasar suavemente un papel o rodillo para eliminar burbujas y posibles restos de reactivo. Revelar por quimioluminiscencia en el Chemidoc de Bio-Rad.

• Procedimiento utilizado en el Instituto de Neurociencias de San Juan

BUFFERS

- **1xTris/glycine/SDS Running Buffer (2L)**
Del Stock 10X Biorad: 200 ml Stock + 1800 ddH₂O
- **Buffer transfer (2L)**
200 ml de tris glicina, 100 ml de metanol, 1 ml de SDS y llenará hasta 2 L con agua fría.
- **No Stain Labeling Buffer**
10 mL Labeling Buffer in 1x (0,5 mL No Stain labeling buffer 20x + 9,5 mL UltraPure water (MILI Q), 20 µl No-Stain Activator y 20 µl No-Stain Derivatizer

GEL CASERO DEL 10%

Composición del Gel casero al 10%	
Tris-Base 1.5M	2.5 ml
SDS 10%	100ul
Acrilamida 30%	3.34 ml
H ₂ O	4 ml
APS 10%	50 ul
TEMED	12ul

Tabla 2 Gel casero al 10%

1. Preparación de muestras para Western blot

Primero se preparan las alícuotas de 20 ul del pool de fracciones 1-4 concentradas en sample buffer 6x (4ul). Se hace un spin a cada una y se lleva a calentar a 96 grados unos 5 minutos. Después de los 5 minutos se les hace otro spin rápido estando listas para cargarlas en los geles para la electroforesis.

2. Electroforesis

Las alícuotas se cargaron en un gel casero del 10% (Tabla 2). Montamos el set para la electroforesis, poner running buffer hasta un poco más de la mitad procurando que el hueco entre los dos geles esté lleno del todo y que no baje el nivel. A continuación, usando las puntas para western blot, vertemos las alícuotas en cada pocillo. La electroforesis se dejó 15 minutos a 80 volts para dejar pasar la muestra al gel, y luego a 200 voltios hasta que salga el frente de los geles.

3. Transferencia a la membrana

Se preparó el buffer transfer de 2. Para la transferencia, se usó una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.45 um y baja fluorescencia. Recordar activar la membrana con etanol durante 2 minutos, una vez pasados los dos minutos, retirar la membrana y añadir H₂O agitando durante unos segundos, hasta que la membrana deje de flotar. Si usamos una membrana de nitrocelulosa, no hace falta activarla.

El montaje del sandwich de la transferencia se realiza como se indica en la imagen (Figura 6). Tanto las esponjas como los papeles whatman se humedecen con buffer transfer. En una bandeja se coloca un poco de buffer transfer y la base donde se va a hacer el sandwich. Primero colocamos una de las esponjas, luego, dos papeles whatman, posteriormente colocamos el gel y la membrana encima. El gel y la membrana se tapan con dos papeles whatman y otra esponja respectivamente. Tener en cuenta el uso de un rodillo para quitar las posibles burbujas que puedan aparecer en el sandwich. Se cierra el sandwich y se coloca en el set de la transferencia con un bloque de hielo. Se llena el set de buffer transfer hasta un poco más de la mitad. Se enchufan los electrodos a la fuente y se deja la transferencia 1 hora a 4 grados con un voltaje de 200 volts.

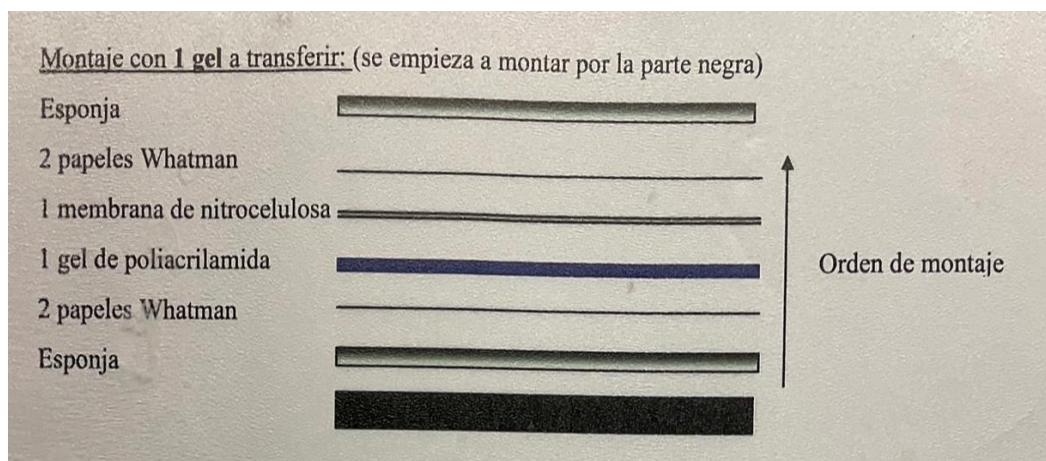


Figura 6. Montaje de sandwich de transferencia húmeda

4. Bloqueo

Se bloquea la membrana con un poco más de 5 ml de buffer blocking durante 1 hora en agitación para asegurar que nada se una a las membranas y dejar paso libre a los anticuerpos. Justo después de bloquear, si es necesario, cortamos la membrana horizontalmente por una zona determinada para después poder analizar cada sección con el anticuerpo correspondiente a la proteína que se encuentra en esa sección de la membrana.

5. Poner anticuerpo primario

Colocar anticuerpos primarios preparados en 7ml de buffer blocking *overnight* a 4 grados en agitación. Al día siguiente, se recupera la solución de anticuerpo primario y se indica su uso.

6. Poner anticuerpo secundario

Se hacen tres lavados de entre 5 y 10 minutos con PBS 1x. Centrifugar el anticuerpo secundario con un spin rápido y diluirlo en 4 ml de buffer blocking para anticuerpos. Incubar el anticuerpo secundario. Posteriormente lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS 1x.

7. Tinción membrana Stain free

Se recoge la membrana y se lava dos veces con agua mili Q 20 ml durante 2 minutos. Después del segundo lavado, se tiñe la membrana con 10 ml de No-Stain. Después se lava otra vez con agua mili Q 20 ml 3 veces. Se mide la cantidad de proteínas con el aparato ibright para medir la cantidad de proteínas que hay en la membrana.

8. Revelado con fluorescencia (Odissey)

4.3.3 PROTOCOLO WESTERN BLOT DEFINITIVO PARA EL ANÁLISIS DE VES

Este protocolo de western blot es el resultado de todas las pruebas realizadas, siendo este en más eficiente a la hora de conseguir buenos resultados en la técnica de caracterización.

Protocolo	
Proteína cargada en cada celdilla	Cargada por volumen
Anticuerpos primarios usados (preparados en EveryBlot (Biorad) blocking buffer)	- CD63 Ivtrogen - CD63 Mouse - Apoe Goat
Composición del gel	10% TGX Kit Bio-Rad – No Stain Free
Running buffer	Tris-Glycine SDS
Especificaciones del marcador	NZYBlue Protein Marker
Electroforesis	1. 15-20 min a 80 volts 2. 30 min a 200 volts
Transferencia	25 volts 10 minutos semi seca
Membrana	PVDF 0.45 um de baja fluorescencia
Anticuerpos secundarios (preparados en leche (5% p/v))	- Anti-CD63 Mouse - Anti-CD63 Mouse peroxidasa de rábano picante (HRP) - Anti-ApoE Goat - Anti- ApoE Goat HRP

Tabla 3. Características del protocolo de los sets

4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE IMAGE J (FIGI)

A través del programa ImageJ se cuantificaron las bandas correspondientes a las proteínas de interés

Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1. Apertura de la imagen

Se abrió la imagen de interés en formato *JPG* mediante el software correspondiente.

2. Rotación de la imagen

Para asegurar una correcta alineación horizontal de las bandas, se rotó la imagen mediante *Imagen → Transformar → Rotar*, introduciendo el ángulo necesario para nivelarlas.

3. Selección del área de interés

Utilizando la herramienta *Rectángulo*, se dibujó un marco que abarcara de forma precisa todas las bandas de la imagen, procurando un encuadre lo más ajustado posible.

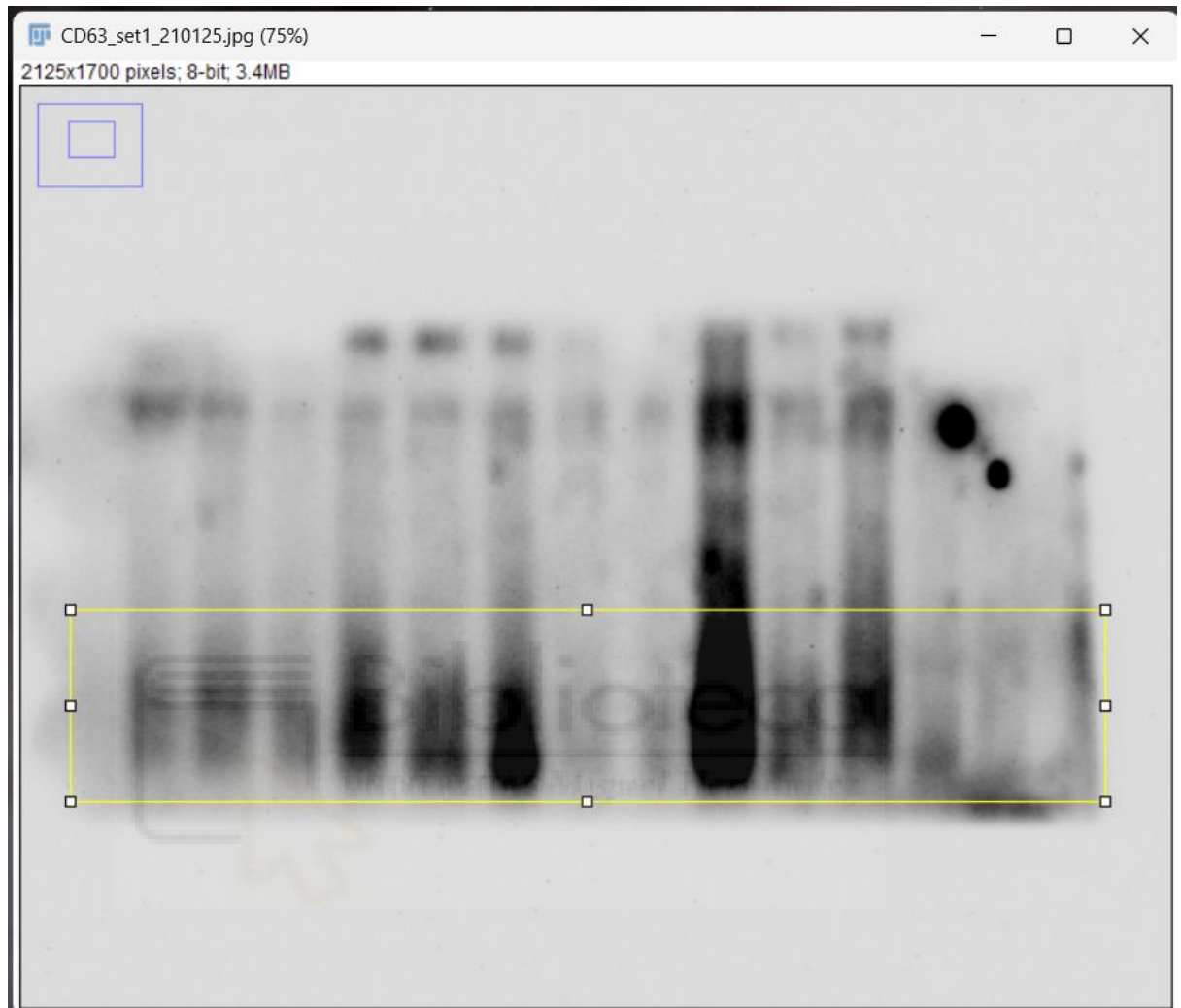


Figura 7. Selección del área de interés en FIJI

4. Selección del área para cuantificación

Se presionó **Ctrl + 1** para fijar el área seleccionada como la región a cuantificar.

5. Generación del perfil de intensidad

A continuación, se generó la gráfica de intensidad de las bandas mediante la combinación de teclas **Ctrl + 3**, lo que permitió visualizar los picos correspondientes a cada banda.

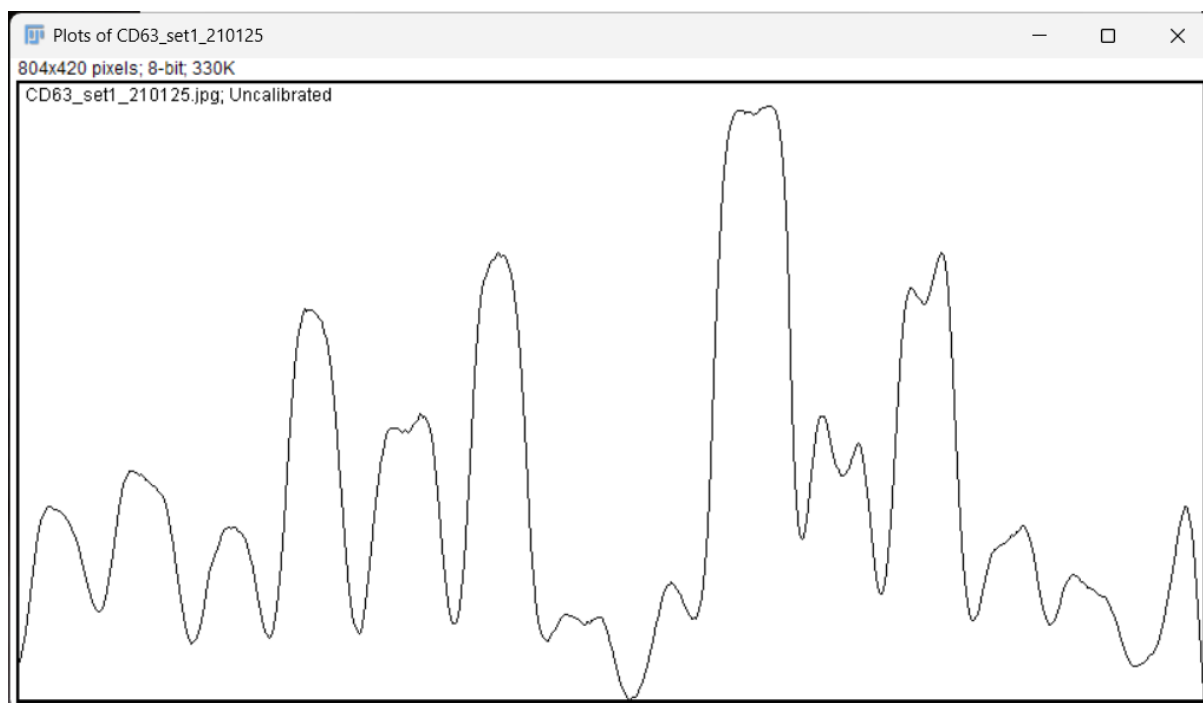


Figura 8. Generación del perfil de intensidad en FIJI

6. Separación de las bandas individuales

Se empleó la herramienta *Línea recta (Straight)* para trazar líneas verticales entre las curvas de los picos, delimitando cada banda individualmente. Para asegurar líneas completamente rectas, se mantuvo presionada la tecla **Shift** durante su trazado.

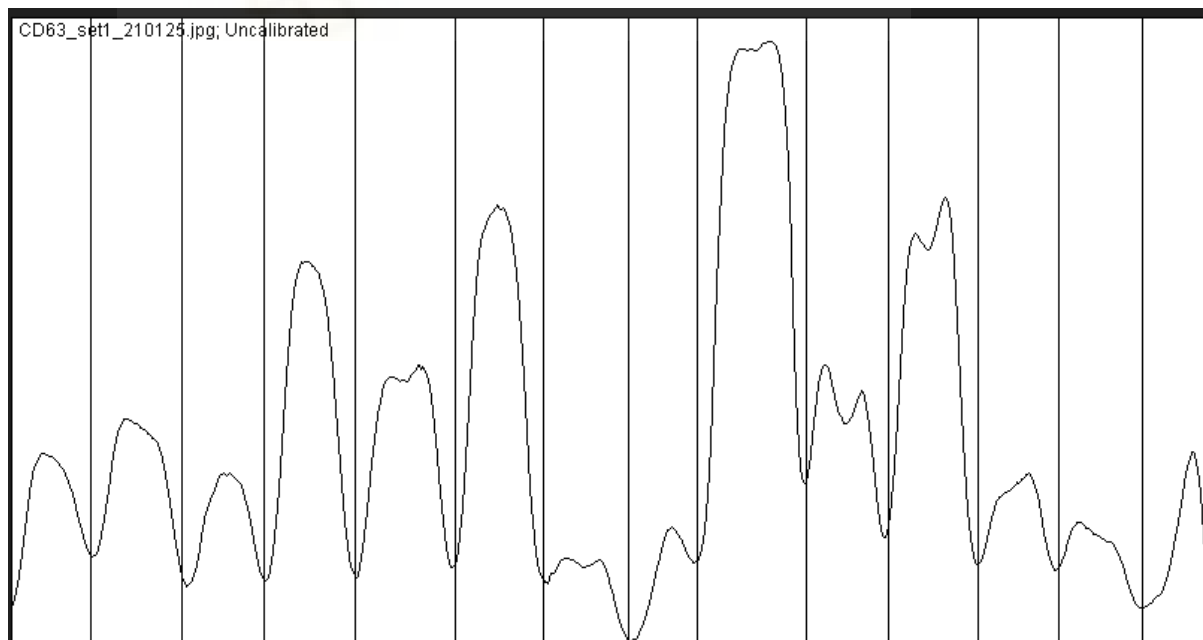


Figura 9. Separación de las bandas

7. Selección del área bajo la curva

Con la herramienta *Varita mágica (Wand)*, se seleccionó el área correspondiente a cada banda (bajo cada pico de la gráfica).

8.

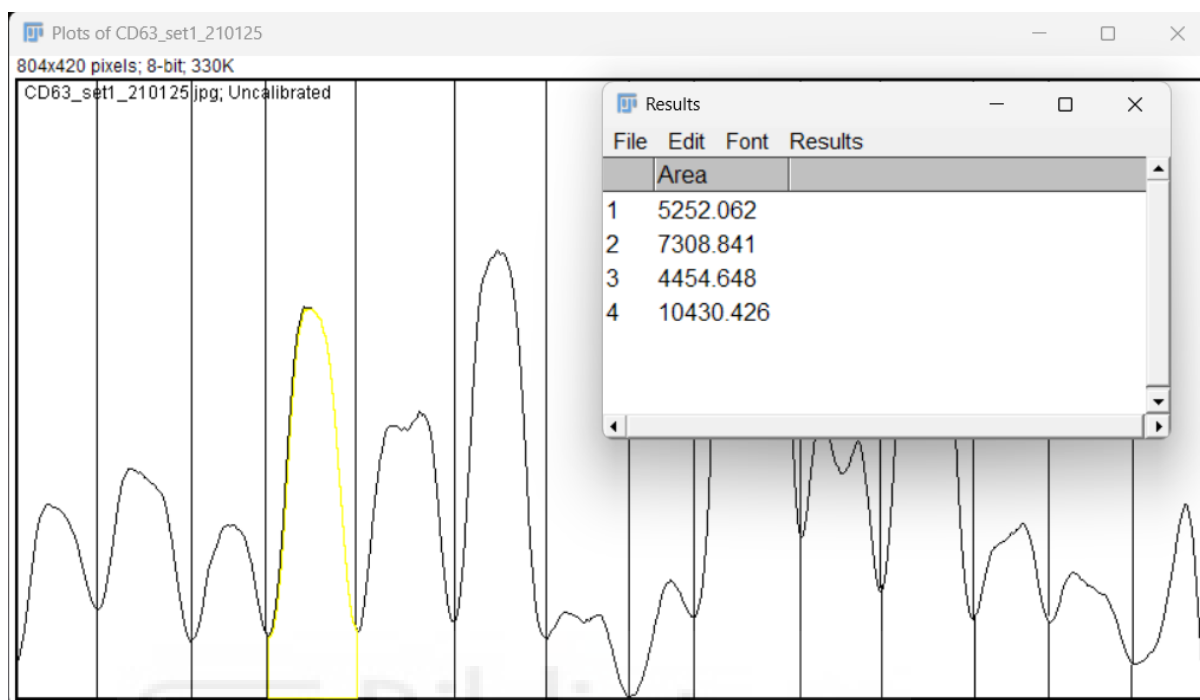


Figura 10. Selección del área bajo la curva en FJI

9. Exportación de resultados

Los valores obtenidos se guardaron desde la ventana de resultados en formato de texto plano (.txt).

10. Preparación de los datos

El archivo de texto fue abierto y editado para sustituir los puntos decimales por comas, utilizando la opción *Edición → Sustituir (Ctrl + H)*, a fin de adaptarlo al formato numérico europeo.

11. Importación a Excel

5. Resultados

5.1 CARACTERIZACIÓN DE VES Y SELECCIÓN DE LAS FRACCIONES 1-4

Durante las primeras semanas se realizaron una serie de pruebas para corroborar la eficiencia del protocolo de aislamiento de VEs utilizando la técnica de Western blot.

5.1.1 Prueba 1

La prueba se realizó en el instituto de Neurociencias de San Juan. En este primer contacto con la metodología, se realizó la electroforesis de muestras del fraccionamiento de un plasma control en un gel precast de 4-15%. A continuación, se realizó una transferencia overnight de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Las muestras siguieron el orden que se muestra en la tabla 2:

Contenido de los pocillos de cada gel	
GEL 1	Marker - P12K - Pool - 1 - 2- 3 - 4 - 5 - 6 - 7
GEL 2	Marker Plus - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - M

Tabla 4. Contenido de los pocillos de la prueba 1. P12K corresponde al pellet que se obtiene durante la centrifugación a 12000 g.

Una vez transferidas las proteínas, la membrana se cortó en tres secciones distintas que se incubaron overnight con anticuerpos primarios de Alix (parte superior), CD63 (parte central) y CD9 (parte inferior) diluidos en blocking buffer a 1:1000. Se utilizaron anticuerpos secundarios fluorescentes anti-rabbit para CD9, y anti-mouse para Alix y CD63, todos a una dilución de 1:7500.

Resultados de la prueba 1

A través de la tinción de la proteína total con el reactivo stain free (Figura 7), se observaron las diferencias. Cuanto a la cantidad de proteínas en las fracciones. Las primeras tienen una cantidad pequeña de proteínas, mientras que las últimas muestras presentan gran cantidad de estas. Esto indica, que se ha realizado correctamente el fraccionamiento del plasma mediante SEC.

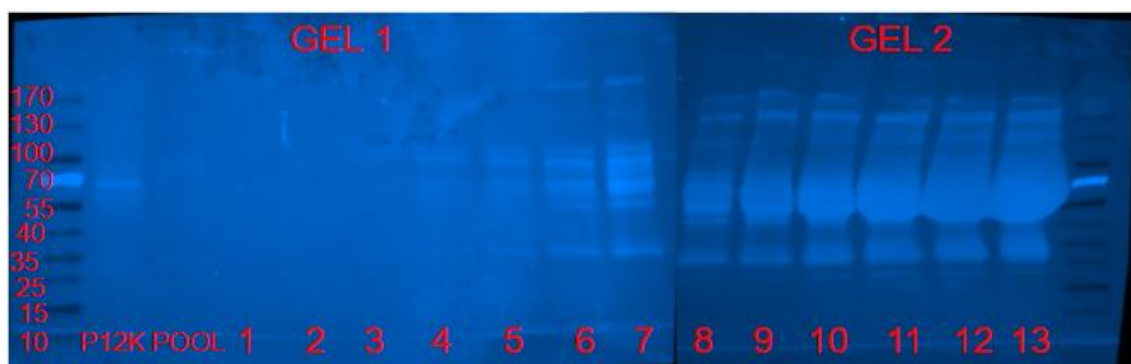


Figura 11. Stain free de los dos geles de la prueba 1 visualizado con el sistema iBright de ThermoFisher Scientific

Como se puede observar en las imágenes de los western blot analizados por el odyssey (Figuras 8, 9 y 10), no se han podido detectar marcadores de VEs en las fracciones 1-4), mientras que en las fracciones más enriquecidas en proteínas obtenemos señal que puede corresponderse a señal no específica. A través de esta prueba 1, no pudimos corroborar la eficiencia del método

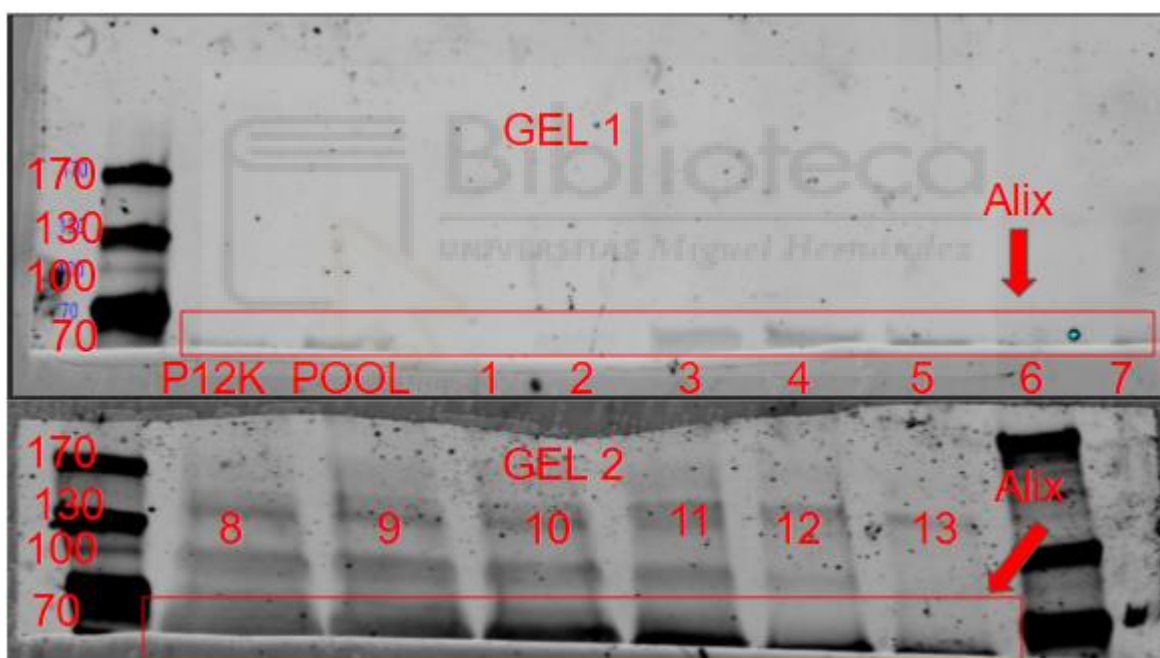


Figura 12. Western blot de Alix (90-95Kda) de los dos geles en la prueba 1

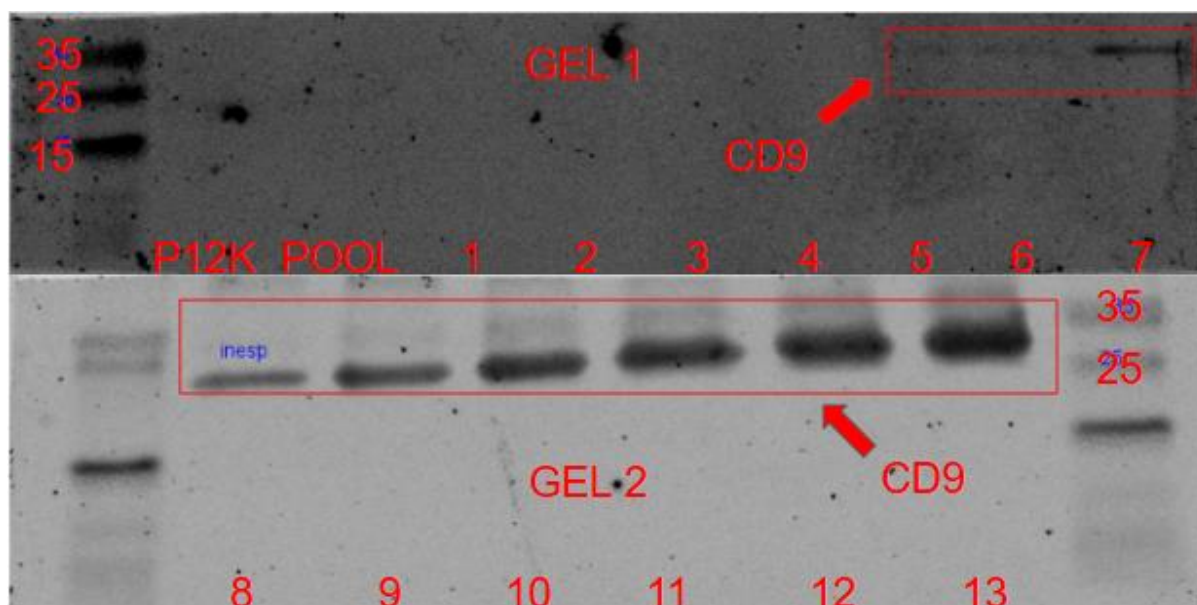


Figura 13. Western blot de CD9 (20-25 Kda) de los dos geles en la prueba 1



Figura 14. Western blot de CD63 (40-60Kda) de los dos geles en la prueba 1

5.1.2 Prueba 2

La prueba se realizó en el instituto de Neurociencias de San Juan. Esta prueba se realizó en las mismas condiciones experimentales que la prueba 1.

Resultados de la prueba 2

Los resultados de esta prueba resultaron bastante similares a la anterior, El proceso de aislamiento parece funcionar correctamente pero hay problemas con los western blots.

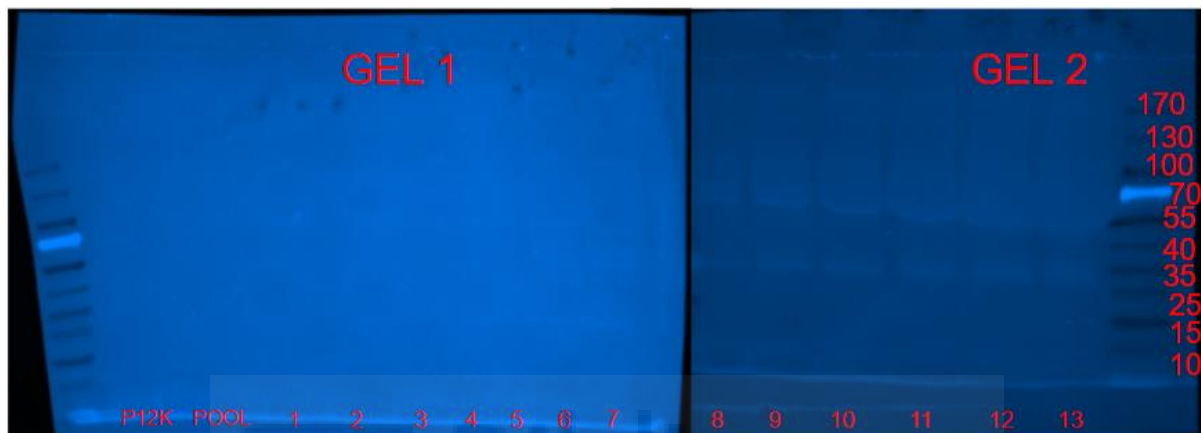


Figura 15. Stain free de los dos geles de la prueba 2

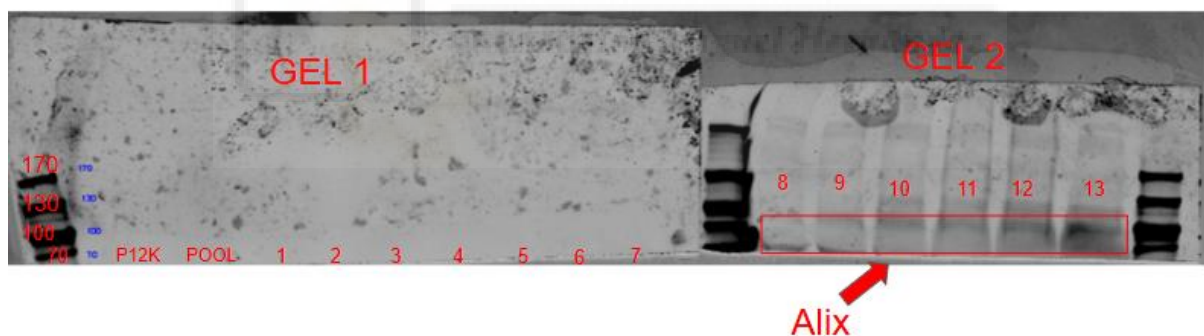


Figura 16. Western blot de Alix (90-95Kda) de los dos geles en la prueba 2

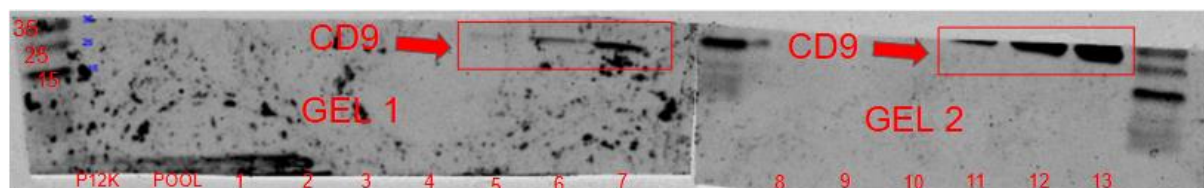


Figura 17. Western blot de CD9 (20-25 Kda) de los dos geles en la prueba 2

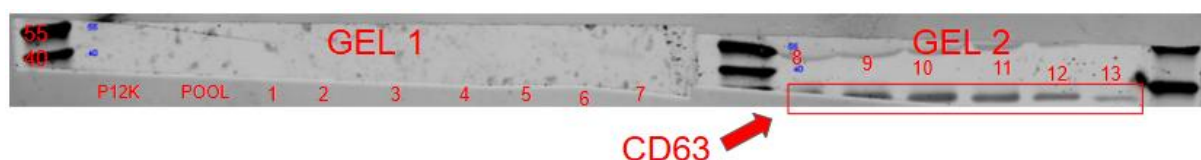


Figura 18. Western blot de CD63 (40-60Kda) de los dos geles en la prueba 2

5.1.3 Prueba 3

Esta prueba se realizó en el instituto de investigación sanitaria y biomédica de Alicante (ISABIAL). En esta prueba se utilizaron las fracciones de SEC de un plasma control. Se utilizó un gel precast de 12 pocillos de la casa comercial NZY, se hizo una transferencia semiseca de 15 minutos, y se reveló con quimioluminiscencia usando una membrana de PVDF. Este experimento se realizó para comprobar si en estas condiciones, CD9 podía detectarse en las fracciones enriquecidas en VEs. La concentración del anticuerpo secundario fue de 1:750 y se diluyó en una solución al 5% de leche en polvo desnatada. Las muestras se organizaron en el gel que se especifica en la tabla 5:

Contenido de los pocillos del gel											
Marker - P12K - Pool - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9											

Tabla 5. Contenido de los pocillos de la prueba 3

Resultados de la prueba 3

En la imagen (Figura 15) se observan las bandas correspondientes a CD9 en las primeras fracciones resultantes de la columna SEC: fracciones 1-4. Además, se observa que alícuota correspondiente al pool de las fracciones 1-4 tiene mayor intensidad para CD9. A través de esta prueba hemos podido corroborar que el método de aislamiento de VEs está funcionando bien.

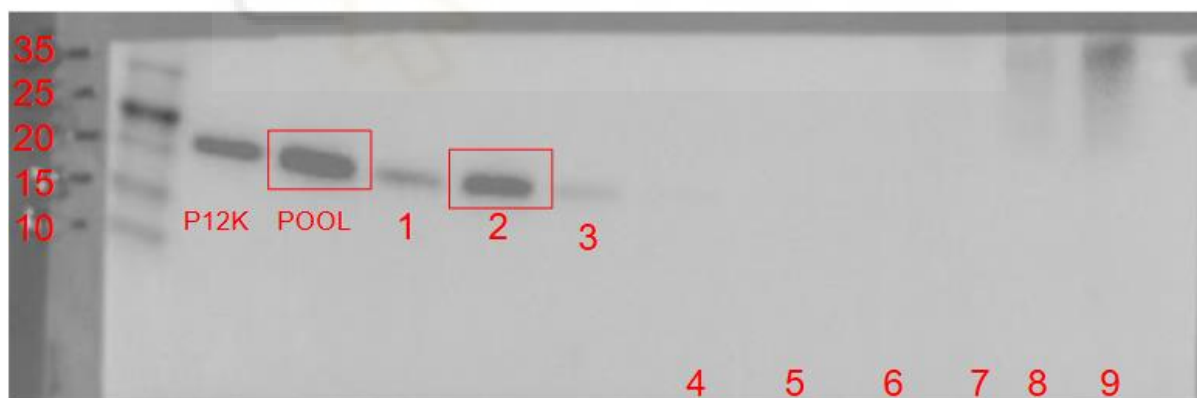


Figura 19. Western blot de CD9 (20-25 Kda) prueba 3

5.1.4 Prueba 4

Con el objetivo de identificar el problema que no nos estaba permitiendo detectar CD9 en las pruebas 1 y 2, se compararon cara a cara dos ensayos de Western blot realizados en paralelo con dos tipos de membranas, la membrana de nitrocelulosa, y la membrana de PVDF, con el objetivo de averiguar cuál da mejores resultados. Para este experimento, se usaron las fracciones de muestras de plasma control y se hizo un gel casero de un 10% con 10 pocillos. Las muestras se organizaron en el gel de esta manera:

Contenido de los pocillos del gel
M - P12k - Pool - 8 - M - P12k - Pool - 8 - M

Tabla 6. Contenido de los pocillos de la prueba 4

La transferencia se hizo con la mitad de una membrana de nitrocelulosa y la otra mitad de PVDF. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron en cada una fueron de CD9 y Alix, ambos diluidos a 1:1000 con buffer.

Resultados de la prueba 4

Se pudo observar Alix y CD9 sobre todo el P12K, correspondiente a VEs de mayor tamaño. En la membrana de nitrocelulosa también se pudo observar Alix el pool de VEs y en la fracción 8, aunque con menor intensidad que en el P12K.

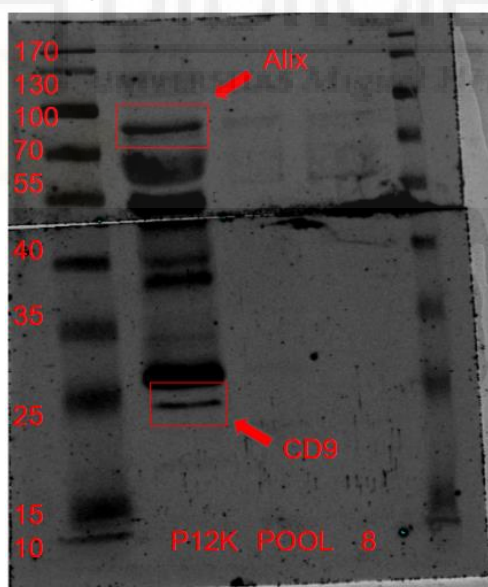


Figura 20. western blot de Alix (90-95Kda) y CD9 (20-25 Kda) en membrana de nitrocelulosa

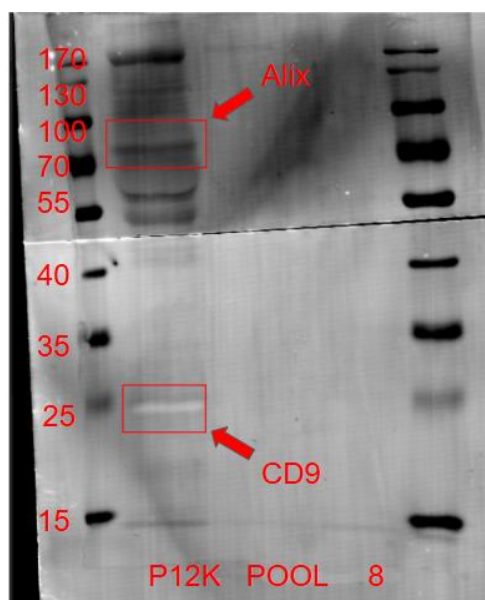


Figura 21. western blot de Alix (90-95Kda) y CD9 (20-25 Kda) en membrana PVDF

5.1.5 Prueba 5

Esta quinta prueba se realizó en el Instituto de Neurociencias de San Juan. El objetivo de esta prueba, fue determinar si es posible detectar ApoE en las fracciones SEC derivadas de suero El gel 1 contiene las fracciones individualizadas de la 1 a la 13, mientras que el gel dos contiene P12K de las 13 fracciones del gel 1, un pool con las fracciones 1, 2 y 3 que han sido concentradas utilizando un filtro Amicon. La siguiente muestra, es un pool con fracciones 1,2 y 3 que se han concentrado mediante ultracentrifugación a 100.000 g para eliminar la mayor parte de proteína soluble presente. La penúltima muestra es un pellet ultracentrifugado y la última muestra es el sobrenadante resultante de la ultracentrifugación..

Contenido de los pocillos de cada gel	
GEL 1	Marker-1B-2B-3B-4B-5B-6B-7B-9B-8B-10B-11B-12B-13B- Marker
GEL 2	Marker - P12K - PoolSec+Amicon - PoolSec+Ultra - UC - SNUC - Marker

Tabla 7. Contenido de los pocillos de la prueba 5

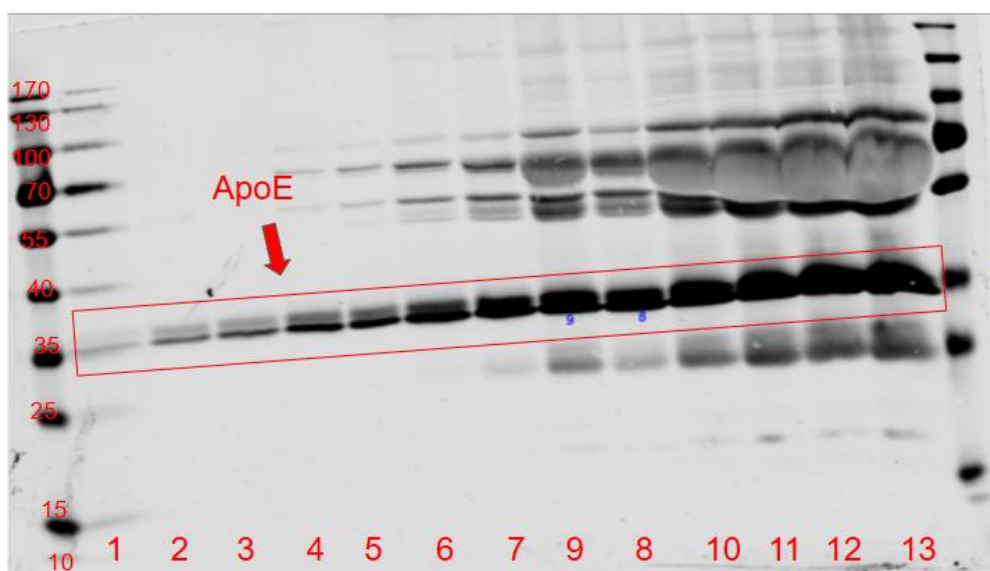


Figura 22. western blot ApoE gel 1 prueba 5

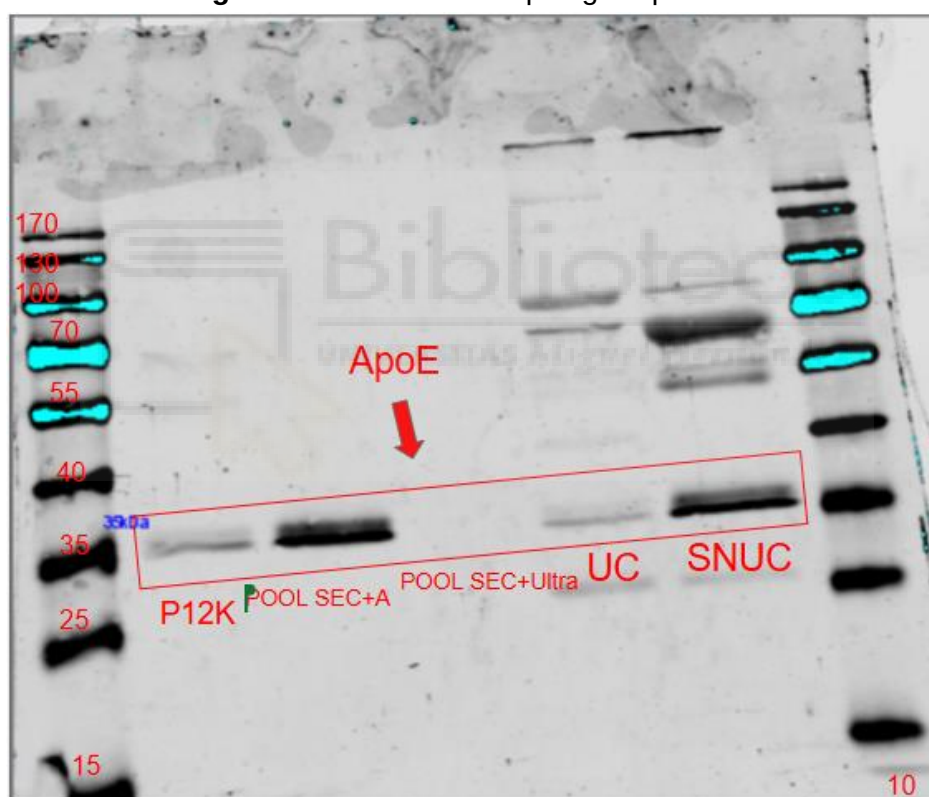


Figura 23. Western blot ApoE gel 2 prueba 5

En la primera imagen (Figura 18), se puede observar como ApoE está presente en las 13 fracciones, de manera que ApoE también está presente en las fracciones donde hay ApoE.

En la siguiente imagen (Figura 19), se observa ApoE en representan las diferentes formas de aislamiento de VEs. La fracción de pool SEC con un concentrado con Amicon contiene una gran cantidad de ApoE en comparación con los métodos de SEC seguido de ultracentrifugación, o ultracentrifugación.

5.2 WESTERN BLOTS DE LAS MUESTRAS DE VES DE LA COHORTE DE ESTUDIO

En la imagen de abajo (figura 20) se muestra las diferencias entre una muestra tratada con condiciones reductoras, hay una gran cantidad de proteínas de bajo peso molecular al romper las vesículas comparado con las muestras sin estas condiciones. Se verá lo que hay tanto fuera como dentro de las vesículas, aunque también existirán proteínas pertenecientes al plasma que no se hayan podido aislar por completo.

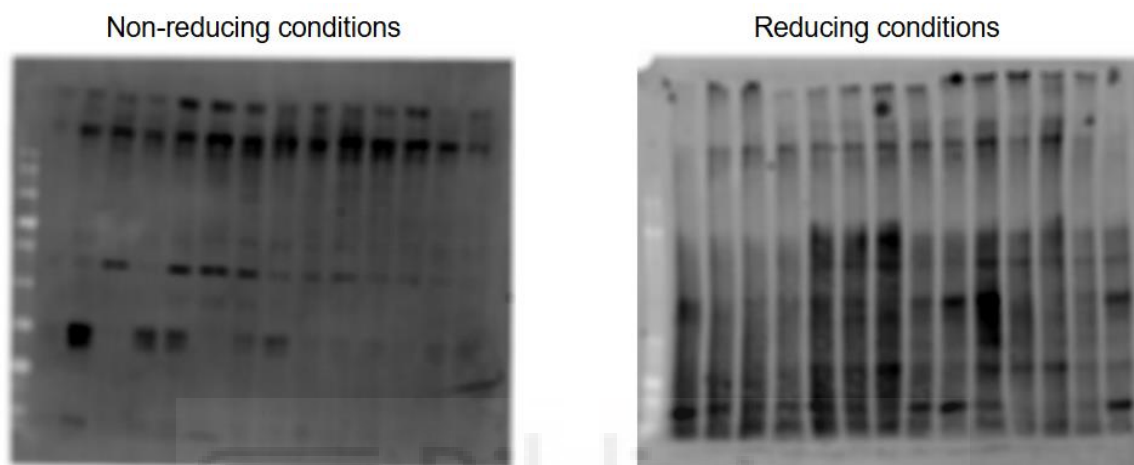


Figura 24 Stain free condiciones no reductoras y condiciones reductoras del set-1

5.2.1 SET-1 MUESTRAS

- Condiciones no reductoras (CD63)

Para la detección mediante quimioluminiscencia, se empleó un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con HRP, diluido a una concentración de 1:15,000 en una solución de leche al 5% en peso/volumen.

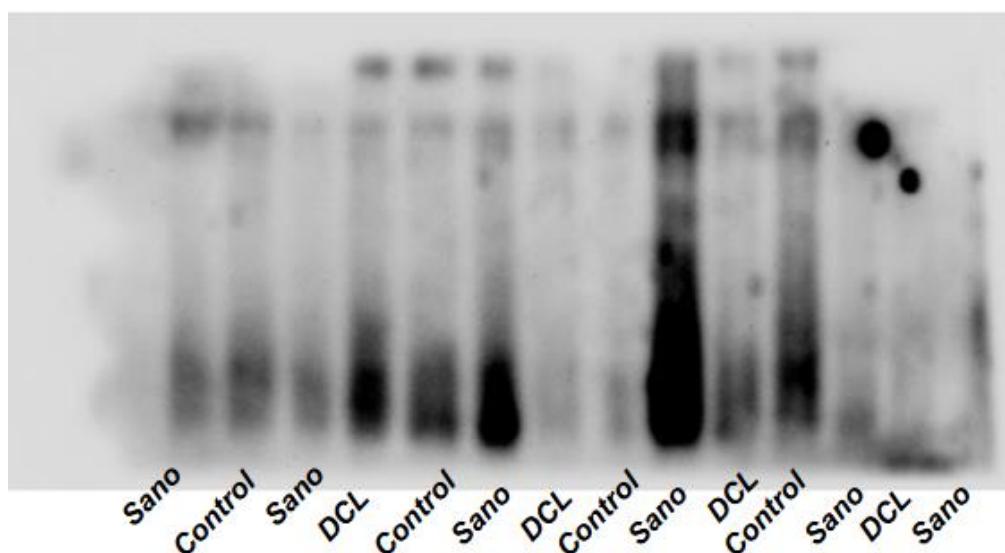


Figura 25. Western blot de suero en condiciones no reductoras con anticuerpo CD63

- Condiciones reductoras (APOE)

Para la detección mediante anticuerpo secundario, se empleó un anticuerpo anti-goat diluido a una proporción de 1:7000. Este anticuerpo fue preparado en una solución de leche al 5% en peso/volumen.

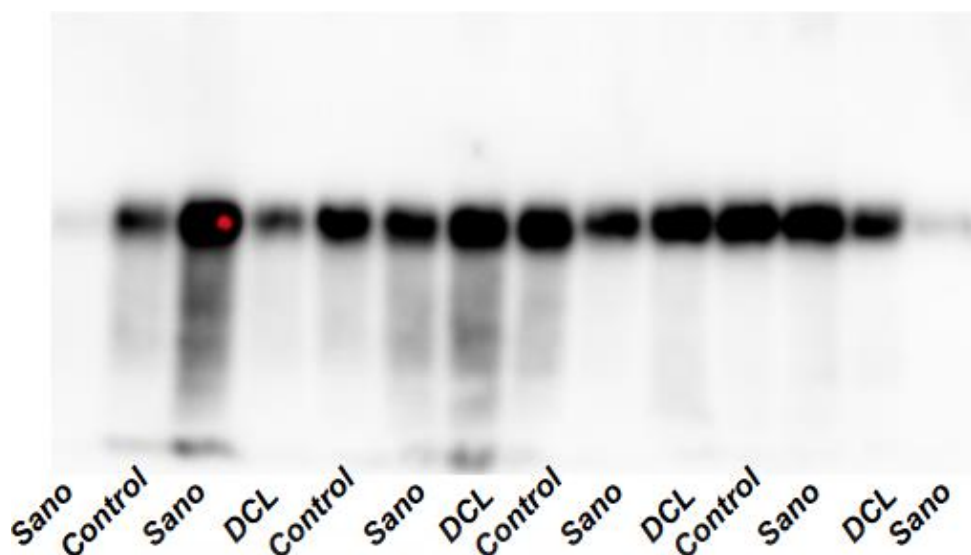


Figura 26. Western blot de suero en condiciones reductoras con anticuerpo APOE

5.2.2 SET-2 MUESTRAS

- Condiciones no reductoras (APOE)

Para la detección, se empleó un anticuerpo secundario anti-goat conjugado con HRP, diluido a una proporción de 1:10,000 en una solución de leche al 5% en peso/volumen.

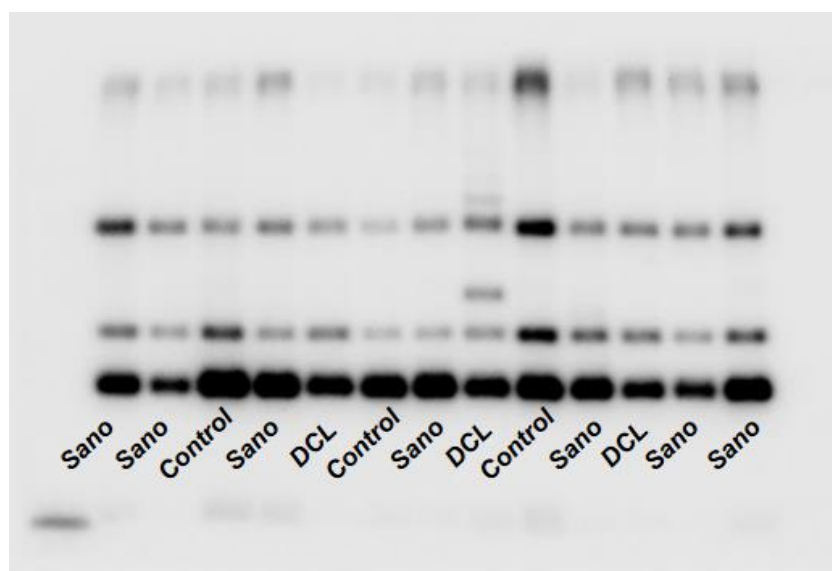


Figura 27. Western blot de suero en condiciones no reductoras con anticuerpo APOE

- **condiciones reductoras (CD63)**

Para la detección de las proteínas marcadas, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con HRP. El anticuerpo anti-mouse fue diluido a una concentración de 1:15,000. Fue preparado en una solución de leche al 5% en peso/volumen.

Posteriormente, esta membrana se utilizó para una incubación con el objetivo de detectar APOE en la membrana. Se usó el anticuerpo primario APOE de cabra (Goat) y el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con HRP, diluido 1:10.000 en leche al 5% (peso/volumen).

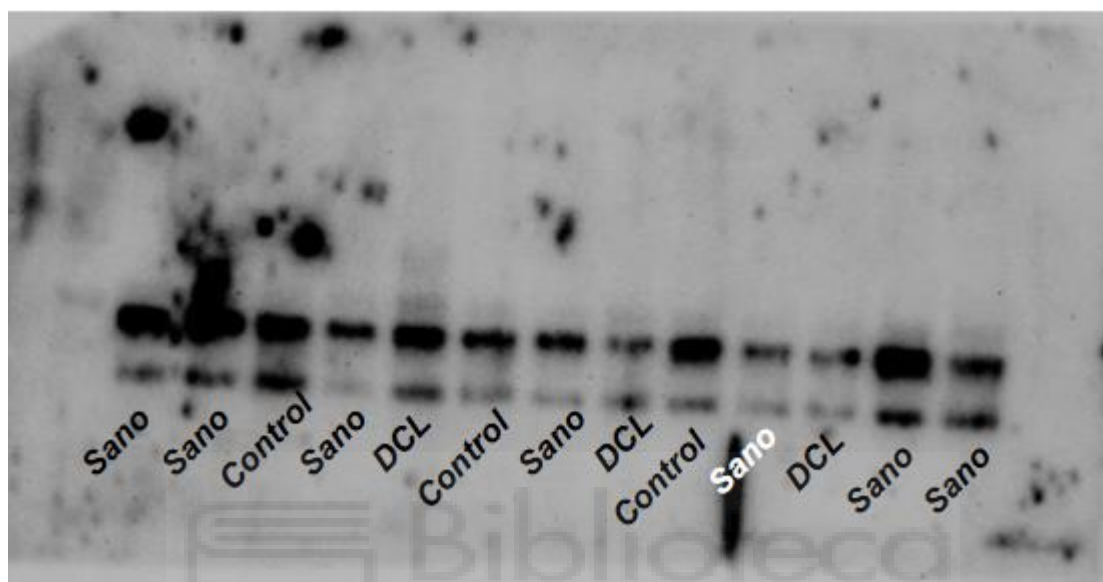


Figura 28. Western blot de suero en condiciones reductoras con anticuerpo CD63

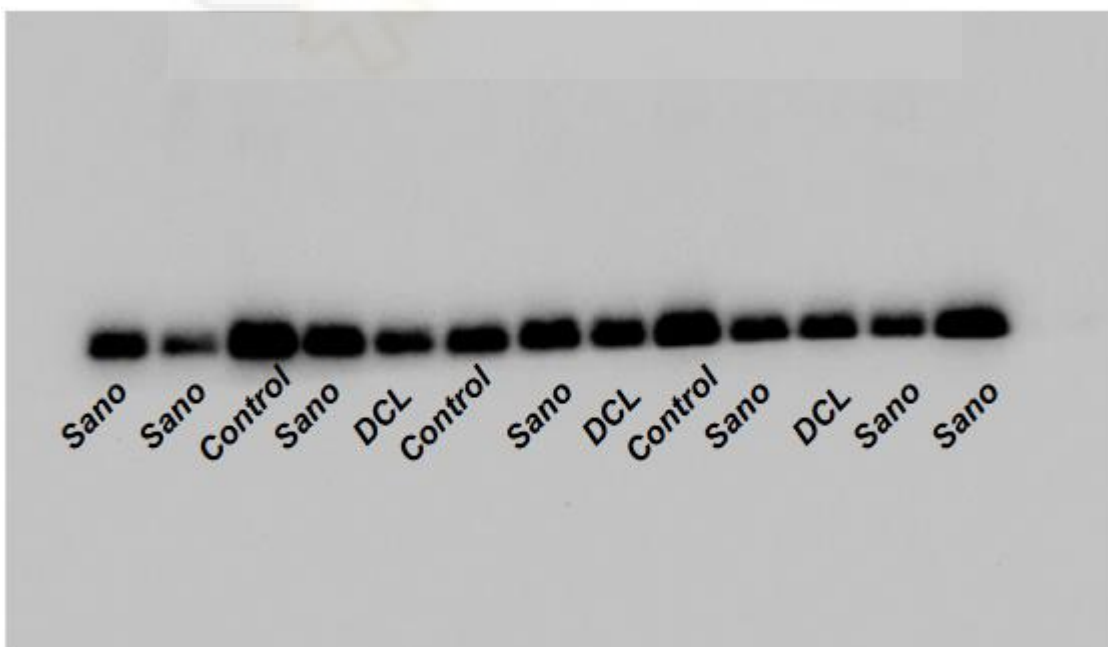


Figura 29. Western blot de suero en condiciones reductoras con anticuerpo APOE

5.2.3 SET-3 MUESTRAS

- Condiciones no reductoras (CD63)

El anticuerpo secundario utilizado fue anti-CD63 mouse en una dilución 1:15,000 preparado en leche al 5% (p/v).

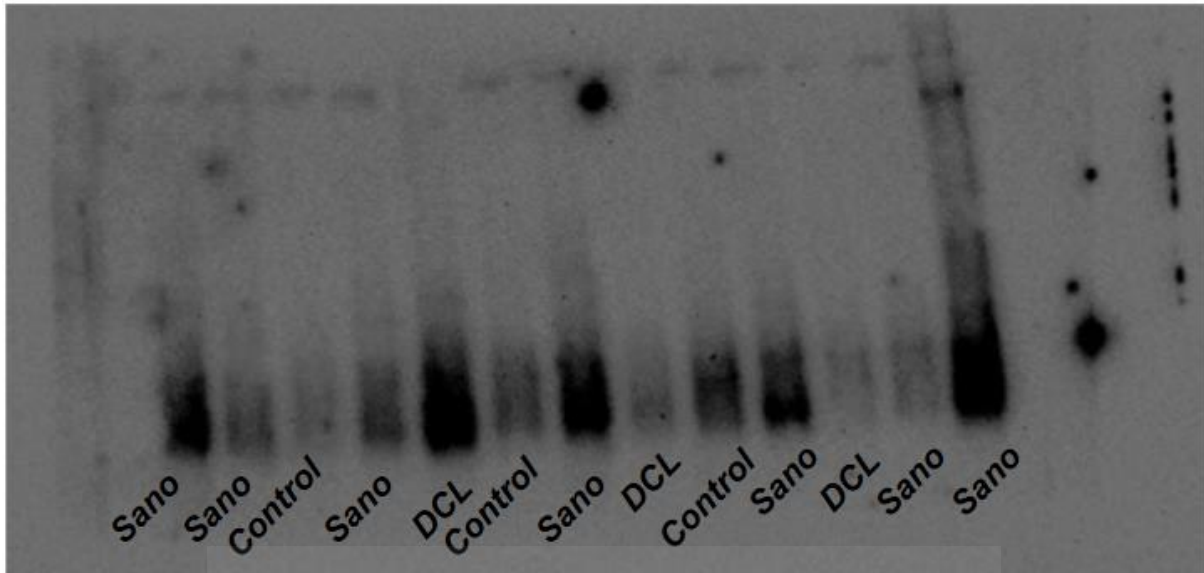


Figura 30. Western blot de suero en condiciones no reductoras con anticuerpo CD63

- Condiciones reductoras (ApoE)

Se empleó como anticuerpo secundario un anti-ApoE goat conjugado con HRP, en una dilución 1:10,000, preparado en leche al 5% (p/v).

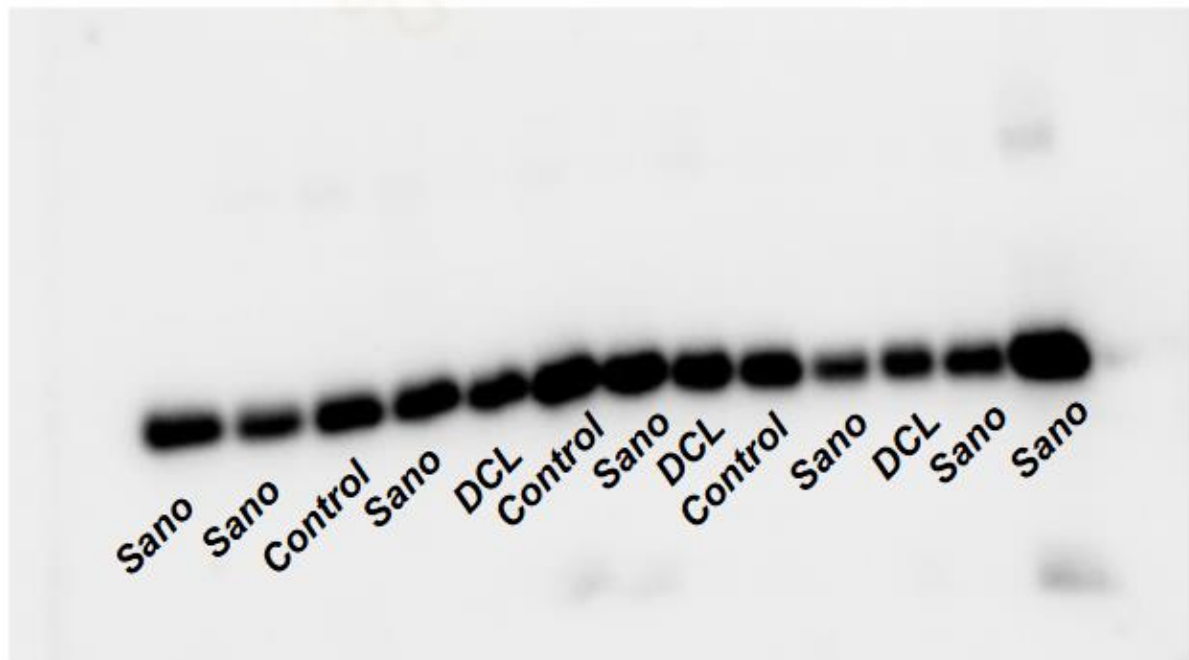


Figura 31. Western blot de suero en condiciones reductoras con anticuerpo ApoE

5.2.4 NORMALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los western blot fueron analizados por el programa de Image J. Los datos crudos de cuantificación de las bandas se normalizaron a través de la proteína total medida constain free de cada uno de los sets. Para Para la cuantificación de la proteína total se analizó la intensidad correspondiente a la zona central de cada muestra para tener una idea de la cantidad de proteínas que hay en el western blot. Esta cantidad analizada se compara con los datos de APOE y CD63.

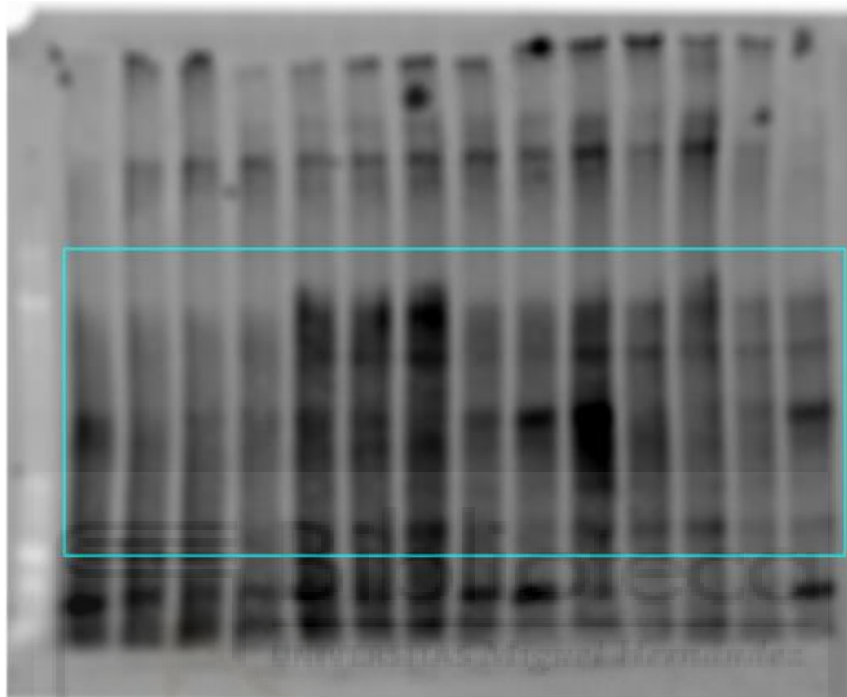


Figura 32. Stain free del set-1

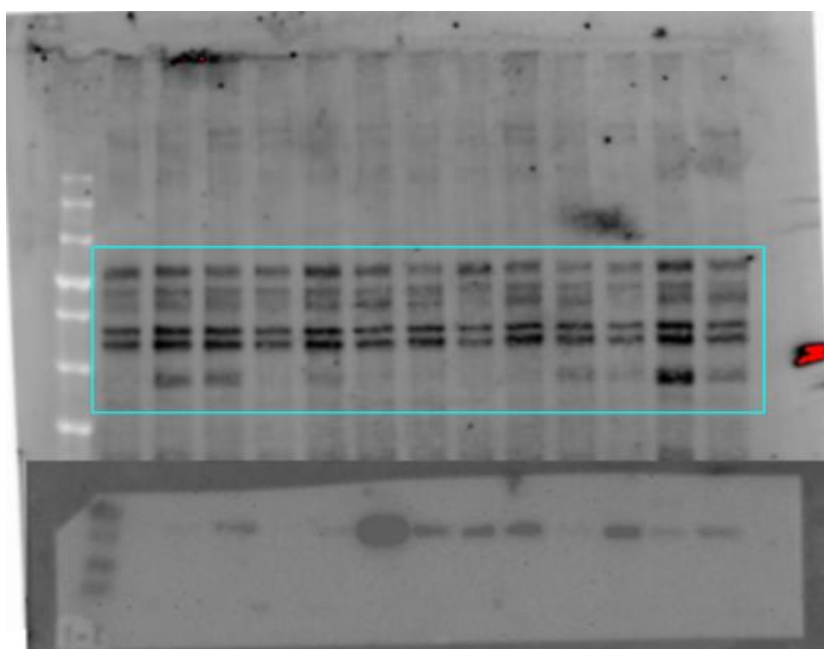


Figura 33. Stain free del set-2

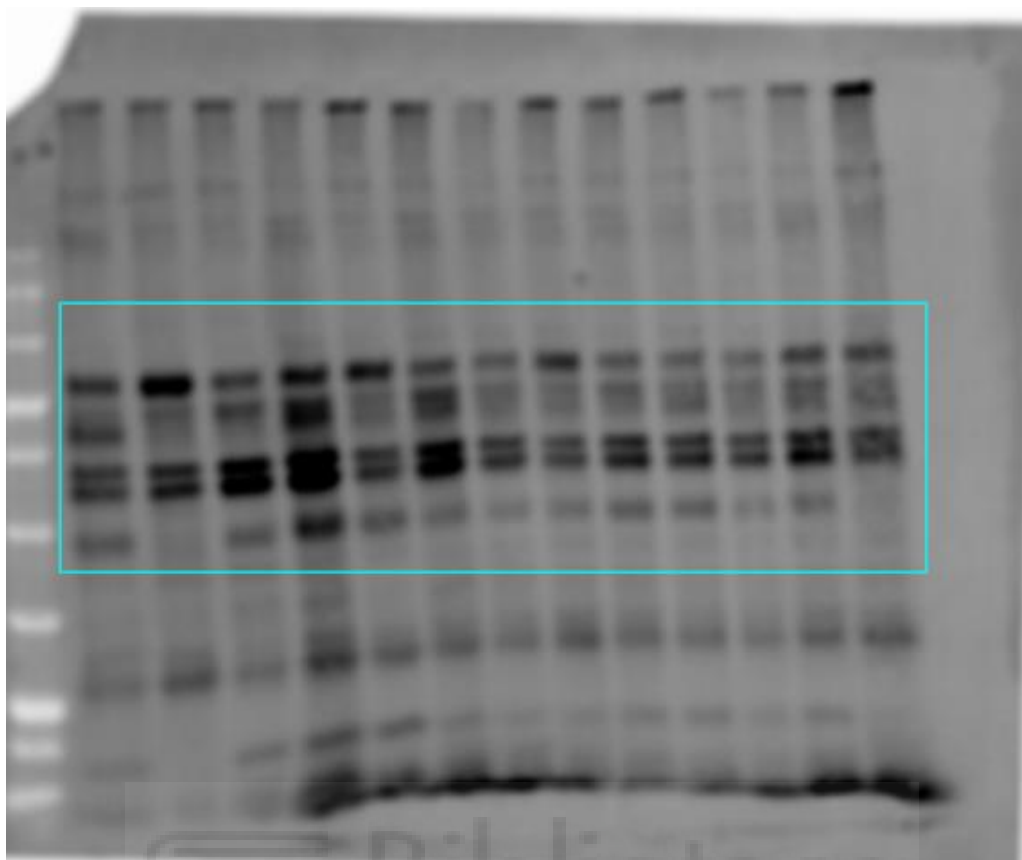


Figura 34. Stain free del set-3

5.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS WESTERN BLOTS

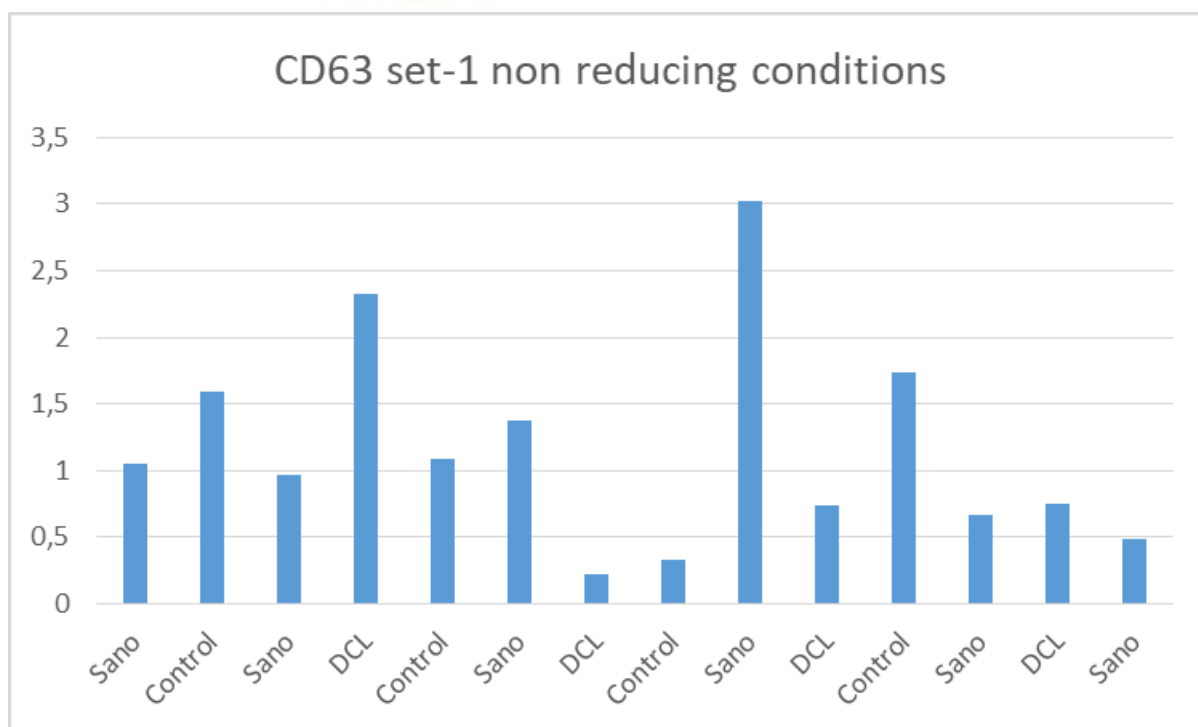


Figura 35. Cuantificación de CD63 set-1 en condiciones no reductoras

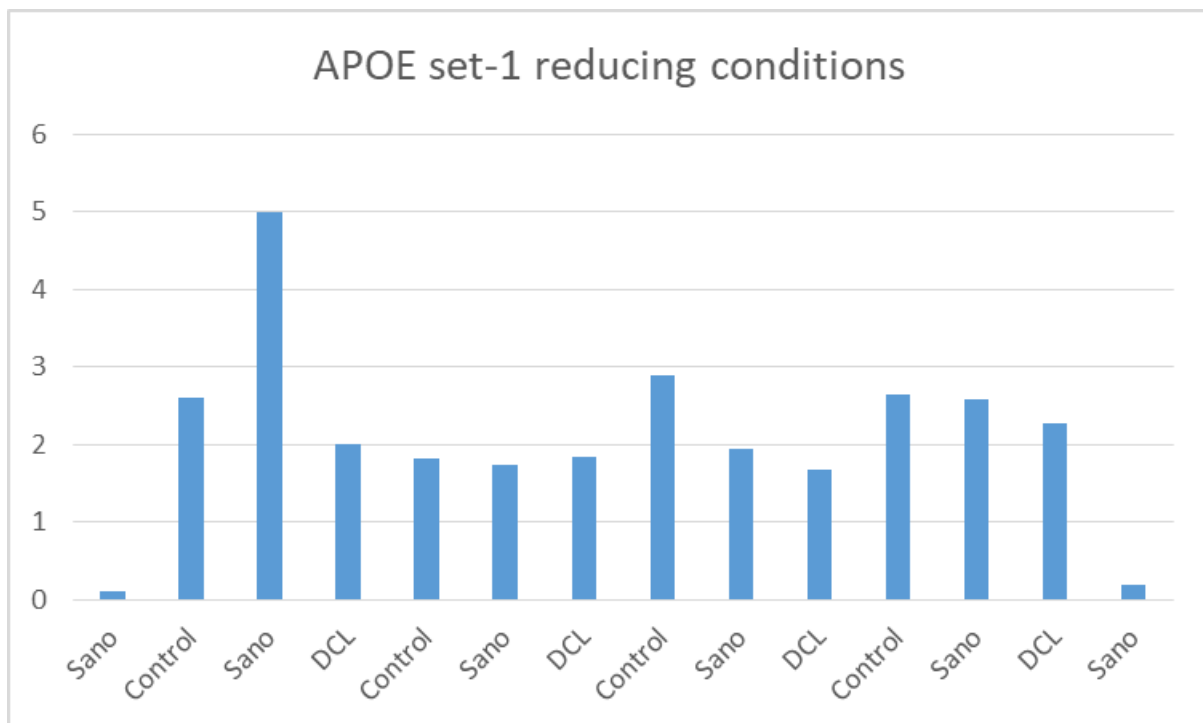


Figura 36. Cuantificación de ApoE set-1 en condiciones reductoras

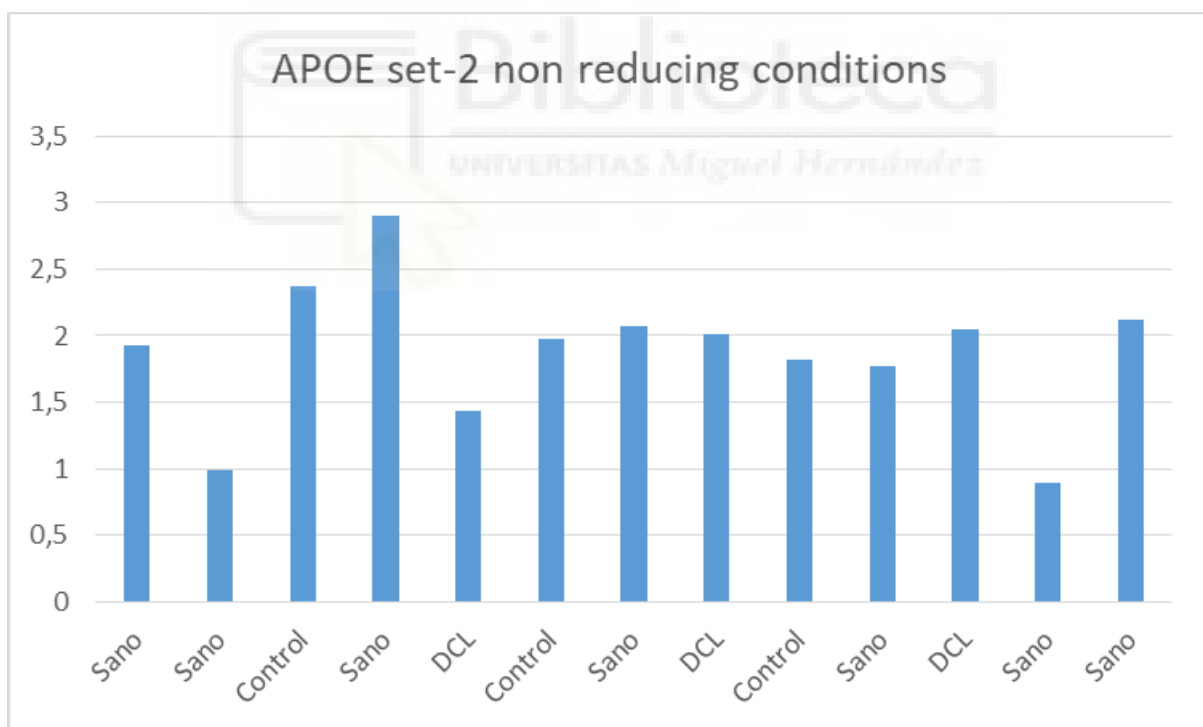


Figura 37. Cuantificación de ApoE set-2 en condiciones no reductoras

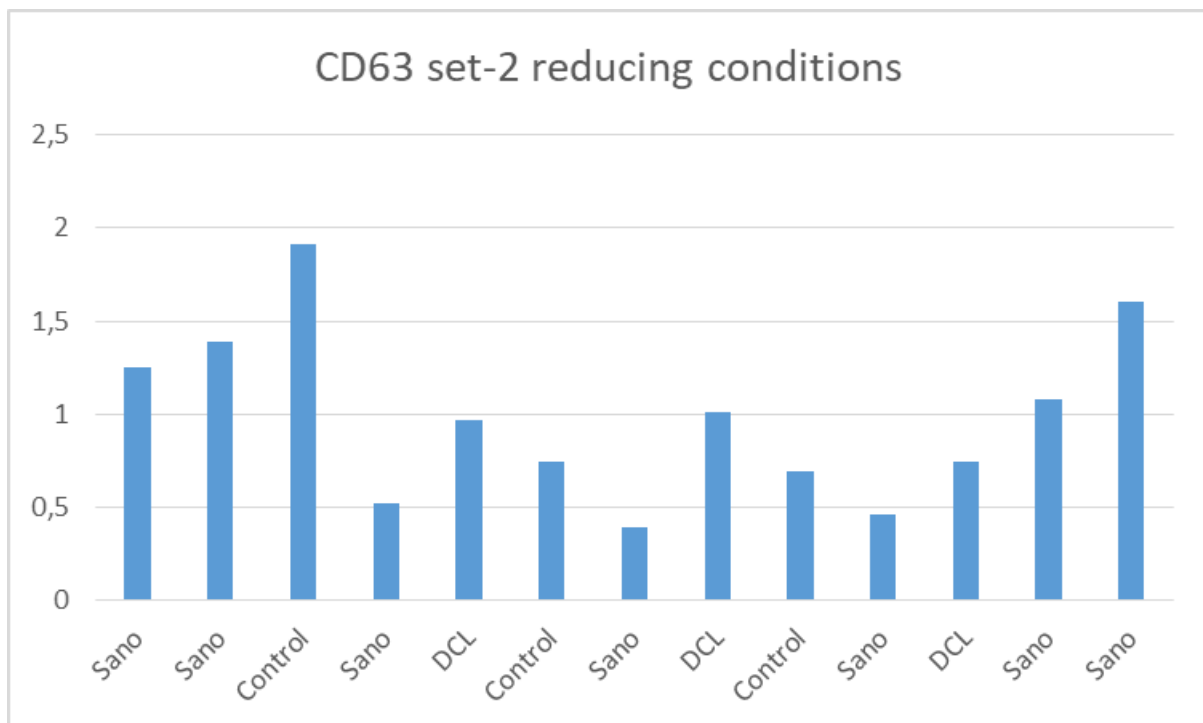


Figura 38. Cuantificación de CD63 set-2 en condiciones reductoras

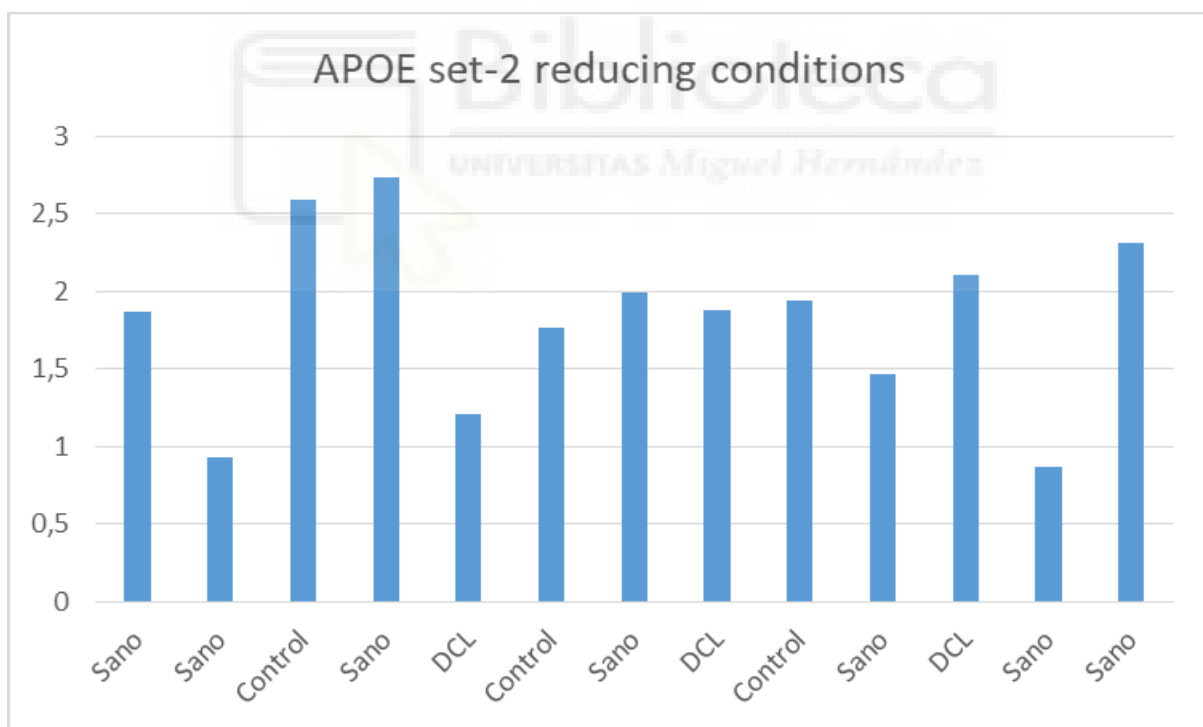


Figura 39. Cuantificación de ApoE set-2 en condiciones reductoras

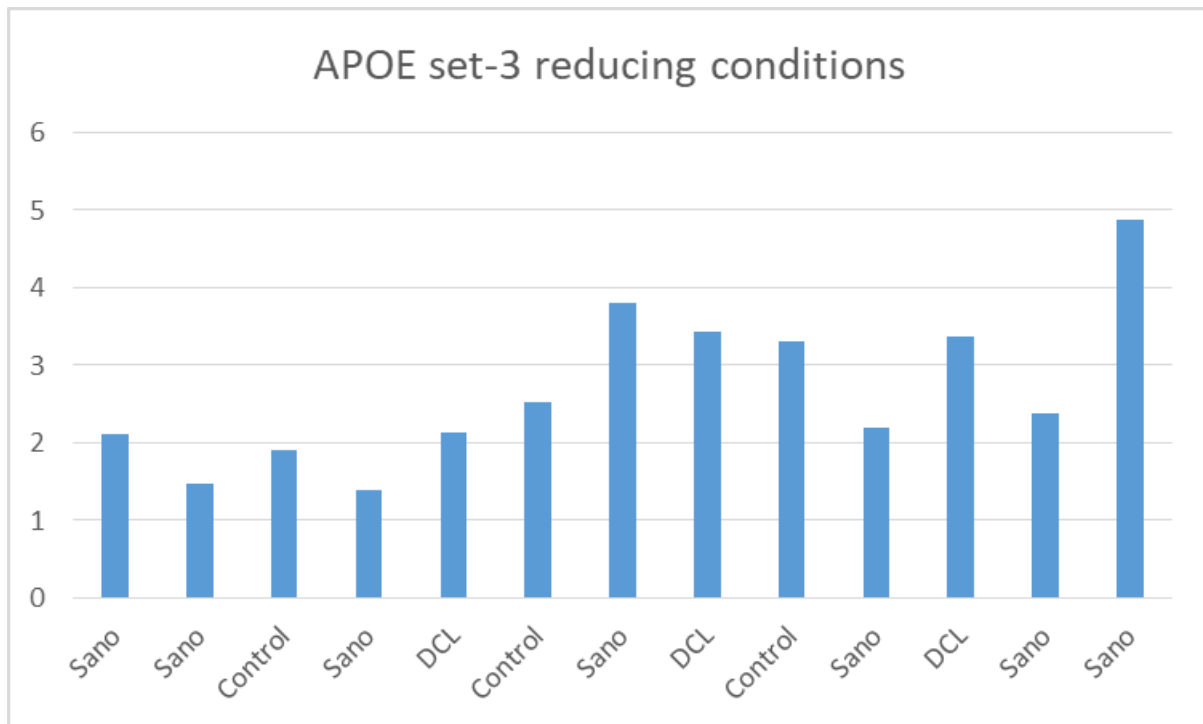


Figura 40. Cuantificación de ApoE set-3 en condiciones no reductoras

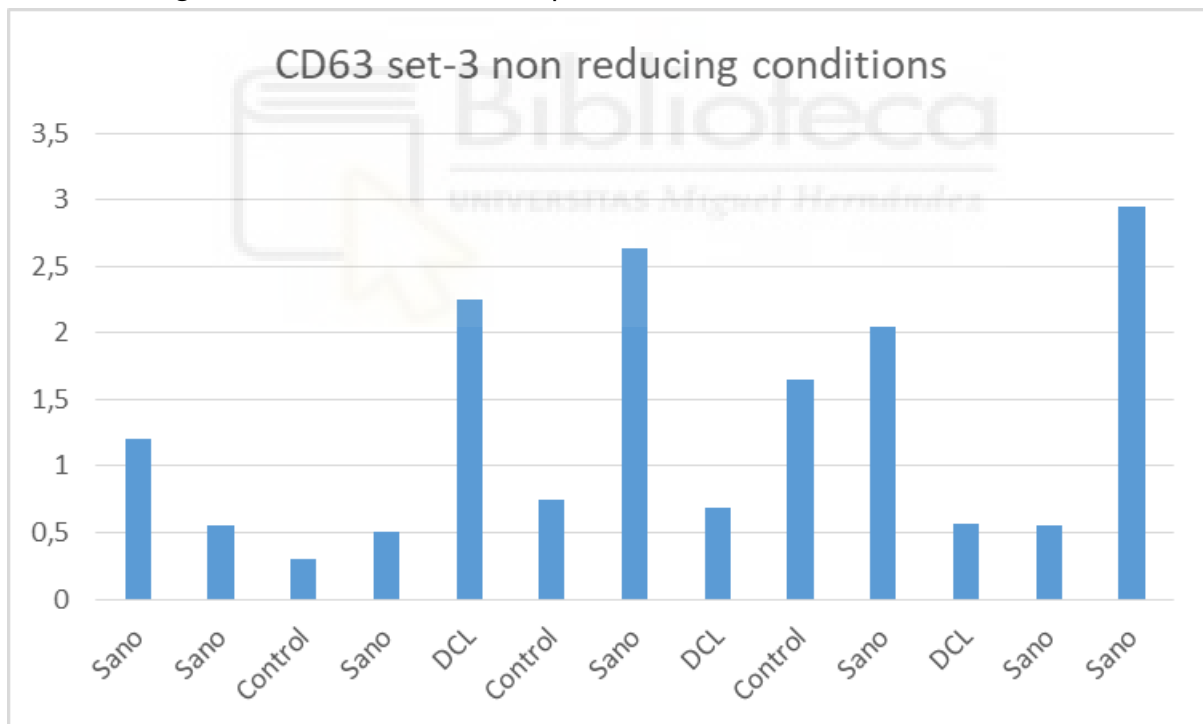


Figura 41. Cuantificación de CD63 set-1 en condiciones no reductoras

Con estos resultados se compararon los tres grupos entre sí, para averiguar alguna diferencia significativa en cuanto a los niveles de la proteína ApoE.

Grupos de estudio	P value
Sanos vs controles	0,4851146
Sanos vs DCL	0,83308316
Controles vs DCL	0,45768691

Tabla 8. Comparación de los grupos de estudio y su *pvalue*

Utilizando los datos de las cuantificaciones, se procedió al análisis estadístico para comprobar si existían diferencias significativas en cuanto a los niveles de la proteína ApoE en los diferentes grupos de estudio. En primer lugar, se verificó que los datos tenían una distribución de normal. Se pudo entonces realizar el test paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las medias entre los distintos grupos. El resultado del ANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos, con un valor de $p=0,7477$.

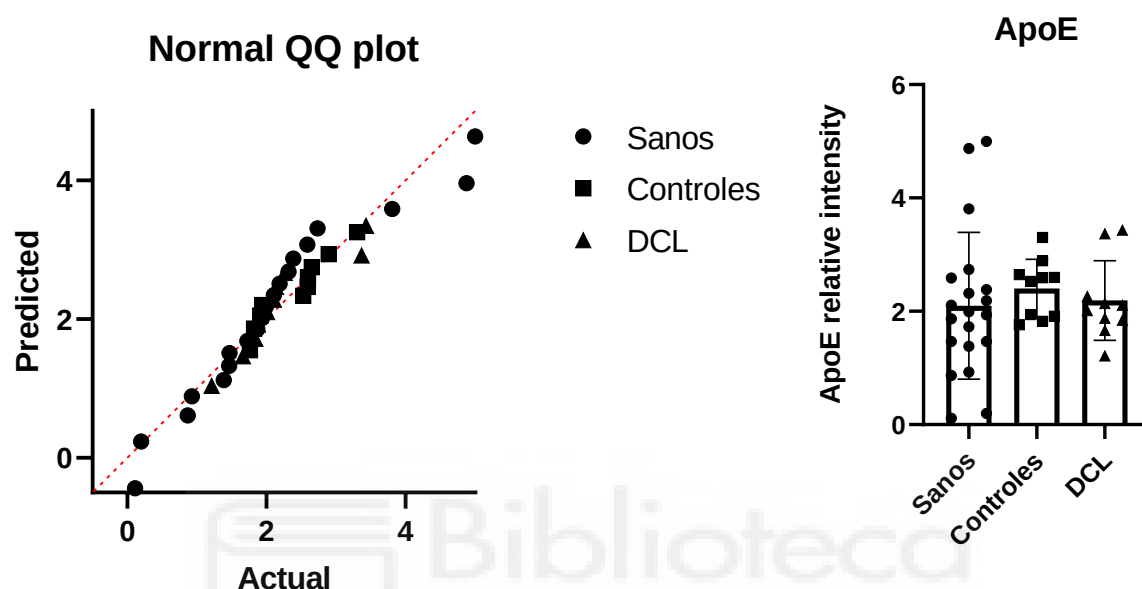


Figura 42. Análisis estadístico de la cuantificación de ApoE. A la izquierda aparece la gráfica que representa la distribución normal de los datos. A la derecha, el gráfico que representa los valores resultantes de la cuantificación en los tres grupos experimentales.

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este estudio se ha diseñado un protocolo para el aislamiento y la caracterización de VEs a partir de plasma humano, para explorar su potencial como fuente de biomarcadores. Se analizó concretamente la proteína ApoE en el contexto de la enfermedad de Alzheimer

6.1 VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE VEs

La cromatografía de exclusión por tamaño, complementada con la concentración mediante filtros Amicon, ha demostrado ser eficaz a la hora de obtener fracciones enriquecidas en vesículas. la caracterización de estas mediante anticuerpos como CD9 y CD63, permitió confirmar la presencia de vesículas en las primeras 4 fracciones principalmente. Debido a la variabilidad interindividual, y al bajo tamaño muestral no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de las proteínas a estudio. . Cabe resaltar que el anticuerpo CD63, mostró un rendimiento más consistente que CD9, sugiriendo que la elección del marcador y del sistema de detección influye significativamente en la interpretación de los resultados.

6.2 PRESENCIA DE APOE EN VEs

La proteína fue detectada por todas las fracciones SEC, lo cual confirma que esta apolipoproteína está presente tanto en las fracciones ricas en VEs como en las fracciones ricas en proteínas del plasma. Para evaluar si existían diferencias cuantitativas en la expresión de ApoE entre los grupos de estudio, se realizó un análisis estadístico mediante un test ANOVA. El test ANOVA reveló que no existendiferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Esto indica que la detección y cuantificación de ApoE, en nuestro estudio, no permite discriminar entre estados clínicos relacionados con la EA y sujetos control.

6.3 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El tamaño muestral por grupo fue limitado, lo cual dificulta la obtención de una significancia estadística . Además detamaño muestral limitado, es posible que haya habido contaminaciones con proteínas solubles plasmáticas que pueden haber afectado a los resultados del estudio. La sensibilidad en los métodos de detección, la intensidad de las bandas y la resolución de los anticuerpos utilizados pueden influir en la detección de ApoE. En este estudio se han empleadoanticuerpos para marcadores específicos del sistema nervioso central para seleccionar las VEsque vienen del cerebro.

7. CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de la proteína ApoE en las fracciones ricas en VEs. Sin embargo, tras el análisis cuantitativo utilizando el programa ImageJy el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Por tanto, se ha llegado a una conclusión de que en nuestro estudio la proteína ApoE no parece ser un biomarcador útil para detectar los estados clínicos de la enfermedad de Alzheimer a través de vesículas plasmáticas. No obstante, este estudio representa una contribución valiosa como prueba de una metodología desarrollada para una caracterización más específica de vesículas extracelulares en futuras investigaciones. De este modo, se podrían reforzar las estrategias diagnósticas no invasivas para la detección precoz del Alzheimer y mejorar la comprensión de su progresión a nivel molecular.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Nieuwland R. A beginner's guide to study extracellular vesicles in human blood plasma. *J Extracell Vesicles*. 2024;13(1):e12429. doi:10.1002/jev2.12429
- Quiroz YT, Aguillon D, Aguirre-Acevedo DC, Vasquez D, Zuluaga Y, Baena AY, et al. APOE3 Christchurch heterozygosity and autosomal dominant Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2024 Jun 20;390(23):2156–2164. doi:10.1056/NEJMoa2308583.
- Su X, Wang H, Li Q, Chen Z. Extracellular vesicles: A review of their therapeutic potentials, sources, biodistribution, and administration routes. *Int J Nanomedicine*. 2025 Mar 13;20:3175–3199. doi:10.2147/IJN.S502591. PMID: 40098717; PMCID: PMC11913029.
- Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024 Feb;13(2):e12404. doi:10.1002/jev2.12404. Erratum in: *J Extracell Vesicles*. 2024 May;13(5):e12451. PMID: 38326288; PMCID: PMC10850029.
- Shi M, Sheng L, Stewart T, Zabetian CP, Zhang J. New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Prog Neurobiol*. 2019 Apr;175:96–106. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.01.005. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30685501; PMCID: PMC6546433.
- Martins RN, Brennan CS, Fernando WMADB, Brennan MA, Fuller SJ, editors. *Neurodegeneration and Alzheimer's disease: The role of diabetes, genetics, hormones, and lifestyle*. Chichester: John Wiley & Sons; 2019.
- Villar-Vesga J, Henao-Restrepo J, Voshart DC, Aguillon D, Villegas A, Castaño D, et al. Differential profile of systemic extracellular vesicles from sporadic and familial Alzheimer's disease leads to neuroglial and endothelial cell degeneration. *Front Aging Neurosci*. 2020 Nov 11;12:587989. doi: 10.3389/fnagi.2020.587989.
- Nieuwland R, Siljander PRM. A beginner's guide to study extracellular vesicles in human blood plasma and serum. *J Extracell Vesicles*. 2024 Jan;13(1):e12400. doi: 10.1002/jev2.12400.
- Quiroz YT, Aguillon D, Aguirre-Acevedo DC, Vasquez D, Zuluaga Y, Baena AY, et al. APOE3 Christchurch heterozygosity and autosomal dominant Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2024 Jun 20;390(23):2156–2164. doi: 10.1056/NEJMoa2308583.
- Robinson SD, Samuels M, Jones W, Stewart N, Eravci M, Mazarakis NK, et al. Confirming size-exclusion chromatography as a clinically relevant extracellular vesicles separation method from 1mL plasma through a comprehensive comparison of methods. *BMC Methods*. 2024 Jul 1;1:7. doi: 10.1186/s44330-024-00007-2.

- van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Apr;19(4):213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- Dafre R, Wasnik P Sr. Current diagnostic and treatment methods of Alzheimer's disease: A narrative review . *Cureus.* 2023;15(9):e45649. doi:10.7759/cureus.45649

