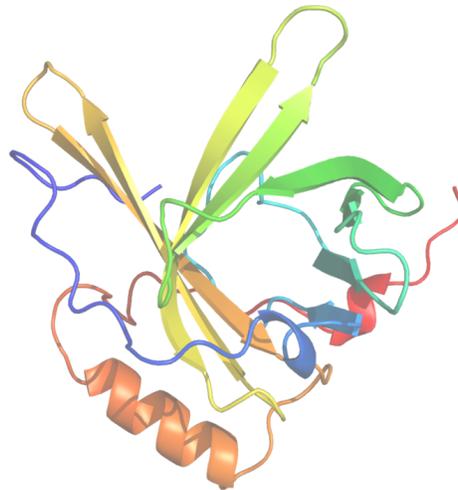




Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Papel del neuroprotector ApoD en el manejo microglial de agregados amiloides



Autora: Marta Poncela Herrero

Coautor: Miguel Villa Valdés

Tutores: Miriam Corraliza Gómez y Diego Sánchez Romero

Trabajo Fin de Grado Medicina. Curso 2018-2019.

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.1. Revisión bibliográfica.....	7
2.2. Cultivo celular y tratamientos.....	7
2.3. Preparación de oligómeros de β -amiloide.....	8
2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Coomassie.....	8
2.5. Estudio de viabilidad celular.	9
2.6. Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT- qPCR).	9
2.7. Inmunocitoquímica en células BV2.	10
2.8. Inmunohistoquímica en tejido cerebral de ratón.	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Caracterización de los oligómeros de β -amiloide.	12
3.2. Efecto de los oligómeros de β -amiloide sobre las células BV2.	12
3.3. Análisis del papel de ApoD en la viabilidad de las células BV2 tratadas simultáneamente con β -amiloide.....	13
3.4. Estudio del efecto del β -amiloide sobre la supervivencia de las células BV2 tratadas previamente con ApoD.	14
3.5. Cuantificación de la expresión de IL1 β en microglía tratada con β -amiloide y ApoD....	15
3.6. Inmunocitoquímica de células BV2 tratadas con β -amiloide.	16
3.7. Inmunohistoquímica para Iba1 en la microglía de ratón WT y ratón ApoD-KO.	17
4. DISCUSIÓN	18
5. CONCLUSIÓN	20
6. BIBLIOGRAFÍA	21
7. PÓSTER	23
8. ANEXO	24

RESUMEN

La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína de la familia de las lipocalinas, cuya expresión se incrementa en las regiones del sistema nervioso central afectadas por la Enfermedad de Alzheimer. La función neuroprotectora de esta proteína frente al estrés oxidativo, que caracteriza al proceso de envejecimiento y a las patologías neurodegenerativas, ha sido ampliamente estudiada en neuronas y astrocitos. En este trabajo se analiza el papel de ApoD en las células BV2 (microglía de ratón) expuestas a los oligómeros de β -amiloide, que son considerados los responsables del proceso neurodegenerativo que ocurre en la Enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con los resultados obtenidos, ApoD parece ejercer una función protectora frente al daño generado por los oligómeros de A β sobre las células microgliales, que podría estar relacionada con su actividad antiinflamatoria.

Palabras clave

Apolipoproteína D - β -amiloide - Microglía - Células BV2 - Neurodegeneración - Enfermedad de Alzheimer

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa de curso progresivo que constituye la primera causa de demencia en personas de edad avanzada. Se caracteriza por la pérdida gradual de la memoria episódica, acompañada de la afectación de otros dominios cognitivos (desorientación, deficiencia del lenguaje, agnosias, apraxias y disfunción ejecutiva). Un conjunto de síntomas que dificulta la realización de las actividades de la vida diaria y acaba generando una dependencia funcional progresiva del sujeto (1).

A pesar de que la patogenia del Alzheimer sigue sin establecerse, se cree que todas las formas de la enfermedad comparten un mismo origen: la sobreproducción o ausencia de aclaramiento del péptido β -amiloide ($A\beta$). En condiciones normales, dicho péptido se obtiene del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) por las α -secretasas. Sin embargo, de acuerdo con la hipótesis amiloidea, se cree que en la enfermedad de Alzheimer se produce un procesamiento anómalo de la APP por las β y γ -secretasas, que da lugar a péptidos de β -amiloide₁₋₄₀, ₁₋₄₂. Estos péptidos, por un lado, atraviesan la membrana de las neuronas y forman oligómeros, mientras que, por otro, se agregan en fibrillas formando las placas de amiloide extracelulares características de la enfermedad (1,2).

El depósito del $A\beta$ desencadena una respuesta inflamatoria con formación de radicales libres, estrés oxidativo y entrada masiva de calcio en la neurona, que conduce a la disfunción y muerte neuronal. Por tanto, el péptido $A\beta$ parece ser el responsable del proceso de neurodegeneración que tiene lugar en la enfermedad de Alzheimer (1,2).

La apolipoproteína D (ApoD) humana es una glicoproteína de la familia de las lipocalinas que parece jugar un importante papel en el proceso neurodegenerativo. Su gen se localiza en la región p14.2 del cromosoma 3 y su estructura terciaria consiste en un barril β constituido por 8 láminas β -antiparalelas, que forman una cavidad o bolsillo que permite la unión de pequeños ligandos hidrofóbicos (3).

ApoD se encuentra ampliamente distribuida en el organismo: glándulas adrenales, riñones, páncreas, bazo, pulmones, ovarios, testículos, cerebro, nervios periféricos y líquido cefalorraquídeo. En cambio, a diferencia de lo que ocurre en el resto de las

apolipoproteínas, su expresión en el hígado y el intestino es baja. El sistema nervioso destaca como uno de los principales tejidos de expresión de ApoD: en el sistema nervioso periférico se expresa en los fibroblastos del endoneuro y en las células de Schwann y en el sistema nervioso central en los astrocitos y oligodendrocitos (3).

ApoD es una proteína multifunción: protege frente al estrés oxidativo reduciendo la peroxidación lipídica (4), participa en la diferenciación neuronal (5) e interviene en la regeneración de los nervios dañados (3). Todas estas funciones puede llevarlas a cabo gracias a su capacidad de unir diferentes ligandos hidrofóbicos (multi-ligando): ácido retinoico, retinol, esfingomiélin, ácidos grasos, progesterona, anandamida, ácido araquidónico y ácido E₃-metil-2-hexanoico (5).

Diversos estudios (3,6) informan sobre un aumento de la expresión de ApoD en condiciones neuropatológicas, como en el proceso de envejecimiento, en las patologías neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Niemann-Pick) o en la lesión de los nervios periféricos.

ApoD es el gen que más aumenta su expresión en el envejecimiento en varias especies (7), lo que parece representar un mecanismo protector frente al deterioro cerebral que tiene lugar durante dicho proceso (8).

En la enfermedad de Alzheimer se ha detectado un incremento de los niveles de ApoD en el líquido cefalorraquídeo y en varias regiones cerebrales afectadas por la enfermedad: hipocampo (9), corteza prefrontal y corteza entorrinal (10). Este incremento de ApoD se produce en la línea celular HT22 de origen neuronal sometida al β -amiloide (11), lo puede deberse a la función neuroprotectora que parece tener dicha proteína frente al estrés oxidativo. Además, se ha detectado ApoD en los depósitos de A β de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (12).

En un estudio realizado en ratones (13) se evidenció que ApoD ejerce una función reguladora de la patología amiloidea en la enfermedad de Alzheimer. En ratones con pérdida de función para ApoD (*Knock-out*) se detectó un aumento del número de placas de amiloide en la región hipocámpal y cortical, mientras que en ratones con sobreexpresión de ApoD en neuronas se reducía dicho número, así como los niveles de β -amiloide_{1-40,1-42} (14).

Se desconoce si ApoD se expresa en la microglía y si puede ejercer algún papel en relación con ésta. Las células microgliales son consideradas los macrófagos del Sistema Nervioso Central, donde juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis en condiciones fisiológicas. La microglía modula la sinapsis neuronal y participa en la neurogénesis postnatal a nivel del hipocampo (esencial para el aprendizaje y la memoria) (14).

A pesar de que la función de la microglía en la enfermedad de Alzheimer todavía no ha sido esclarecida, se ha relacionado con el depósito y aclaramiento del β -amiloide. Se cree que los oligómeros de A β desencadenan una respuesta inflamatoria con participación de la microglía activada, que libera una gran cantidad de mediadores inflamatorios que podrían contribuir al proceso neurodegenerativo que tiene lugar en la enfermedad (15,16).

El papel del neuroprotector de ApoD en el estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiado en neuronas y astrocitos. En cambio, los estudios realizados en microglía han sido escasos. Es por ello que en este trabajo queremos estudiar cómo se comporta la microglía ante el estrés oxidativo generado por el β -amiloide, y cómo el tratamiento con ApoD puede modificar dicho comportamiento. El objetivo principal de este proyecto es determinar si ApoD ejerce un papel neuroprotector en las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Revisión bibliográfica.

La búsqueda bibliográfica se fundamentó en los conceptos claves de este trabajo: apolipoproteína D (ApoD), β -amiloide (A β), patología neurodegenerativa y enfermedad de Alzheimer (**Tabla 1**). Dicha revisión fue llevada a cabo en la base de datos online *PubMed*.

TÉRMINOS	FILTROS	ARTÍCULOS
Apolipoprotein D	Ninguno	609
	10 últimos años	141
	10 últimos años + review	3
“Apolipoprotein D” AND “neurodegenerative”	10 últimos años	18
“Apolipoprotein D” AND “Alzheimer”	10 últimos años	11
“Apolipoprotein D” AND “amyloid”	10 últimos años	8

Tabla 1. Clasificación de las palabras claves buscadas, los filtros empleados y el n° de artículos obtenidos.

2.2. Cultivo celular y tratamientos.

La línea celular BV2 (microglía de ratón; Blasi 1990 (17)) se cultiva en el medio RPMI1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), 1% de L-Glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Las células se mantienen incubadas a 37°C y 5% de CO₂. Los pases de cultivo se realizan cuando se alcanza la confluencia celular y, para ello, se emplea el GHCKS (NaCl (6,37 g/L), KCl (0.30 g/L), Na₃Citrato2H₂O (3 g/L), glucosa (2 g/L) y HEPES (4,77 g/L). pH = 7.5), que al causar una disminución del calcio permite que se levanten las células y puedan ser transferidas al nuevo medio.

La siembra celular se realiza con la ayuda de la cámara de Neubauer, que nos permite contar el número de células presente en nuestra suspensión celular y calcular el volumen de ésta necesario para sembrar la densidad celular deseada en el experimento. Una vez estimado dicho volumen, podemos sembrar las células con su medio correspondiente en cada pocillo.

Por último, cabe destacar que a lo largo de los experimentos las células BV2 han sido tratadas con ApoD humana (10, 50 y 100 nM; 3 horas y 24 horas) y oligómeros de β -amiloide (0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 μ M; 3 horas y 24 horas).

2.3. Preparación de oligómeros de β -amiloide.

En primer lugar, tras 30 minutos a temperatura ambiente disolvemos 1 mg de $A\beta_{1-42}$ en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP). A continuación, la solución obtenida se distribuye en tres eppendorfs no siliconados que se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas, permitiendo así la formación de monómeros. Posteriormente, se centrifugan los 3 viales a 800g durante 15 minutos y la película que forma el péptido se resuspende en DMSO, obteniéndose una concentración de 5 mM. Se sonicán las muestras de $A\beta$ 5 mM durante 10 minutos y se distribuyen en 27 alicuotas que se conservan a -20°C .

Finalmente, 24 horas antes del empleo del péptido $A\beta$, añadimos a cada alicuota DMEM 4,5g/L (sin L-glutamina ni rojo fenol) para favorecer la formación de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ a una concentración de $80\mu\text{M}$. Por último, sonicamos las muestras durante 10 minutos y las incubamos 24 horas a 4°C (18).

2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Coomassie.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de docecilsulfato sódico (SDS-PAGE) nos permite separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular. El SDS desnatura las proteínas y les aporta una serie de cargas negativas proporcionales a su tamaño. De esta forma, se neutraliza la carga de la proteína y se forma un complejo con carga negativa que migra hacia el ánodo. Como todas las proteínas tienen la misma carga/unidad de masa su movilidad por el gel depende únicamente de su peso molecular. Este tipo de electroforesis nos permite estimar el peso molecular de las proteínas a estudio al compararlas con otras de peso molecular conocido.

Una vez realizada la electroforesis, se puede llevar a cabo una tinción con Coomassie. El *Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250* es un colorante derivado del trifenilmetano que se emplea en la tinción de las proteínas. Dado que todo el gel queda impregnado del colorante, debemos desteñirlo con una solución de ácido acético para que solo queden marcadas las proteínas.

En nuestro caso, la electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 15% y a voltaje constante (80V).

2.5. Estudio de viabilidad celular.

El Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) nos permite estudiar la viabilidad celular mediante la cuantificación de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. La reacción que se produce entre el MTT y dichas enzimas mitocondriales da lugar a la rotura del anillo de tetrazolio y la formación de cristales de formazán insolubles de color púrpura. Por tanto, existe una relación entre el color púrpura (obtenido por reducción del MTT) y la viabilidad celular (19).

Para la realización del MTT sembramos nuestras células en 50 μ l de medio RPMI1640 completo a una densidad de 47.000 células/cm². Una vez realizada la bajada de suero (FBS 1%) y todos los tratamientos necesarios, se retira el medio y se añade el MTT (62,5 μ g/ml). A continuación, se incuban las células durante 3 horas a 37°C para que la reacción con las deshidrogenasas mitocondriales tenga lugar. Tras este periodo de tiempo, se añade en cada pocillo la solución de isopropanol con Triton X-100 (10%) para solubilizar los cristales de formazán que se hayan formado. Finalmente, se mide la solución obtenida en el espectrofotómetro (*SoftMaxPro*) a una absorbancia $\lambda=570$ nm, a la cual se le resta la absorbancia del fondo ($\lambda=690$ nm).

2.6. Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT- qPCR).

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que nos permite cuantificar la cantidad de DNA amplificado a medida que la PCR va avanzando. Dicha cuantificación se realiza gracias al empleo de unos compuestos fluorescentes, que al unirse al DNA de doble cadena emiten una señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de DNA amplificado.

La extracción del RNA de las células BV2 se realiza con 0,5 ml de Qiazol, y su concentración y pureza se miden con el espectrofotómetro Nanodrop. A continuación, 500 ng de RNA son transcritos a cDNA mediante una reacción de transcripción inversa (RT) en la que se emplean: *RT buffer 5X*, *oligodT primers 50 μ M*, *random hexamers 100 μ M*, mix de enzima retrotranscriptasa y dH₂O. El cDNA que se obtiene constituye el sustrato de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Para ejecutar la RT-qPCR en el termociclador se utiliza el *SYBR Green Mix takara (1x)* y los *primers reverse y forward (200 nM)* para cada gen a estudio (IL1 β y L18) mostrados en el **Anexo 1**.

En nuestro trabajo, la estimación de la cantidad de mRNA transcrito se realizó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (**Anexo 3**), que permite analizar cambios relativos en la expresión genética a partir de una qPCR (20). La expresión del gen de interés IL-1 β se normalizó con el gen de referencia L18 (gen caracterizado por tener una expresión constante en las células).

Las condiciones y los *primers* empleados en la PCR tienen como objetivo que se amplifiquen exclusivamente los genes a estudio. Sin embargo, siempre existe la posibilidad de obtener amplicones de secuencias no deseadas. Para analizar la especificidad de la RT-qPCR se emplean las curvas de desapareamiento (*melting*).

En la curva de desapareamiento (**Figura 1**) de nuestra RT-qPCR solo se obtuvieron los amplicones de los genes a estudio: L1 β (gen de interés) y L18 (gen de referencia).

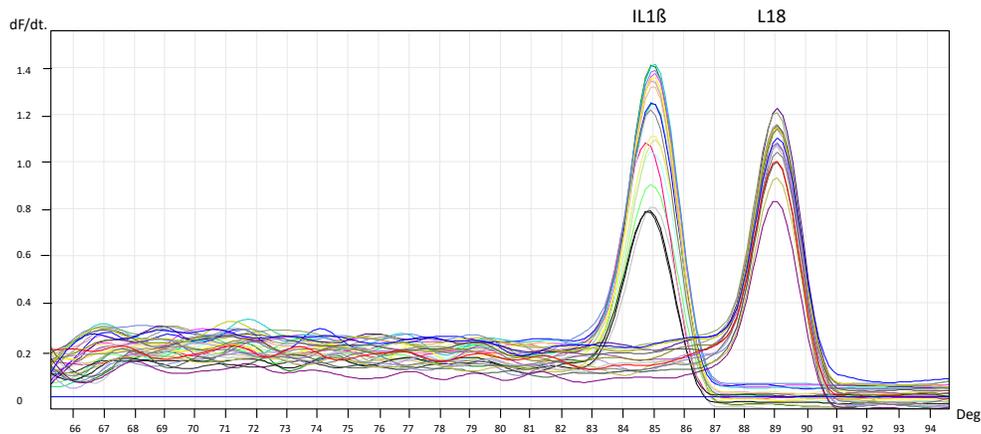


Figura 1. Curva de desapareamiento. Se identifican dos amplicones correspondientes a los dos genes a estudio: IL1 β (gen de interés) y L18 (gen de referencia). Para ejecutar el melting se emplean temperaturas de 65-95°C.

2.7. Inmunocitoquímica en células BV2.

Las células BV2 se siembran en 300 μ l de medio RPMI1640 completo a una densidad de 22.000 células/cm². Una vez ejecutados todos los tratamientos pertinentes, realizamos dos lavados con PBS (tampón fosfato salino) y fijamos las células con formaldehído al 4% durante 15 minutos. A continuación, tras realizar de nuevo tres lavados con PBS, se lleva a cabo durante 30 minutos el bloqueo con suero de cabra (1% v/v), que nos permite evitar las uniones inespecíficas, y PBS-Tween 20 (0,1%), que permeabiliza la membrana celular y permite la entrada posterior del anticuerpo al interior de la célula. Acto seguido, añadimos el anticuerpo primario (anticuerpo de ratón anti β -amiloide 0,2 μ g/ml) en solución de bloqueo e incubamos la placa a 4°C durante la noche. Al día siguiente, realizamos 3 lavados con

PBS, agregamos el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa 488 1,5 µg/ml) con PBS-Tween 20 (0,1%) e incubamos las células durante 1 hora en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia. Posteriormente, realizamos el montaje de los cristales sobre un porta, añadiendo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; *Vectashield*) para marcar los núcleos celulares. Finalmente, visualizamos las muestras al microscopio de fluorescencia y analizamos las imágenes obtenidas con el programa *FIJI*.

2.8. Inmunohistoquímica en tejido cerebral de ratón.

En nuestro experimento se emplearon dos grupos de ratones: silvestres para ApoD (WT) y mutados con pérdida de función para ApoD (*Knock-Out*), de los cuales se seleccionaron los de edad superior a 700 días (ratones envejecidos).

Los cortes cerebrales se desparafinan en xileno y se rehidratan con alcohol en concentraciones decrecientes hasta finalizar en agua. A continuación, se colocan en un tampón de desenmascaramiento de antígenos (disolución en agua de 2.94 g/L de citrato de sodio (C₆H₅O₇Na₃) y HCl (37%) para obtener una disolución de pH 6.0).

En la inmunohistoquímica las incubaciones se realizan en una cámara húmeda, para evitar que se seque el tejido. En primer lugar, colocamos las muestras en una cubeta de histología con PBS. Acto seguido, realizamos el bloqueo con suero de cabra (1%) y PBS-Tritón X-100 (0,25% v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, añadimos la dilución del anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-Iba1 (wako) 0,5 µg/ml) en solución de bloqueo e incubamos los portas a 4°C durante la noche. De nuevo, realizamos tres lavados con PBS, añadimos el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-conejo Alexa 488 1,5 µg/ml) con PBS-Triton X-100 (0,25%) e incubamos las muestras a temperatura ambiente durante 2 horas en oscuridad. Posteriormente, realizamos tres nuevos lavados con PBS y colocamos el porta sobre un cubre. Por último, visualizamos las muestras al microscopio de fluorescencia y estudiamos las fotografías con el programa *FIJI*.

2.9. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se empleó el programa SigmaPlot V11.0. Se consideran los resultados estadísticamente significativos si p-valor < 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de los oligómeros de β -amiloide.

Previo al inicio de nuestros experimentos comprobamos que nuestro protocolo de oligomerización funcionaba correctamente. Para ello, realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) teñido con *Coomassie Brilliant Blue*. Empleamos como recta patrón la proteína inhibidora de la tripsina (T.I), de tamaño semejante a los oligómeros de A β y concentración conocida.

Tal y como se muestra en la **Figura 2**, en la oligomerización obtuvimos una mezcla de monómeros y oligómeros.

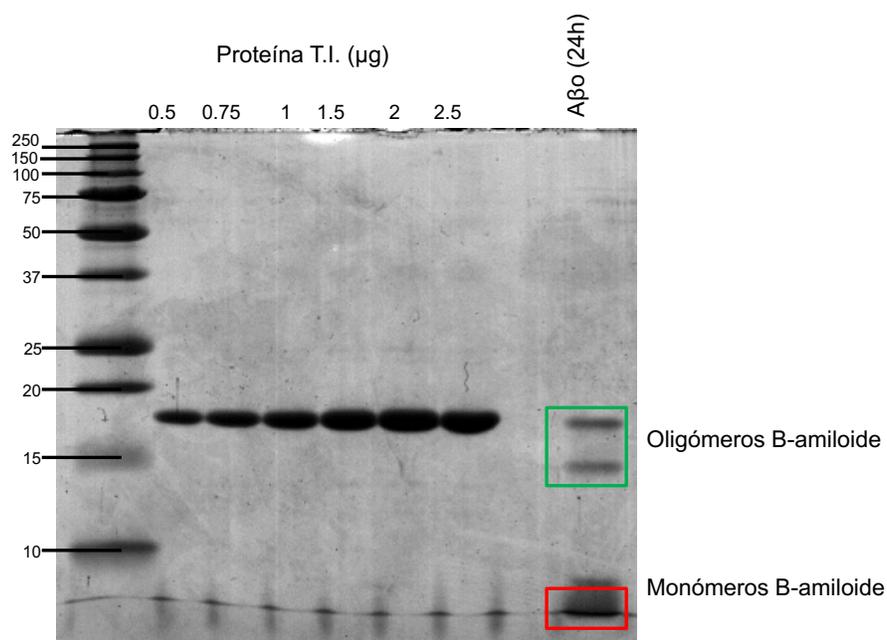


Figura 2. Caracterización de los oligómeros de B-amiloide. Monómeros: 4,5 kDa; oligómeros: 15-20 kDa.

3.2. Efecto de los oligómeros de β -amiloide sobre las células BV2.

Iniciamos nuestros experimentos estudiando la viabilidad de las células BV2 en tratamiento con oligómeros de A β . Con este fin, realizamos un MTT en el que la microglía era sometida a dosis crecientes de β -amiloide ([A β]: 0, 0.1, 1 y 10 μ M) durante 24 horas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las células BV2 muestran una reducción de la viabilidad al ser expuestas a β -amiloide. Dicha viabilidad disminuye a medida que aumenta

la dosis del factor estresante (relación dosis-respuesta) con un resultado estadísticamente significativo (**Figura 3**).

Este análisis nos ayudó a determinar que la concentración de A β más adecuada para los futuros experimentos era 1 μ M, al causar una disminución de la supervivencia celular del 40%.

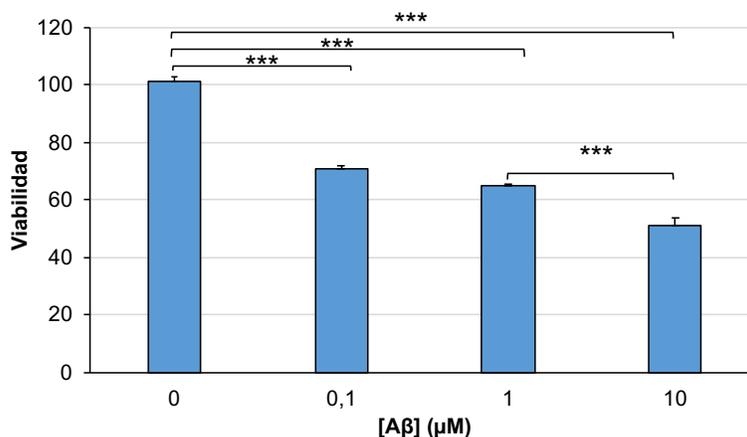


Figura 3. MTT que estudia el efecto de la exposición a concentraciones crecientes de oligómeros β -amiloide durante 24 horas en la supervivencia de las células BV2. Se expresa la viabilidad celular mediante el % de células viables con respecto al control. Los datos son la media \pm el error estándar de la media de 3 réplicas biológicas. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las distintas concentraciones de β -amiloide (***) $p < 0,001$; ANOVA de una vía).

3.3. Análisis del papel de ApoD en la viabilidad de las células BV2 tratadas simultáneamente con β -amiloide.

Una vez estudiado el efecto de los oligómeros de A β sobre la microglía, decidimos analizar el papel que juega la apolipoproteína D en el estrés oxidativo. Para ello, llevamos a cabo un MTT en el que las células BV2 eran expuestas de forma simultánea a β -amiloide ([A β]: 0 y 1 μ M) y ApoD ([ApoD]: 0, 10, 50 y 100 nM) durante 24 horas.

Los resultados ilustrados en la **Figura 4** muestran que ApoD no aumenta la viabilidad de la microglía sometida a β -amiloide. En cambio, en las células no expuestas al A β , el tratamiento con ApoD incrementa la supervivencia celular con dependencia de la dosis empleada (existiendo una tendencia no estadísticamente significativa).

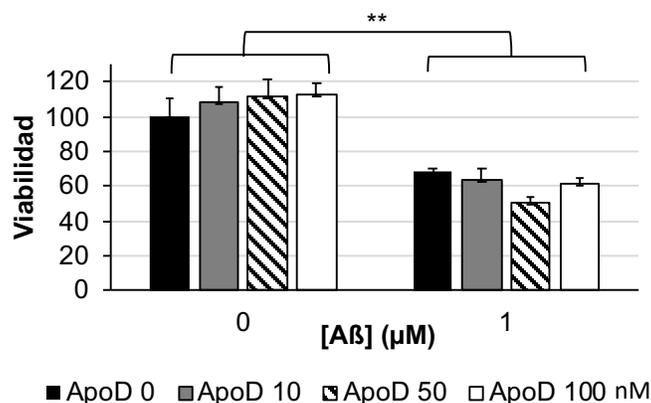


Figura 4. MTT que analiza el papel de ApoD frente al estrés oxidativo celular causado con oligómeros de β -amiloide durante 24 horas. La supervivencia celular se representa mediante el % de células viables con respecto al control ([ApoD]= 0 nM + [A β]= 0 μ M). Los datos son la media \pm el error estándar de la media de 3 réplicas biológicas. No se encontró una interacción estadísticamente significativa entre las distintas [ApoD] y el β -amiloide 1 μ M (P -valor = 0,246, ANOVA de dos vías). En cambio, sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las células no expuestas a β -amiloide y las expuestas (** P -valor < 0,004, ANOVA de dos vías).

3.4. Estudio del efecto del β -amiloide sobre la supervivencia de las células BV2 tratadas previamente con ApoD.

Como muestra el experimento anterior, existe una ausencia de cambios relevantes en la viabilidad celular al administrar simultáneamente ApoD y oligómeros de A β . Por ello, nos planteamos la realización de un MTT en el que las células eran tratadas primero con ApoD ([ApoD]= 0, 10, 50 y 100 nM) durante 24 horas, y posteriormente con β -amiloide ([A β]= 0, 0.1, 0.5 y 1 μ M) durante otras 24 horas.

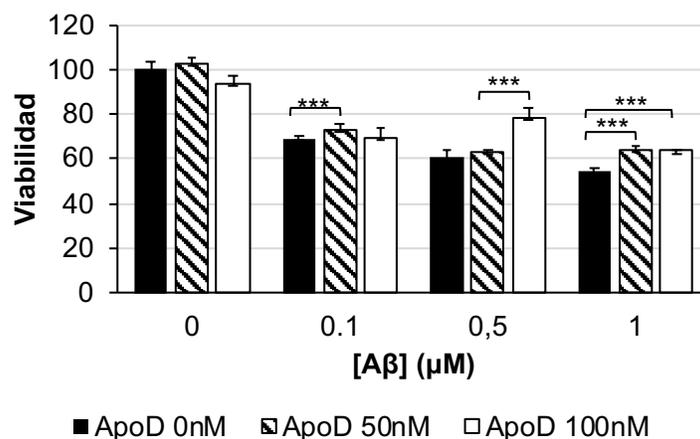


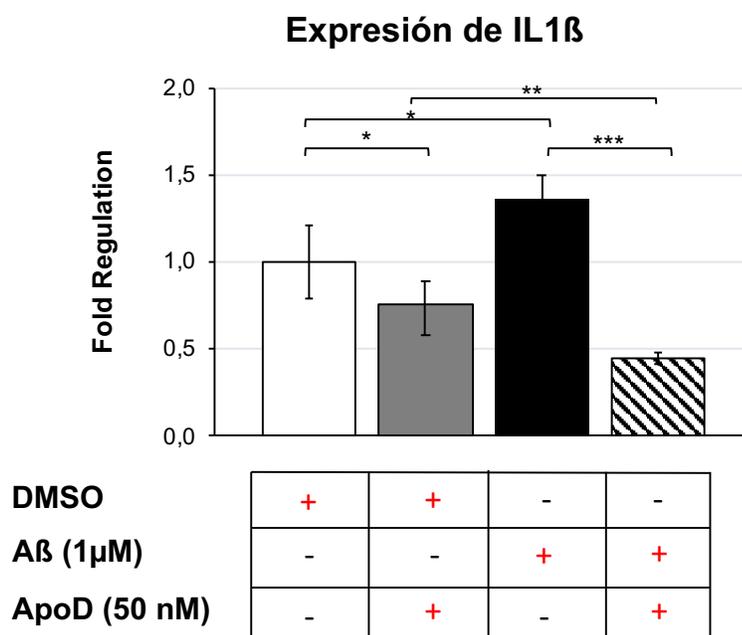
Figura 5. MTT que estudia la viabilidad de la microglía expuesta a β -amiloide al ser tratada previamente con ApoD. Se expresa la viabilidad celular mediante el % de células viables con respecto al control ([ApoD]= 0 nM + [A β]= 0 μ M). Los datos son la media \pm el error estándar de la media de 3 réplicas biológicas. Se detectó una interacción estadísticamente significativa entre ApoD y β -amiloide (*** P -valor = 0,008; ANOVA de dos vías).

La **Figura 5** muestra que el tratamiento preventivo de la microglía con ApoD disminuye de forma estadísticamente significativa el efecto perjudicial que ejerce el β -amiloide sobre las células.

3.5. Cuantificación de la expresión de IL1 β en microglía tratada con β -amiloide y ApoD.

La interleucina 1 β (IL1 β) es una citocina producida por los macrófagos/microglía activada que actúa como mediador de la respuesta inflamatoria. Para medir su expresión en las células BV2 expuestas a ApoD y oligómeros de A β , realizamos una RT-qPCR. Las concentraciones empleadas fueron: [A β] = 0 y 1 μ M y [ApoD] = 0 y 50 nM.

En la **Figura 6**, podemos observar que la expresión de IL1 β aumenta en la microglía sometida a un estrés oxidativo por oligómeros de A β . En cambio, al exponer a las células a ApoD se produce una disminución de la expresión de esta interleucina, que es más acentuada en las células BV2 tratadas con β -amiloide y ApoD. En esta PCR se detectó una interacción estadísticamente significativa entre ApoD y A β .



*Figura 6. Cuantificación de la expresión de IL1 β en microglía de ratón. Se representa la expresión de IL1 β normalizada respecto al gen L18. Las barras de error representan la desviación estándar del $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se detectó una interacción estadísticamente significativa entre ApoD y el β -amiloide (P-valor < 0,001; ANOVA de dos vías) y una diferencia estadísticamente significativa entre las células tratadas solo con ApoD y las células expuestas a ApoD y A β (**P-valor < 0,001; ANOVA de dos vías).*

3.6. Inmunocitoquímica de células BV2 tratadas con β -amiloide.

Con el objetivo de determinar si las células BV2 fagocitan el β -amiloide, se preparó una inmunocitoquímica en la que se compararon tres situaciones: células control, células en tratamiento con oligómeros de A β y células expuestas a A β y ApoD. Para ello, se empleó un marcaje con anticuerpos del β -amiloide.

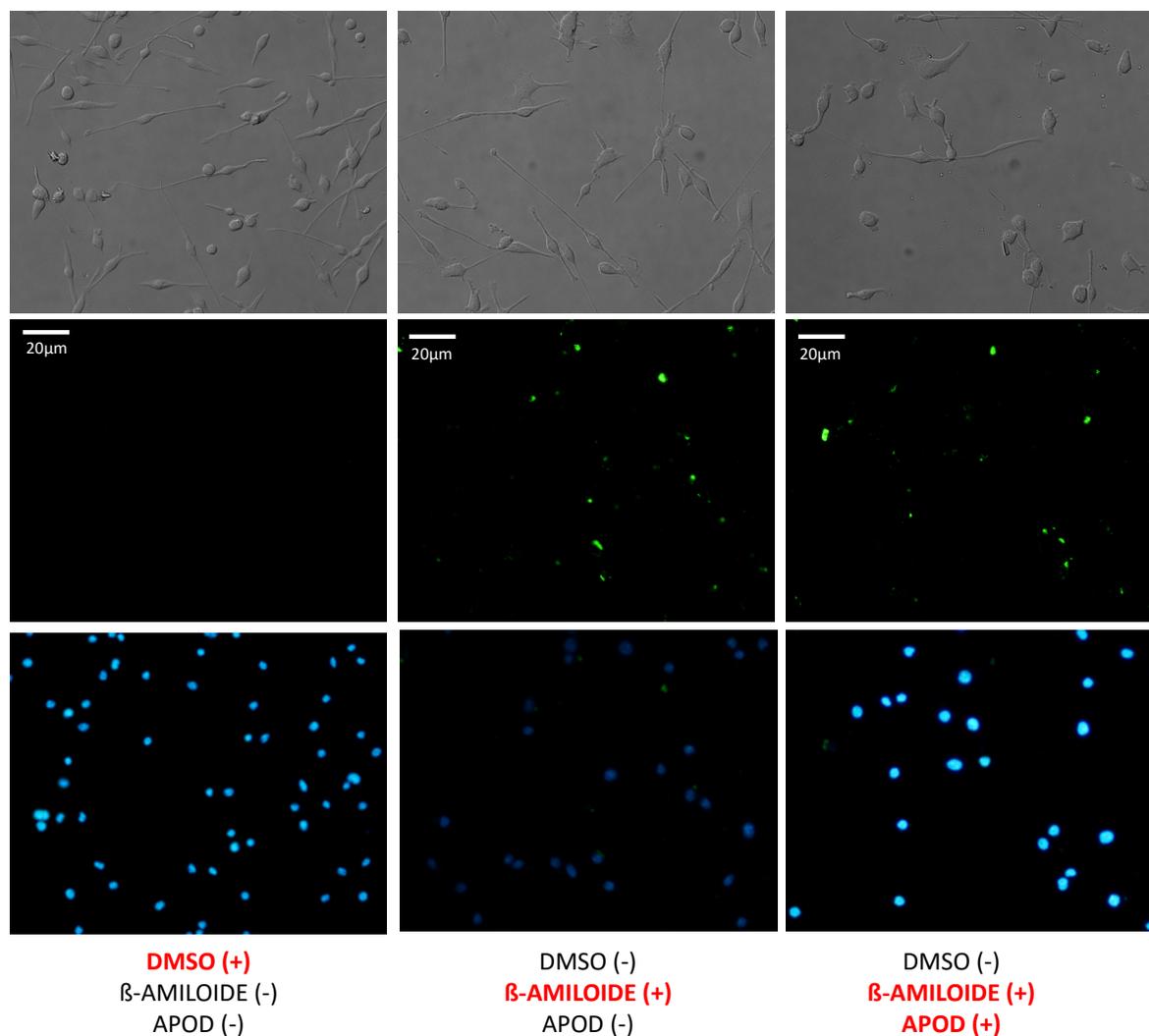


Figura 7. Inmunocitoquímica de células BV2 tratadas con β -amiloide. Se visualizaron las muestras en el microscopio de fluorescencia con el objetivo 20x y se obtuvieron fotos en DIC (imágenes superiores), en DAPI (marcaje nuclear) y en proteína verde fluorescente-GFP (imagen inferior). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas solo con β -amiloide y las tratadas con β -amiloide y ApoD (P -valor = 0,923; T -student).

Por un lado, demostramos que las células no sometidas a β -amiloide no muestran señal de fluorescencia (**Figura 7**) y que la microglía es capaz de fagocitar el A β . Por otro lado, el análisis cuantitativo establece que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al marcaje del β -amiloide entre las células tratadas solo con los oligómeros y las células tratadas con A β y ApoD.

3.7. Inmunohistoquímica para Iba1 en la microglía de ratón WT y ratón ApoD-KO.

Iba1 (*ionizing calcium-binding adaptor molecule 1*) es una proteína específica de macrófagos/microglía, cuya expresión aumenta cuando estas células se activan. Para comparar la activación de la microglía en presencia y ausencia de ApoD, hemos llevado a cabo una inmunohistoquímica con marcaje de Iba1 en cortes de corteza cerebral de ratones Wild Type (WT) y ApoD *Knock-out* envejecidos, dado que se considera que durante el envejecimiento se produce una activación de las células microgliales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al número de células con marcaje de Iba1 entre los ratones WT y los ApoD-KO (**Figura 8**).

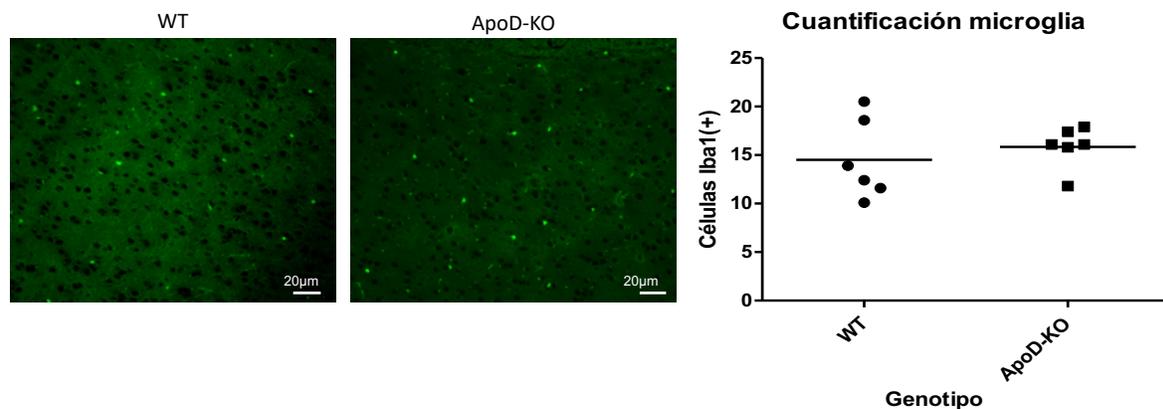


Figura 8. Inmunohistoquímica para Iba1 en cortes cerebrales de ratón. Se observaron las muestras en el microscopio de fluorescencia con el objetivo 20x y se obtuvieron imágenes en DIC y en proteína verde fluorescente-GFP (imagen) de ratones WT (n=6) y ApoD-Ko (n=6). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de ratones (P-valor =0,511; T-student).

4. DISCUSIÓN

Este trabajo tiene como objetivo esclarecer qué papel ejerce ApoD sobre la microglía expuesta a oligómeros de β -amiloide. Para ello, a lo largo de estos meses nos hemos planteado una serie de preguntas a las que vamos a intentar dar respuesta a continuación.

Con el objetivo de analizar el efecto del estrés oxidativo en la microglía, en nuestro laboratorio se llevaron a cabo varios experimentos en los que se exponía a las células BV2 a diferentes factores estresantes, como el paraquat (21) o el LPS (lipopolisacárido bacteriano). El efecto deletéreo de estas sustancias sobre la viabilidad de las células BV2 nos hizo preguntarnos: *¿Qué ocurre si exponemos a la microglía a oligómeros de β -amiloide?* Estudios previos evidencian que los oligómeros de A β inducen una respuesta inflamatoria que desencadena la activación de la microglía, alterando su función de fagocitosis y aclaramiento del A β fibrilar (15,16). Además, dichos oligómeros parecen disminuir la viabilidad de la microglía, a diferencia de lo que ocurre con la forma fibrilar (15). Nuestros resultados (**Figura 3**) corroboran que la viabilidad de estas células disminuye en presencia de oligómeros de A β con dependencia de la dosis (a mayor dosis de A β menor viabilidad).

Una vez demostrado el efecto perjudicial del β -amiloide sobre la microglía nos planteamos: *¿Es capaz ApoD de proteger a la microglía del daño causado por los oligómeros de A β ?* El papel neuroprotector de ApoD ha sido estudiado exhaustivamente a lo largo de los últimos años. Se ha demostrado que su presencia en neuronas ejerce una función protectora frente al estrés oxidativo (13,22). Sin embargo, los estudios sobre su función en la microglía han sido escasos. Por ello, una vez que en nuestro laboratorio se demostró que estas células no expresaban ApoD, pero que eran capaces de fagocitarla (21), decidimos estudiar el posible papel neuroprotector de dicha proteína en relación con la microglía. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, el tratamiento de la microglía con ApoD simultáneo al tratamiento con A β no parece proteger a las células del daño causado por los oligómeros (**Figura 4**). Sin embargo, si la microglía expuesta a A β es tratada previamente con ApoD se atenúa la disminución de la viabilidad celular causada por el β -amiloide (**Figura 5**). Este resultado, parece indicar que ApoD es capaz de prevenir el daño que causa el estrés oxidativo en la microglía, pero que una vez que el daño está establecido su papel protector se desvanece. Además, en el laboratorio se detectó que el efecto neuroprotector del

tratamiento con ApoD durante 3 horas es mayor que el del tratamiento durante 24 horas. Estudios posteriores por inmunocitoquímica revelaron que esa diferencia se debía a que con el tiempo ApoD se degrada.

Por tanto, al igual que ocurre en neuronas, ApoD parece proteger a la microglía del estrés oxidativo de los oligómeros de A β cuando se administra de forma preventiva. Pero *¿cuál es el mecanismo por el que ApoD ejerce su función neuroprotectora?* En este trabajo, se ha detectado que ApoD disminuye la expresión de una citocina proinflamatoria (IL1 β) y que dicha disminución se acentúa cuando las células son expuestas a β -amiloide **Figura 6**. Estos hallazgos parecen indicar que ApoD tiene un efecto antiinflamatorio, que es mayor en presencia de un estrés oxidativo y que podría ser el mecanismo por el que ejerce su papel neuroprotector. Resultaría interesante ampliar este estudio y analizar la expresión microglial de citocinas antiinflamatorias (IL10, TGF β , etc) en presencia de ApoD.

Conocido el posible efecto antiinflamatorio de ApoD nos preguntamos: *¿Puede esta proteína alterar la función fagocítica de la microglía?* En un estudio realizado en nuestro laboratorio por inmunocitoquímica, no se detectaron diferencias en la fagocitosis del A β por la microglía entre las células tratadas y las no tratadas con ApoD (**Figura 7**). Este hallazgo parece indicar que esta proteína no altera la función de fagocitosis de estas células. Sin embargo, este experimento se realizó con tratamiento de ApoD durante 24 horas y dado que se ha demostrado que esta proteína se degrada con el tiempo, sería adecuado repetirlo con un tratamiento a tiempos más cortos. Además, de acuerdo con la literatura científica (15) los oligómeros de A β sí influyen en la función fagocítica de las células microgliales y, por tanto, han podido actuar como un factor confusor en este estudio.

Por último, nos pareció interesante analizar qué papel juega ApoD en la activación de la microglía. Se cree que durante el envejecimiento se produce una inflamación crónica en el cerebro (*inflammaging*), en la que podría participar la microglía activada. Los resultados obtenidos demostraron que ApoD no influye en la activación microglial, al no detectarse diferencias entre los ratones Wild-Type y los ratones ApoD-KO envejecidos (**Figura 8**).

5. CONCLUSIÓN

ApoD ejerce un papel neuroprotector sobre la microglía expuesta a los oligómeros de β -amiloide, que son considerados los responsables del proceso de neurodegeneración que tiene lugar en la Enfermedad de Alzheimer. Este efecto neuroprotector podría estar relacionado con la función antiinflamatoria que juega ApoD y no tanto con la alteración de la fagocitosis o la activación microglial, sobre las que esta proteína parece tener poca influencia.

Son necesarios más estudios para esclarecer la función de ApoD en relación con la microglía y el estrés oxidativo, y de esta forma, conocer la importancia que adquiere dicha proteína en la Enfermedad de Alzheimer.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Domarus A von, Farreras Valentí P, Rozman C. Medicina interna. Barcelona: Doyma; 2012. 3111 p.
2. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*. enero de 2018;25(1):59-70.
3. Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, et al. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta*. 18 de octubre de 2000;1482(1-2):185-98.
4. Bhatia S, Knoch B, Wong J, Kim WS, Else PL, Oakley AJ, et al. Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. *Biochemical Journal*. 15 de marzo de 2012;442(3):713-21.
5. Ruiz M, Sanchez D, Correnti C, Strong RK, Ganfornina MD. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS Journal*. agosto de 2013;280(16):3928-43.
6. Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiology of Aging*. julio de 2014;35(7):1632-42.
7. Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, et al. Evolution of the Aging Brain Transcriptome and Synaptic Regulation. Orban L, editor. *PLoS ONE*. 2 de octubre de 2008;3(10):e3329.
8. Sanchez D, Bajo-Grañeras R, Del Caño-Espinel M, Garcia-Centeno R, Garcia-Mateo N, Pascua-Maestro R, et al. Aging without Apolipoprotein D: Molecular and cellular modifications in the hippocampus and cortex. *Experimental Gerontology*. julio de 2015;67:19-47.
9. Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, et al. Increased Levels of Apolipoprotein D in Cerebrospinal Fluid and Hippocampus of Alzheimer's Patients. *Journal of Neurochemistry*. 13 de noviembre de 2002;71(4):1643-50.
10. Ordóñez C, Navarro A, Pérez C, Martínez E, del Valle E, Tolvía J. Gender differences in apolipoprotein D expression during aging and in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*. febrero de 2012;33(2):433.e11-433.e20.
11. Martínez E, Navarro A, Ordóñez C, del Valle E, Tolvía J. Amyloid- β 25-35 Induces Apolipoprotein D Synthesis and Growth Arrest in HT22 Hippocampal Cells. *Journal of Alzheimer's Disease*. 21 de mayo de 2012;30(2):233-44.
12. Navarro A, del Valle E, Astudillo A, González del Rey C, Tolvía J. Immunohistochemical study of distribution of apolipoproteins E and D in human cerebral β amyloid deposits. *Experimental Neurology*. diciembre de 2003;184(2):697-704.
13. Li H, Ruberu K, Muñoz SS, Jenner AM, Spiro A, Zhao H, et al. Apolipoprotein D modulates

- amyloid pathology in APP/PS1 Alzheimer's disease mice. *Neurobiology of Aging*. mayo de 2015;36(5):1820-33.
14. Kierdorf K, Prinz M. Microglia in steady state. *Journal of Clinical Investigation*. 17 de julio de 2017;127(9):3201-9.
 15. Pan X, Zhu Y, Lin N, Zhang J, Ye Q, Huang H, et al. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2011;6(1):45.
 16. Lopategui Cabezas I, Herrera Batista A, Pentón Rol G. Papel de la glía en la enfermedad de Alzheimer. Futuras implicaciones terapéuticas. *Neurología*. junio de 2014;29(5):305-9.
 17. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*. mayo de 1990;27(2-3):229-37.
 18. Fa M, Orozco IJ, Francis YI, Saeed F, Gong Y, Arancio O. Preparation of Oligomeric β -amyloid₁₋₄₂ and Induction of Synaptic Plasticity Impairment on Hippocampal Slices. *Journal of Visualized Experiments [Internet]*. 14 de julio de 2010 [citado 29 de mayo de 2019];(41). Disponible en: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1884>
 19. Pascua-Maestro R, Corraliza-Gomez M, Diez-Hermano S, Perez-Segurado C, Ganfornina MD, Sanchez D. The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta Histochemica*. abril de 2018;120(3):179-86.
 20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. diciembre de 2001;25(4):402-8.
 21. Bendito-Guilarte B, Corraliza-Gomez M, Poncela M, Villa-Valdés M, Arribas-Rodríguez E, Ganfornina MD, et al. Role of apolipoprotein D in microglial response to oxidative stress and amyloid beta tiggeres damage. En: 18th National Meeting of the Spanish Society os Neuroscience. Santiago de Compostela; 2019.
 22. Navarro A, del Valle E, Juárez A, Martínez E, Ordóñez C, Astudillo A, et al. Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *AGE*. marzo de 2010;32(1):85-96.

7. PÓSTER

PAPEL DEL NEUROPROTECTOR APOD EN EL MANEJO MICROGLIAL DE AGREGADOS AMILOIDES

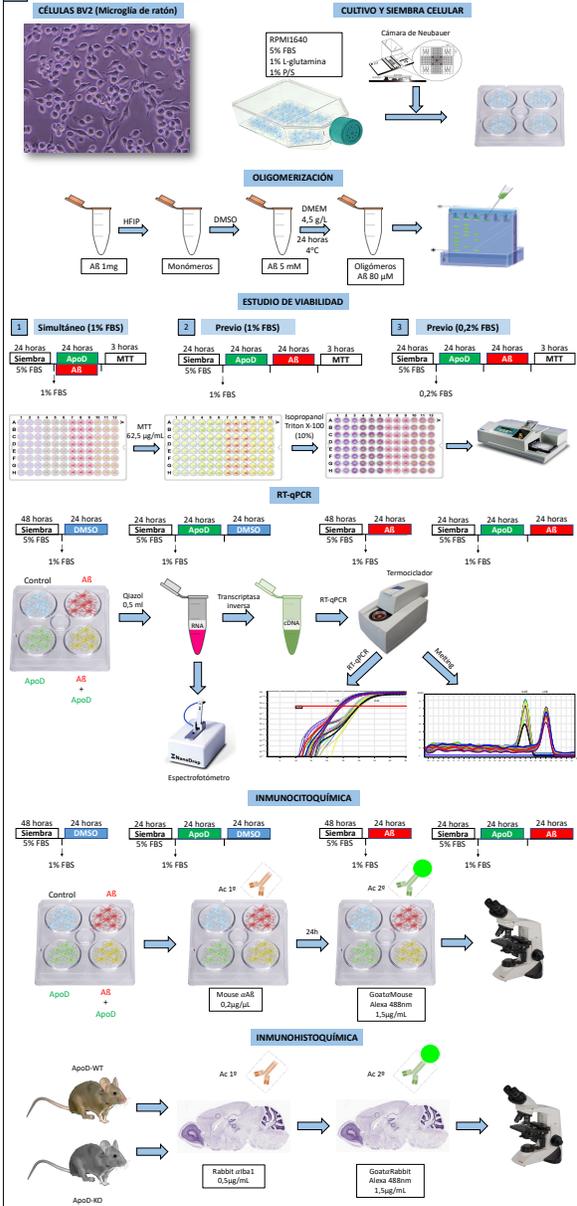


Autores: Marta Poncela Herrero, Miguel Villa Valdés
Tutores: Miriam Corralza Gómez, Diego Sánchez Romero

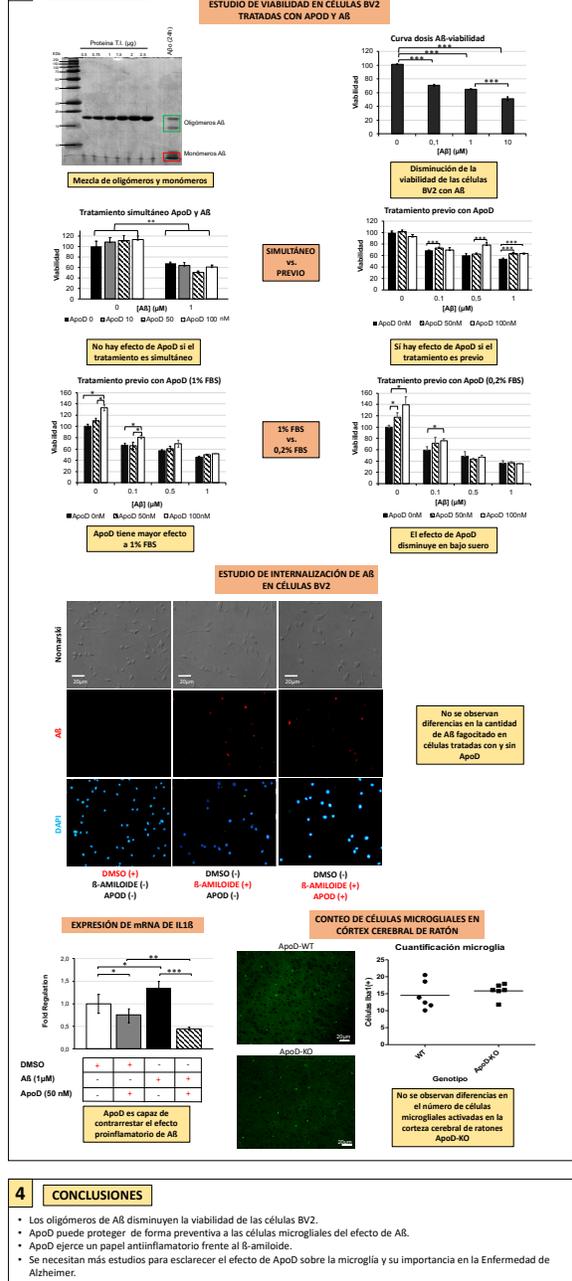
1 INTRODUCCIÓN

La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las lipocalinas, cuya expresión aumenta en el líquido cefalorraquídeo y en las regiones del sistema nervioso central afectadas por la Enfermedad de Alzheimer. El efecto neuroprotector de esta proteína ha sido estudiado en neuronas y astrocitos, en los que ha demostrado disminuir el estrés oxidativo causado por los oligómeros de β -amiloides (A β). Se cree que las células microgliales participan en la fagocitosis y aclaramiento del péptido A β , pero los estudios que relacionan estas células con ApoD son escasos. El desconocimiento del papel que juega ApoD sobre la microglía en presencia de A β , nos ha llevado a la realización de este trabajo con el objetivo de descubrir qué función puede ejercer en la Enfermedad de Alzheimer.

2 MATERIALES Y MÉTODOS



3 RESULTADOS



4 CONCLUSIONES

- Los oligómeros de A β disminuyen la viabilidad de las células BV2.
- ApoD puede proteger de forma preventiva a las células microgliales del efecto de A β .
- ApoD ejerce un papel antiinflamatorio frente al β -amiloides.
- Se necesitan más estudios para esclarecer el efecto de ApoD sobre la microglía y su importancia en la Enfermedad de Alzheimer.

FINANCIACIÓN



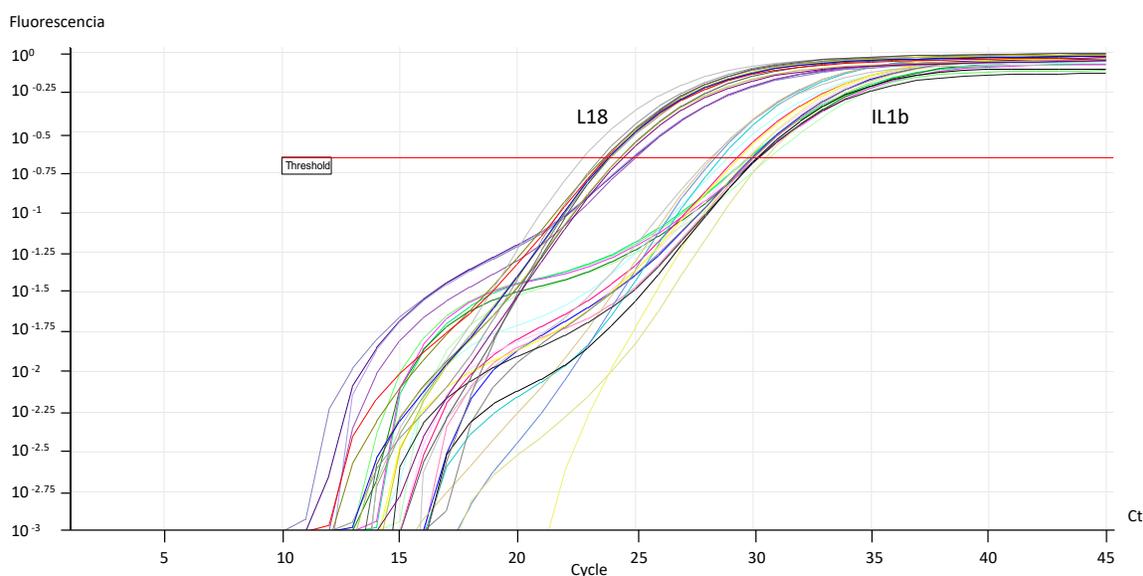
8. ANEXO

ANEXO 1. RT-qPCR: primers para IL1 β y L18.

PRIMER	SECUENCIA
Mouse Rpl18-Forward	5'-TTCCGTCTTTCCGGACCT-3'
Mouse Rpl18-Reverse	5'-TCGGCTCATGAACAACCTCT-3'
Mouse IL1 β -Forward	5'-TGTAATGAAAGACGGCACACCCAC-3'
Mouse IL1 β -Reverse	5'-GGCTTGTGCTCTGCTTGTGAGG-3'

Anexo 1. Primers para IL1 β y L18.

ANEXO 2: RT-qPCR: amplificación mediante qPCR a tiempo real.



Anexo 2. Amplificación del gen de interés (IL1 β) y el gen housekeeping (L18) mediante qPCR a tiempo real. Threshold: línea horizontal roja.

ANEXO 3. RT-qPCR: método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Tratamientos	Media Cts IL1 β	Media Cts L18	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
ApoD 0; A β 0	30.03	24.90	5.13	0	1
ApoD 50; A β 0	29.76	24.21	5.54	0,41	0,75
ApoD 0; A β 1	28.40	23.72	4.68	-0.45	1,36
ApoD 50; A β 1	30.14	23.84	6.30	1.17	0,44

Anexo 3. Cuantificación relativa de la expresión génica de IL1 β respecto L18.