



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

**ESTUDIO
DEL PAPEL Y EXPRESIÓN
DE
APOD
DURANTE
LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

Realizado por:

Eva Galindo Cantalejo

Tutor: Diego Sánchez Romero

RESUMEN

Apolipoproteína D (ApoD) es una proteína perteneciente familia de las lipocalinas. Está presente en una gran variedad tipos celulares, principalmente células gliales del SNC, en fibroblastos perivasculares y en plasma se encuentra unida a proteínas de alta densidad (HDL). Se le postula una gran multifuncionalidad derivada de su capacidad de unir numerosos ligandos, destacando entre ellos el ácido retinoico. Se encuentra elevada en procesos neurodegenerativos incluyendo el envejecimiento, así como en situaciones de estrés oxidativo y se relaciona con la longevidad. Así mismo, numerosos estudios demuestran que ApoD aumenta su expresión a nivel de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en situaciones de detención del crecimiento como pueden ser tumores bien diferenciados y es la proteína mayoritaria en los quistes benignos de mama. Hemos querido estudiar este cambio en su expresión relacionado con la proliferación a nivel proteico mediante un estudio inmunocitoquímico de ApoD y marcadores de la proliferación. El resultado es congruente con la literatura demostrando una disminución en su expresión a nivel proteico en aquellas células que se encuentran en proliferación.

ABSTRACT

Apolipoprotein D (ApoD) is a protein belonging to the lipocalin's. It is present in a large variety of cell types highlighting glial cells of the CNS, perivascular fibroblasts and in plasma, where it is bound to high-density lipoproteins (HDL). It is postulated a great multifunctionality derived from its ability to bind numerous ligands, highlighting among them retinoic acid. It is elevated in neurodegenerative processes including ageing, as well as in situations of oxidative stress and is related to longevity. In addition, numerous studies show that ApoD increases its expression at mRNA's level in growth arrest situations such as highly differentiated tumors and it is the major protein in benign breast cysts. We want to study this change of expression related to proliferation at the protein level by an immunocytochemical study of ApoD and proliferation markers. The result is congruent with the literature demonstrating a decrease in its expression at the protein level in those cells undergoing proliferation process.

INTRODUCCIÓN

La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína de 24-29 kDa (169 aminoácidos). Fue detectada por primera vez en el plasma, asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL) por Ayrault-Jarrier et al. en 1963. Más tarde en 1973 fue aislada por McConathy y Alaupovic. Tras el análisis de las diferentes apolipoproteínas unidas a las diferentes lipoproteínas del plasma, se determinó que ApoD forma parte de una familia diferente, las lipocalinas.

La principal función descrita de las lipocalinas es la unión de pequeñas moléculas hidrofóbicas y de su transporte. Esta función se realiza gracias a la presencia de un bolsillo hidrofóbico conformado por 8 cadenas antiparalelas con estructura de barril β , junto con la presencia de 3 motivos altamente conservados llamados regiones cortas de conservación (*short conserved regions – SCRs*).

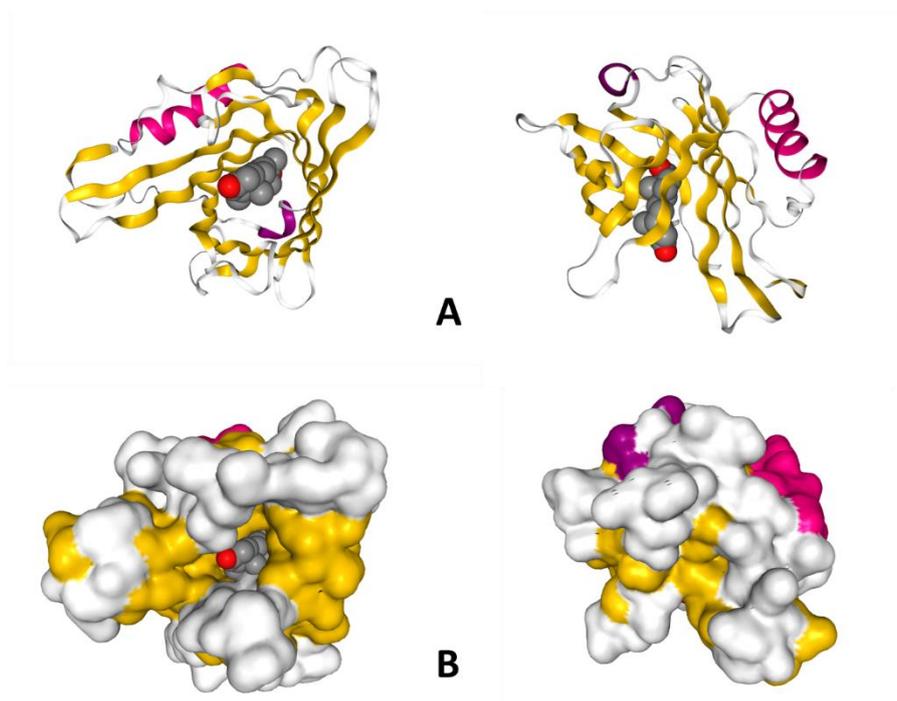


Figura 1. Estructura secundaria de ApoD y su interacción con la Progesterona. A y C. Modelos tipo "Cartoon". B y D. Modelos de superficie. Se muestran dos orientaciones ortogonales, con la entrada al bolsillo de unión visible en A y B. Imágenes obtenidas de Protein Data Bank.

Para comprender la amplia distribución de ApoD y algunas de sus funciones debemos analizar su estructura (**Figura 1**). Así ApoD está formada por:

- 8 cadenas antiparalelas que conforman la estructura de barril β . Siendo el principal lugar de unión a ligandos hidrofóbicos. Algunos de los ligandos conocidos se representan en la **(Tabla 1)**.
- El Ω -loop (lazo de unión entre dos cadenas beta), el cual presenta alto contenido en cisteína con un grupo sulfuro (-SH) libre que puede unirse a otros residuos de cisteína formando dímeros y trímeros y complejos con otras moléculas.
- El residuo N-terminal 3_{10} - α -hélice, presente en proteínas relacionadas con el tráfico endosomal, sirviendo como “dispositivo de anclaje” a las membranas intracelulares.

<i>Ligandos</i>	<i>Posibles Ligandos</i>
1. Ácido araquidónico	1. Colesterol
2. Ácido retinoico todo trans	2. β -Estradiol
3. Progesterona y Pregnenolona	3. Bilirrubina
4. Ácido Palmítico	
5. Retinol	
6. Anandamida	
7. Palmitoil esfingomielina	
8. Odorante axilar E-3M2H	

Tabla 1. Ligandos y posibles ligandos de ApoD. Ordenados en función de su afinidad (Kd) por ApoD.

Tras la descripción estructural observamos la presencia de elementos comunes con las lipocalinas, demostrándose recientemente que ApoD es una de las proteínas más conservada a lo largo de la evolución dentro de este grupo (1).

La presencia de ApoD es tanto extracelular como intracelular. A nivel extracelular se encuentra unida en plasma a las HDL. Sin embargo, respecto a otras apolipoproteínas del plasma, observamos que es una apolipoproteína atípica. Las principales apolipoproteínas tienen una alta expresión en hígado e intestino, pero ApoD se expresa ampliamente en una gran variedad de órganos y tejidos (cerebro, nervios periféricos, tejido adiposo, testículos, glándulas mamarias...).

A nivel intracelular recientemente se ha descubierto su localización en el interior de los lisosomas cercanos a la membrana celular exterior (2) y en vesículas alrededor de la membrana perinuclear. El paso de ApoD a través de la membrana celular aún es desconocido, pero algunos autores han sugerido la presencia de un receptor de ApoD a este nivel. La función de este supuesto receptor realizaría la internalización de ApoD desde el plasma hacia el interior de las células (3). Estos estudios aún están en duda pues los receptores propuestos no parecen demasiado específicos para esta molécula. Debido a las diferentes localizaciones de ApoD, tanto extracelular como intracelular, la mayoría de sus funciones están aún por determinar.

Actualmente sabemos que ApoD tiene relevancia directa con la función saludable del cerebro, así como su implicación en enfermedades neurodegenerativas o cardiovasculares (4,5). Además, se han demostrado grandes niveles de ApoD en células sometidas a estrés oxidativo y en células senescentes (6). Este aumento de expresión de ApoD en relación al envejecimiento celular es un fenómeno conservado en los mamíferos. En cuanto a su función, actualmente se considera a ApoD una proteína multiligando y multifuncional, teniendo una función transportadora de pequeñas moléculas hidrofóbicas gracias a su estructura y siendo su principal ligando el ácido araquidónico (AA), además de realizar pequeñas modificaciones durante su transporte.

Por otra parte, presenta una función protectora frente al estrés oxidativo. Recientemente se ha demostrado que ejerce dicha función a través de la estabilización de la membrana lisosomal (2) mediante reducción de los hidroxiperoxidos de AA a hidróxidos lipídicos a través del residuo de metionina 93 (elemento muy conservado en la familia de las Lipocalinas) (1).

ApoD interviene en rutas de inflamación, inhibiendo la disponibilidad de AA, mediante la regulación de la fosfolipasa A2 (PLA2). Esta acción es muy relevante pues el AA es el mayor precursor de prostaglandinas y leucotrienos, que intervienen en la mayoría de los procesos inflamatorios.

El gen de la apolipoproteína humana (hAPOD) está localizado en el cromosoma 3, localización 3q29 y está formado por una región promotora y 5 exones. La

multitud de sustancias que interviene en su regulación transcripcional queda resumida en la **(Figura 2)**.

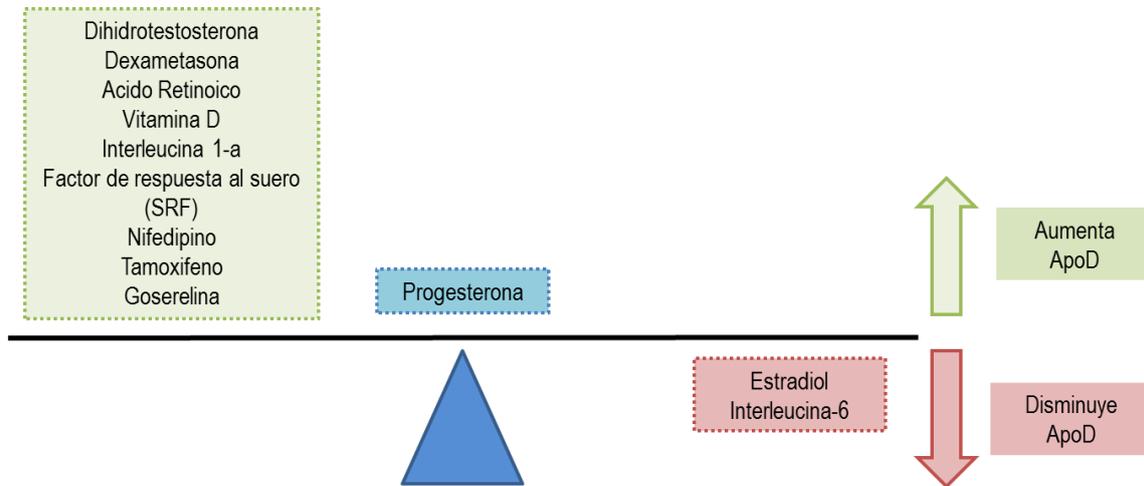


Figura 2. Regulación transcripcional de hAPOD. Los factores en el lado izquierdo de la imagen (verdes) aumentan la transcripción. Los factores en el lado derecho (rojo) disminuyen transcripción. La progesterona (azul) aumenta o disminuye, y a veces no tiene influencia en la transcripción. El mecanismo de actuación del tamoxifeno y de la goserelina es a través de la inhibición de los estrógenos aumentando así la transcripción. Adaptado de (7).

Con la información disponible podemos decir que ApoD es una glicoproteína que interviene en el mantenimiento de la homeostasis celular, así como su preservación frente al paso del tiempo. En estudios recientes se ha descrito que ApoD se encuentra elevada en tumores bien diferenciados en relación con tumores menos diferenciados (anaplásicos) (8,9). Esto nos lleva a pensar que podría existir una posible relación entre ApoD y la proliferación y diferenciación celular y que es razonable preguntarse si ApoD tiene algún papel en la regulación del ciclo celular.

Por tanto, decidimos realizar por un lado una revisión sistemática, con el objetivo de esclarecer los antecedentes acerca de si ApoD interviene en la proliferación celular y, por otro lado, probar experimentalmente si existe una relación entre la expresión y la localización celular de ApoD y el ciclo celular a través de una medida directa.

OBJETIVOS

Primer objetivo:

Revisar la bibliografía disponible hasta el momento usando como objeto de la búsqueda, ApoD y su función en la división celular y proliferación.

Segundo objetivo:

Realizar un estudio inmunocitoquímico para observar la distribución celular de ApoD durante el ciclo, así como valorar su expresión a nivel proteico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Primer objetivo:

Para revisar la información disponible acerca de ApoD y su papel en la proliferación, se realizó una revisión sistemática utilizando la plataforma “PubMed” y las palabras clave “ApoD”, “Apolipoprotein D”, “Cellular division” “Cell division” “Cell cycle”, “Growth arrest”, y “Proliferation”.

El resultado fue de 320 artículos, de los cuales se descartaron los artículos repetidos dando un resultado de 93 en total (**Tabla 2**).

	<i>Cell Division</i>	<i>Cellular Division</i>	<i>Proliferation</i>	<i>Cell Cycle</i>	<i>Growth Arrest</i>	<i>Total por grupos</i>	<i>Total</i>
<i>ApoD</i>	33	39	35	37	11	155	320
<i>Apolipoprotein D</i>	38	42	38	38	9	165	

Tabla 2. Número de artículos según las palabras claves seleccionadas.

Se procedió a la lectura de los resúmenes de los 93 artículos seleccionando para su lectura completa según los siguientes criterios de inclusión:

- ApoD se encontrara como palabra clave.
- ApoD apareciera como uno de los objetivos principales del estudio.

- En caso de cumplir los dos criterios anteriores, se ampliaba la lectura a las conclusiones y ApoD debía aparecer en al menos una de las conclusiones.

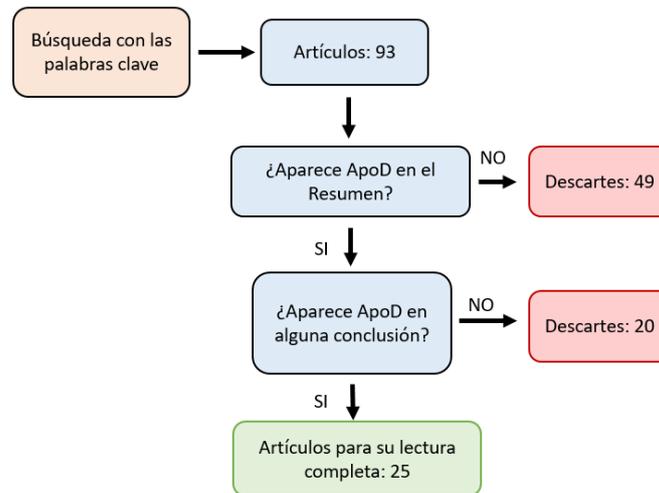


Figura 3. Diagrama de flujo que muestra el proceso de selección de artículos en la revisión sistemática.

Tras esta búsqueda exhaustiva se seleccionaron como válidos 25 artículos, que han sido empleados para la realización de este trabajo.

Segundo objetivo:

Se decidió realizar un estudio inmunocitoquímico que permitiera valorar tanto la distribución como la expresión de ApoD a nivel proteico en la célula durante el ciclo celular del fibroblasto.

1. Cultivo celular

Se eligió la línea celular de fibroblastos humanos. El motivo principal de seleccionar los fibroblastos para el estudio inmunocitoquímico se debió a varias razones. Por un lado, el ciclo celular normal de fibroblastos de 24-72 horas nos permitía garantizar que podríamos encontrar las células en diferentes fases del ciclo celular.

Por otro lado, numerosos estudios realizados en esta estirpe celular han demostrado a través de la cuantificación de ARNm de ApoD, un aumento de su expresión en fibroblastos en fase quiescente en comparación con fibroblastos en fase proliferativa.

El proceso se inició con la descongelación de fibroblastos humanos primarios de la línea F72 pase 2 (temprano), pertenecientes a un varón sano de 34 años, realizándose la extracción del 17.12.1992. Los fibroblastos se cultivaron con el medio 199 + glutamina, con 20% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomina.

2. Fijación de las células en cubres de polilisina

A los 8 días de cultivo, los fibroblastos alcanzaron la confluencia y se procedió a realizar un pase celular. A los tres días del pase celular, procedimos a la fijación de las células en cubres de polilisina que previamente habíamos fabricado.

Para la fijación, contamos las células con la cámara de Neubauer y calculamos los mililitros necesarios del cultivo para tener un número aproximado de 75.000 células por pocillo y el resultado fue de 750 ml por pocillo. Dejamos que se completara la fijación durante 24h.

Elegimos un total de cuatro pocillos, uno como control de ApoD, otro como control de EdU, y finalmente dos destinados al experimento de los cuales uno de ellos recibiría tratamiento con EdU durante 6 horas, y el otro durante 24 horas.

3. Tratamiento con EdU

Medir la capacidad de las células de proliferar era imprescindible para el objetivo que deseábamos demostrar. Para ello, las técnicas de elección son aquellas que miden directamente la síntesis de DNA, el protocolo Click-iT® con EdU (Invitrogen) (10).

EdU (5-etil-2-dexosyuridina) es un nucleósido análogo de la timidina y que se incorpora al ácido desoxirribonucleico (ADN) durante la síntesis de ADN. Su detección está basada en una reacción *Click-iT*. Una reacción *Click-iT* es una reacción covalente catalizada por un cooperador entre un ácido y una base. En el protocolo que utilizamos, el EdU contiene la base y el Alexa Fluor 594 nm contiene el ácido (**Figura 4**).

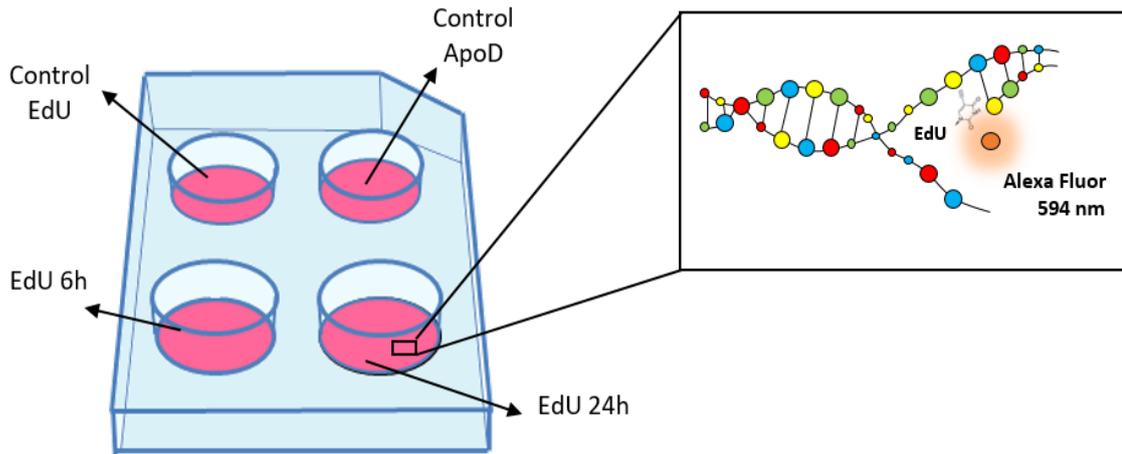


Figura 4. Imagen ilustrativa del funcionamiento del EdU.

4. Inmunocitoquímica

Para la caracterización de la localización intracelular de ApoD se fijaron las células con 4% de formaldehído en PBS. Tras varios lavados con PBS con 0,1% Tween-20 (BioRad) se procedió al bloqueo con suero de cabra durante treinta minutos. Nuevamente, tras tres lavados con PBS las células fueron incubadas durante dos horas con el anticuerpo primario anti-ApoD humana (dilución de trabajo 1:1000) y posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488 (Jackson Labs; dilución de trabajo 1:1000). Por último, se lavaron de nuevo con PBS y fueron montadas con Vectashield-DAPI (Vector Labs) para el marcaje de los núcleos y se sellaron con CoverGrip™ Coverslip Sealant (Biotium).

5. Microscopio de Fluorescencia

Las células se visualizaron y fotografiaron con un equipo de microscopía fluorescente Eclipse 90i (Nikon) con una cámara digital DS-Ri1 (Nikon). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con el software NIS-Elements BR 3.0 (Nikon).

RESULTADOS

Primer objetivo:

Dada la poca información del papel de ApoD en la regulación del ciclo celular, pero existiendo algunos indicios de una posible implicación, decidimos realizar una revisión sistemática, con el objetivo de esclarecer si ApoD interviene en la proliferación celular y responder la pregunta:

¿Participa ApoD en la proliferación y/o diferenciación celular?

Tras la lectura y análisis de los 25 artículos seleccionados, la gran mayoría (23 de 25) coincide en que existe un cambio en la expresión de ApoD, a nivel de ARNm en relación con la proliferación celular. De tal forma que ApoD aumenta su expresión en condiciones de detención del crecimiento y diferenciación celular, y, por el contrario, su expresión desciende en condiciones de mayor tasa proliferativa. El resto de artículos (3 de 25) estudian otros aspectos de ApoD que no tienen relación con la proliferación celular.

El primer estudio (11) que afirma la implicación de ApoD, data de 1993 y demuestra un aumento en la expresión de ApoD en fibroblastos perivasculares en fase quiescente o senescente. A partir de ahí, numerosos estudios lo demostraron en otros tipos celulares como osteoblastos (12), músculo liso perivascular (13) y, especialmente en numerosos tipos de cáncer.

El cáncer es un tema ampliamente estudiado y, muchos artículos señalan que ApoD se expresa en altas concentraciones en aquellos cánceres bien diferenciados y su expresión desciende medida que el tumor progresa y pierde su diferenciación. Es por ello que ApoD ha sido propuesta en varias ocasiones como un posible marcador de benignidad en algunos tipos de cáncer. Este cambio de expresión queda demostrado en muchos modelos de cáncer como el neurofibroma y neuroblastoma (8), el cáncer de próstata (14), cáncer colorrectal (15) y el cáncer de mama (16,17).

El cáncer de mama es el modelo de cáncer más estudiado ya que ApoD es la proteína más abundante en los quistes benignos de mama (18). Las células de cáncer de mama expresan ApoD en una relación directamente proporcional con

la benignidad, sin embargo, esto solo es así en aquellas células con receptores de estrógenos positivos.

No todos los estudios se dedican a constatar la variación de la expresión de ApoD con la proliferación, algunos de ellos intentan descubrir las vías a través de las cuales varía esta expresión.

Numerosas moléculas pueden dar lugar a la activación de la expresión de ApoD y lo hacen a través de su promotor. Más concretamente se ha demostrado que la zona implicada en el aumento de expresión de ApoD durante la detención del crecimiento es la región 558-179 del promotor y, dentro de esta región existen varias zonas reguladoras a las que se unen diferentes proteínas y permiten la activación del gen. Entre estas zonas reguladoras, las más destacadas son SER (región de respuesta al suero) y una zona que alterna purinas y piridiminas. A través de estas regiones, tanto p73 (19) como otras proteínas conocidas como reguladoras de la transcripción (Parp1, APEX1 y ERK1/2) pueden activar el promotor del gen hAPOD (20,21).

Sin embargo, en estos estudios, para conseguir la detención del crecimiento utilizan la privación de suero por lo que es difícil asignar de forma no ambigua estos resultados a un papel de ApoD en la proliferación. Dado que no es una detención del crecimiento fisiológica, sino que responde a un estrés exógeno, la elevación de ApoD podría deberse a una respuesta a dicho estrés y no podría asegurarse que la región 588-179 sea la responsable del aumento de expresión en detención del crecimiento. Los propios autores de dichos artículos debaten sobre esta cuestión, asegurando que se necesitan más estudios al respecto.

Por último, a uno de los ligandos de ApoD más estudiados, el ácido retinoico se le conocen funciones como potenciador de la diferenciación celular. Pues bien, el ácido retinoico, es capaz de elevar los niveles de ApoD en situaciones de detención del crecimiento y diferenciación celular. El ácido retinoico actúa a través de un mecanismo de activación en el que los retinoides se unen a un receptor específico, el RAR α , que es un receptor intracelular no unido a las membranas. Así, este receptor una vez unido a ácido retinoico, se transloca al núcleo y actúa como factor de transcriptor activando al promotor de ApoD (8,9).

Sin embargo, aunque estos estudios demuestran un cambio en la expresión de ApoD según el estado proliferativo de la célula, la mayoría de los estudios se refieren a ARNm. Pocos mencionan la expresión de la proteína que, al fin y al cabo, es la parte funcional, y los que lo hacen refieren que no es un aumento tan significativo.

Segundo objetivo:

Dado que nuestro objetivo era determinar si existía una variación significativa de la expresión proteica de ApoD según el estado proliferativo de la célula, realizamos una detección inmunocitoquímica de ApoD en fibroblastos humanos, a los cuales se les había sometido a tratamiento con EdU. El EdU se incorpora al ADN celular en el momento de la división lo cual nos permite diferenciar a las células que se han dividido durante el periodo de tratamiento (Edu positivas) y las que no lo han hecho (Edu negativas)

El análisis consistió en determinar la densidad integrada de cada célula, y comparar dicho parámetro en las células Edu positivas (EdU (+)) con las Edu negativas (EdU (-)), tanto a las 6 horas como a las 24 horas. La densidad integrada (DI) representa la suma de intensidades de todos los píxeles del área seleccionada (en este caso, se seleccionó el área de cada célula). Es un sistema de 8 bits en el que la intensidad tiene niveles que van de 0 a 255.

Tras la toma de fotografías con el equipo de microscopía de fluorescencia, procedimos a su análisis a través del programa FIJI (**Figura 5**).

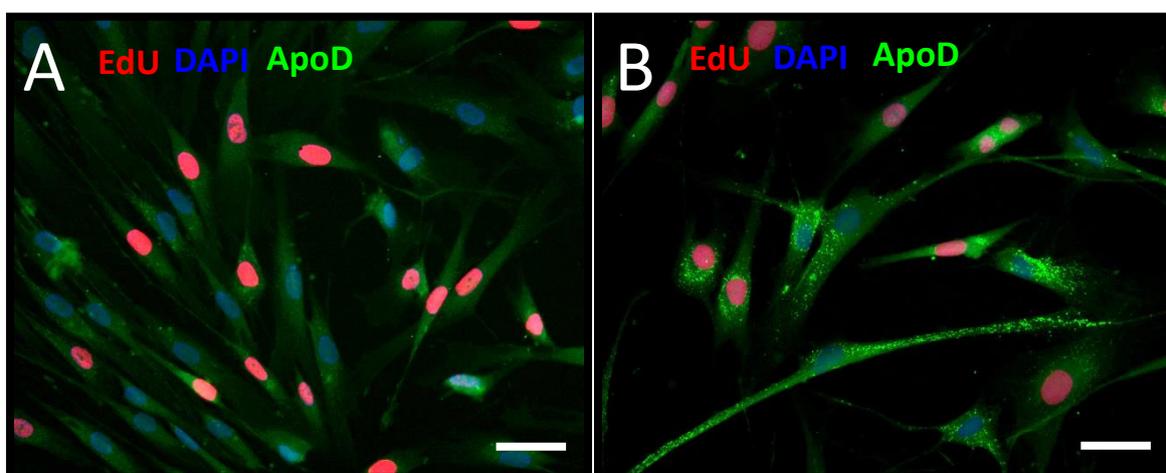


Figura 5. Imágenes representativas de epifluorescencia de células en proliferación (EdU) marcadas con anticuerpo anti-ApoD. A. Tras 6 horas de tratamiento con EdU. B. Tras 24 horas de tratamiento con EdU. Barras de calibración: 50 micrómetros.

En el cultivo de 6 horas con EdU, se analizaron un total de 142 células y en el cultivo de 24 horas, un total de 70 células, obteniendo los resultados que se muestran en la **(Tabla 3)**.

	6h		24h	
Densidad Integrada (UA)	Edu (+) 77 células	Edu (-) 65 células	EdU (+) 46 células	EdU (-) 24 células
Promedio	558940	624258	358366	578022
Mediana	451293	471726	325751	499957
SD	354746	407155	168414	452693

Tabla 3. Valores estadísticos de las células a las 6h y a las 24h de tratamiento con EdU.

Los resultados muestran que, a las 6 horas, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p=0.29$) entre las medianas de la densidad integrada, al comparar las células EdU positivas con las células EdU negativas.

Los resultados **(Figura 6)** muestran que, a las 24 horas, hay diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre las medianas de la densidad integrada, al comparar las células EdU positivas con las células EdU negativas.

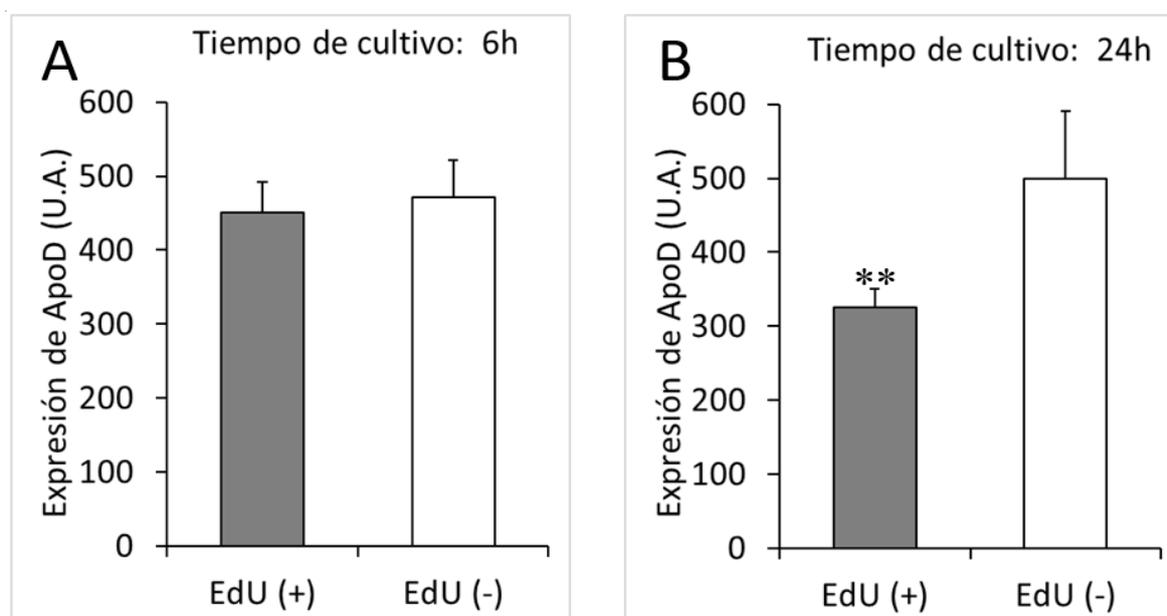


Figura 6. Gráficas comparativas sobre las medianas de las densidades integradas de las células Edu (+) y Edu(-). **A.** Resultados a las 6 horas de tratamiento con EdU. No hay diferencias significativas entre células EdU (+) y EdU(-). **B.** Resultados a las 24 horas de tratamiento con EdU. Hay diferencias significativas entre células EdU (+) y EdU (-).

DISCUSIÓN

La división celular siempre ha sido un proceso de gran importancia biológica y complejidad. Muchos de sus mecanismos están lejos aún de ser completamente comprendidos, pero parecen ser la clave en el abordaje de muchas enfermedades, entre ellas el cáncer.

En células no cancerosas, conservar la capacidad de proliferación acorde al tipo celular correspondiente parece ser un signo de salud celular. De esta forma, diversas situaciones pueden llevar a un descenso en la proliferación celular como por ejemplo en respuesta al estrés oxidativo o bien a restricción de suero en cultivos celulares. Así mismo otras situaciones pueden desembocar en un aumento patológico de la proliferación. Por ejemplo, durante la transformación maligna de las células se pierden los mecanismos de control de la división celular dando lugar a una proliferación incontrolada y anárquica que lleva a la destrucción del tejido donde asienta dicha célula.

Entre todas las proteínas que se encuentran implicada en la regulación de la proliferación celular podría encontrarse ApoD. Los resultados de la revisión sistemática que hemos realizado, parecen apuntar a que existe un cambio en la expresión de ApoD dependiente del estado proliferativo de las células. Así, en condiciones en que la tasa de proliferación es baja, especialmente en células confluyentes o senescentes, se activa la transcripción de ApoD y aumentan significativamente los niveles de ARNm. Lo contrario ocurre en casos de alta tasa proliferativa en los que los niveles de ARNm de ApoD se encuentran severamente disminuidos.

Sin embargo, aunque todos los estudios parecen estar de acuerdo en este cambio en la expresión de ApoD, pocos se aventuran a intentar descifrar el cómo y el porqué de esta variación.

La clave del cómo podría encontrarse en el promotor de ApoD. Varios estudios apuntan a que el aumento de transcripción relacionada con la detención del crecimiento se encuentra en una zona concreta del promotor (de la posición 588 a la 179) que, a su vez, tienen zonas de unión a las que se unirían diversas proteínas que, activan al gen de ApoD. Sin embargo, las condiciones del estudio

en las que usan la privación de suero para detener el crecimiento no permiten identificar si la elevación en la expresión de ApoD se debe realmente a esta parada en la proliferación o bien es una respuesta al estrés que sufre la célula ante la falta de suero en el medio de cultivo. Son necesarios por tanto más estudios para acabar de comprender cómo se comporta el promotor de ApoD ante variaciones específicas en la proliferación y qué zonas y proteínas están implicadas en su activación.

En cuanto al porqué es aun si cabe más incierto. Podría ser que el aumento de ApoD en respuesta a la detención del crecimiento se debiera a su papel protector ante el estrés oxidativo y una posible implicación en la respuesta antiinflamatoria. De tal forma, la elevación de ApoD tendría como objetivo reparar la causa que produce la detención del crecimiento. Sin embargo, la adicción exógena de ApoD conlleva un descenso en la tasa proliferativa y un aumento de la diferenciación celular. De hecho, en el caso de diversos modelos del cáncer, los niveles de ApoD aumentan proporcionalmente al grado de diferenciación del cáncer, de manera que cánceres más diferenciados y, por tanto, más benignos tenían altos niveles de ApoD. Así mismo el ácido retinoico, conocido ligando de ApoD, ejerce su papel en la diferenciación neuronal a través de la activación del promotor de ApoD por factores de transcripción específicos. La diferenciación a su vez, implica una detención de la proliferación celular y podría ser este el mecanismo por el cual ApoD tiene un papel en la diferenciación celular.

Los estudios analizados, hacen referencia a la expresión de ApoD a nivel de ARNm, sin embargo, pocos analizan cuánto de ese ARNm llega a traducirse en proteína y, los que lo hacen, no obtienen resultados tan significativos. Los niveles proteína aumentan con la detención del crecimiento, pero no de una forma proporcional al aumento de la transcripción. El por qué no está muy claro, pero, a la hora de intentar determinar la función de ApoD, debemos analizar la proteína. Es por ello que decidimos realizar una inmunocitoquímica de ApoD para comparar la expresión a nivel proteico en células en división con células en reposo.

Los resultados muestran que, a las 24 horas hay un descenso de la cantidad de ApoD en aquellas células que o bien se están dividiendo o bien lo han hecho en

las últimas 24 horas y por tanto son EdU (+). No existen diferencias significativas en la cantidad de ApoD a las 6 horas.

Esto nos sugiere varias posibles explicaciones. Por un lado, es posible que este descenso de ApoD se deba a la distribución equitativa durante la división celular, que deje a la célula con la mitad de proteínas al completar el ciclo.

También es posible que se deba a que las células EdU (-), sean células senescentes o que han entrado en fase G0 y por tanto mantengan altos niveles de expresión de ApoD mientras que las células Edu (+), estén en fase proliferativa y, como sugiere la literatura, expresen por ello menos ApoD.

En experimentos preliminares que habíamos realizado anteriormente en células 1321N1, de astrocitoma, comprobamos que era necesario que parte de las células entraran en G0 para poder apreciar los cambios en la expresión de ApoD en relación con la proliferación. Las células de astrocitoma humano, al ser una línea inmortalizada con una elevada tasa de proliferación, no entraban nunca en fase G0 y nos impedía apreciar diferencias.

En cualquier caso, aunque los cambios de expresión de ApoD según el estado de proliferación parezcan claros, tanto a nivel de ARNm, como a nivel proteico, son necesarios estudios en profundidad para llegar a comprender el porqué de este mecanismo. Dado que ApoD cada vez más está demostrando ser una proteína multifuncional y multiligando su posible implicación en la proliferación celular podría estar en relación con un papel homeostático en el metabolismo de la célula con funciones protectoras a distintos niveles y también en relación con la respuesta antioxidante y antiinflamatoria.

CONCLUSIONES

- La revisión sistemática sugiere que ApoD sufre cambios según el estado proliferativo de la célula en numerosos tipos celulares.
- La mayoría de los estudios se centran en la cuantificación de ARNm de ApoD, pero no evalúan su expresión proteica y localización en la célula.
- La mayoría de los estudios (23 de 25) sugieren que la expresión de ApoD es mayor en fases de senescencia y quiescencia que durante las fases proliferativas.

- Nuestros resultados experimentales muestran un descenso de ApoD estadísticamente significativo en las células EdU (+) (aquellas que se han dividido durante el tratamiento) a las 24 horas. A las 6h de tratamiento con EdU, no se muestran resultados estadísticamente significativos.
- Los resultados apoyan la literatura demostrando un descenso en la expresión de ApoD en las células en proliferación.
- Es necesario realizar más estudios para determinar el papel de ApoD en la proliferación y diferenciación celular.

AGRADECIMIENTOS

A nuestros tutores Lola y Diego por enseñarnos siempre con una sonrisa. A Raquel por todo su trabajo, ánimo y empeño en ayudarnos en esta aventura. Y, en definitiva, a todo el equipo del laboratorio *Lazarillo* por inculcarnos la importancia de la investigación y guiarnos en este proyecto. Esperamos que este trabajo sea un paso más en el largo camino de descubrir ApoD. Muchas gracias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ganfornina MD, Gutiérrez G, Bastiani M, Sánchez D. A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol Biol Evol.* 2000 Jan;17(1):114–26.
2. Pascua-Maestro R, Diez-Hermano S, Lillo C, Ganfornina MD, Sanchez D. Protecting cells by protecting their vulnerable lysosomes: Identification of a new mechanism for preserving lysosomal functional integrity upon oxidative stress. Lu B, editor. *PLOS Genet.* 2017 Feb 9;13(2):e1006603.
3. Najyb O, Brissette L, Rassart E. Apolipoprotein D Internalization Is a Basigin-dependent Mechanism. *J Biol Chem.* 2015 Jun 26;290(26):16077–87.
4. Tsukamoto K, Mani DR, Shi J, Zhang S, Haagensen DE, Otsuka F, et al. Identification of apolipoprotein D as a cardioprotective gene using a mouse model of lethal atherosclerotic coronary artery disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 15;110(42):17023–8.
5. Navarro A, Méndez E, Diaz C, del Valle E, Martínez-Pinilla E, Ordóñez C, et al. Lifelong expression of apolipoprotein D in the human brainstem: correlation with reduced age-related neurodegeneration. *PloS One.* 2013;8(10):e77852.
6. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell.* 2008 Aug;7(4):506–15.

7. Søliland H, Søreide K, Janssen EAM, Körner H, Baak JPA, Søreide JA. Emerging concepts of apolipoprotein D with possible implications for breast cancer. *Cell Oncol Off J Int Soc Cell Oncol*. 2007;29(3):195–209.
8. Hunter S, Weiss S, Ou C-Y, Jaye D, Young A, Wilcox J, et al. Apolipoprotein D is down-regulated during malignant transformation of neurofibromas. *Hum Pathol*. 2005 Sep;36(9):987–93.
9. Hunter S, Young A, Olson J, Brat DJ, Bowers G, Wilcox JN, et al. Differential expression between pilocytic and anaplastic astrocytomas: identification of apolipoprotein D as a marker for low-grade, non-infiltrating primary CNS neoplasms. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Mar;61(3):275–81.
10. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2415–20.
11. Provost PR, Marcel YL, Milne RW, Weech PK, Rassart E. Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett*. 1991 Sep 23;290(1–2):139–41.
12. Martineau C, Najyb O, Signor C, Rassart É, Moreau R. Apolipoprotein D deficiency is associated to high bone turnover, low bone mass and impaired osteoblastic function in aged female mice. *Metabolism*. 2016 Sep;65(9):1247–58.
13. Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, Yablonsky S, Leung W, Massaeli H, et al. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Dec;23(12):2172–7.
14. Simard J, Veilleux R, de Launoit Y, Haagensen DE, Labrie F. Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 1991 Aug 15;51(16):4336–41.
15. Bajo-Graneras R, Crespo-Sanjuan J, Garcia-Centeno RM, Garrote-Adrados JA, Gutierrez G, Garcia-Tejeiro M, et al. Expression and potential role of apolipoprotein D on the death-survival balance of human colorectal cancer cells under oxidative stress conditions. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Jun;28(6):751–66.
16. López-Boado YS, Klaus M, Dawson MI, López-Otín C. Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RARalpha-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 1996 Dec 13;271(50):32105–11.
17. López-Boado YS, Tolviva J, López-Otín C. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1994 Oct 28;269(43):26871–8.
18. Balbín M, Freije JM, Fueyo A, Sánchez LM, López-Otín C. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem J*. 1990 Nov 1;271(3):803–7.

19. Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Anbo N, Ohori K, Idogawa M, et al. p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene. *J Biol Chem*. 2009 Jan 9;284(2):872–83.
20. Levros L-C, Do Carmo S, Edouard E, Legault P, Charfi C, Rassart E. Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Sep;1803(9):1062–71.
21. Do Carmo S, Séguin D, Milne R, Rassart E. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):5514–23.

ANEXO 1: BIBLIOGRAFÍA REVISIÓN SISTEMÁTICA

1. Simard J, de Launoit Y, Haagensen DE, Labrie F. Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 1992 Mar;130(3):1115–21.
2. Martínez E, Navarro A, Ordóñez C, Del Valle E, Tolivia J. Amyloid- β 25-35 induces apolipoprotein D Synthesis and growth arrest in HT22 hippocampal cells. *J Alzheimers Dis JAD*. 2012;30(2):233–44.
3. Braesch-Andersen S, Beckman L, Paulie S, Kumagai-Braesch M. ApoD mediates binding of HDL to LDL and to growing T24 carcinoma. *PloS One*. 2014;9(12):e115180.
4. Muffat J, Walker DW. Apolipoprotein D: an overview of its role in aging and age-related diseases. *Cell Cycle Georget Tex*. 2010 Jan 15;9(2):269–73.
5. Martineau C, Najyb O, Signor C, Rassart É, Moreau R. Apolipoprotein D deficiency is associated to high bone turnover, low bone mass and impaired osteoblastic function in aged female mice. *Metabolism*. 2016 Sep;65(9):1247–58.
6. Hunter SB, Varma V, Shehata B, Nolen JDL, Cohen C, Olson JJ, et al. Apolipoprotein D expression in primary brain tumors: analysis by quantitative RT-PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 2005 Aug;53(8):963–9.
7. López-Boado YS, Tolivia J, López-Otín C. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1994 Oct 28;269(43):26871–8.
8. Baker WA, Hitman GA, Hawrami K, McCarthy MI, Riihonen A, Tuomilehto-Wolf E, et al. Apolipoprotein D gene polymorphism: a new genetic marker for type 2 diabetic subjects in Nauru and south India. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1994 Dec;11(10):947–52.
9. Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, Yablonsky S, Leung W, Massaeli H, et al. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Dec;23(12):2172–7.
10. Hunter S, Weiss S, Ou C-Y, Jaye D, Young A, Wilcox J, et al. Apolipoprotein D is down-regulated during malignant transformation of neurofibromas. *Hum Pathol*. 2005 Sep;36(9):987–93.
11. Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging*. 2014 Jul;35(7):1632–42.

12. Germeyer A, Capp E, Schlicksupp F, Jauckus J, von Rango U, von Wolff M, et al. Cell-type specific expression and regulation of apolipoprotein D and E in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Oct;170(2):487–91.
13. Levros L-C, Do Carmo S, Edouard E, Legault P, Charfi C, Rassart E. Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *E Biophys Acta.* 2010 Sep;1803(9):1062–71.
14. Hunter S, Young A, Olson J, Brat DJ, Bowers G, Wilcox JN, et al. Differential expression between pilocytic and anaplastic astrocytomas: identification of apolipoprotein D as a marker for low-grade, non-infiltrating primary CNS neoplasms. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Mar;61(3):275–81.
15. Bajo-Grañeras R, Crespo-Sanjuan J, García-Centeno RM, Garrote-Adrados JA, Gutierrez G, García-Tejeiro M, et al. Expression and potential role of apolipoprotein D on the death-survival balance of human colorectal cancer cells under oxidative stress conditions. *Int J Colorectal Dis.* 2013 Jun;28(6):751–66.
16. Muffat J, Walker DW, Benzer S. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May 13;105(19):7088–93.
17. Blais Y, Sugimoto K, Carrière MC, Haagensen DE, Labrie F, Simard J. Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens, glucocorticoids and interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 1995 Sep 15;62(6):732–7.
18. Sugimoto K, Simard J, Haagensen DE, Labrie F. Inverse relationships between cell proliferation and basal or androgen-stimulated apolipoprotein D secretion in LNCaP human prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994 Nov;51(3–4):167–74.
19. 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 J.* 2013 Aug;280(16):3928–43.
20. Do Carmo S, Séguin D, Milne R, Rassart E. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5514–23.
21. Do Carmo S, Levros L-C, Rassart E. Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jun;1773(6):954–69.
22. Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Anbo N, Ohori K, Idogawa M, et al. p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene. *J Biol Chem.* 2009 Jan 9;284(2):872–83.
23. López-Boado YS, Klaus M, Dawson MI, López-Otín C. Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer

cells are mediated through a retinoic acid receptor RARalpha-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 1996 Dec 13;271(50):32105–11.

24. Simard J, Veilleux R, de Launoit Y, Haagensen DE, Labrie F. Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1991 Aug 15;51(16):4336–41.

25. Flower DR. The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett.* 1994 Oct 31;354(1):7–11.



Universidad de Valladolid



Estudio del papel y expresión de ApoD durante la proliferación celular



Autores: Eva Galindo Cantalejo, Pablo Vaquero Cepeda
Tutores: Diego Sánchez Romero, M^a Dolores Ganfornina, Raquel Pascua Maestro

Introducción

Apolipoproteína D (ApoD) es una proteína perteneciente familia de las lipocalinas. Está presente en una gran variedad de tipos celulares, principalmente en células gliales del SNC, fibroblastos perivasculares y en plasma, donde se encuentra unida a proteínas de alta densidad (HDL). ApoD es una apolipoproteína atípica, sobre la que se postula una gran multifuncionalidad. Esto se debe a su capacidad de unir numerosos ligandos, destacando entre ellos el ácido retinoico. Respecto a su expresión, se encuentra elevada en procesos neurodegenerativos incluyendo el envejecimiento, así como en situaciones de estrés oxidativo y su sobreexpresión se relaciona con un aumento de la longevidad. Así mismo, numerosos estudios demuestran que ApoD aumenta su expresión a nivel de ARNm en situaciones con baja tasa de proliferación como pueden ser tumores bien diferenciados y es la proteína mayoritaria en los quistes benignos de mama.

1

Objetivos

Estudio de ApoD durante la proliferación celular a través de una revisión sistemática y análisis inmunocitoquímico

2

Materiales y métodos

Revisión sistemática

"Apolipoprotein D" OR "ApoD"

AND

Proliferation
73

Cellular division
81

Cell division
71

Cell cycle
75

Growth arrest
20

Artículos no repetidos: 94

Artículos seleccionados para lectura completa: 25

Descartes: 69

No contienen ApoD en el Resumen: 49

No contienen ApoD en las conclusiones: 20

Estudio Inmunocitoquímico

Fibroblastos Humanos

Cultivo en medio 199 + glutamina, 15% FBS y 1% P/S

Fijación de las células en cubres de Polilisina

Control ApoD Control EdU

6 h 24 h

Aplicamos el protocolo Click-It[®] EdU. EdU está conjugado con el fluoróforo Alexa594

Alexa Fluor 594 nm

Inmunocitoquímica ApoD

ApoD

Anticuerpo anti-ApoD

3

Resultados

Expresión de ApoD y EdU

Tiempo de cultivo: 6h

Condición	Expresión de ApoD (U.A.)
EdU (+)	~450
EdU (-)	~480

El análisis a 6h no muestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0.29$) en la expresión de ApoD entre células EdU(+) y células EdU(-). Se muestra la mediana \pm ES. Número de células analizadas = 142.

Tiempo de cultivo: 24h

Condición	Expresión de ApoD (U.A.)
EdU (+)	~320**
EdU (-)	~500

El análisis a 24h muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las dos condiciones experimentales. Se muestra la mediana \pm ES; Número de células analizadas = 70.

Conclusiones

1. La revisión sistemática sugiere que ApoD sufre cambios según el estado proliferativo de la célula en numerosos tipos celulares. La mayoría de los estudios se centran en la cuantificación de ARNm de ApoD, pero no evalúan su expresión proteica y localización en la célula.
2. La mayoría de los estudios (23 de 25) sugieren que la expresión de ApoD es mayor en fases de senescencia y quiescencia que durante las fases proliferativas.
3. Nuestros resultados experimentales muestran un descenso de ApoD estadísticamente significativo en las células EdU (+) (aquellas que se han dividido durante el tratamiento) a las 24 horas. A las 6h de tratamiento con EdU, no se muestran resultados estadísticamente significativos.
4. Los resultados apoyan la literatura demostrando un descenso en la expresión de ApoD en las células en proliferación.
5. Es necesario realizar más estudios para determinar el papel de ApoD en la proliferación y diferenciación celular.

Agradecimientos

A todo el equipo del laboratorio Lazarillo por inculcarnos la importancia de la investigación y guiarnos en este proyecto. Esperamos que este trabajo sea un paso más en el largo camino de descubrir ApoD. Muchas gracias.

Soporte económico



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología