



**Instituto de Biología y Genética Molecular. Departamento de  
Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología**

**Universidad de Valladolid – CSIC**

# **“ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL NEUROPROTECTORA DE LA APOLIPOPROTEÍNA D”**

Trabajo Fin de Máster en Investigación Biomédica

**GABRIEL RODRÍGUEZ PÉREZ**

**DIRECTORES: Diego Sánchez, María Dolores  
Ganfornina**

**SEPTIEMBRE 2018**

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 3  |
| Aspectos generales de ApoD .....  | 3  |
| ApoD en el Sistema nervioso .....   | 5  |
| ApoD y estrés oxidativo .....   | 6  |
| Objetivos.....  | 7  |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 7  |
| Revisión bibliográfica.....   | 7  |
| Cultivos celulares.....   | 9  |
| Sembrado celular para inmunocitoquímica.....                                  | 11 |
| Contaje en Cámara de Neubauer .....   | 11 |
| Adición de paraquat. Estimulo de estrés oxidativo .....                       | 12 |
| Inmunocitoquímica.....  | 13 |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | 14 |
| Resultados de la búsqueda bibliográfica .....                                 | 14 |
| Mecanismos y proteínas relacionadas con el papel neuroprotector de ApoD... .. | 14 |
| Vías de señalización de ApoD .....  | 15 |
| Análisis bibliográfico de las lipocalinas .....                               | 15 |
| Análisis en bases de datos proteicas .....                                    | 16 |
| Análisis bibliográfico de FABP7 .....   | 16 |
| Resultados de la expresión proteica. Inmunocitoquímica.....                   | 19 |
| <b>DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b> .....   | 22 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 24 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 25 |

# INTRODUCCIÓN

---

## ASPECTOS GENERALES DE APOD

La Apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína de unión a lípidos inicialmente conocida como proteína de transporte sanguíneo. Fue detectada en plasma unida preferentemente a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y en una baja proporción a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (McConathy y Alaupovic 1973). Se expresa tanto en el desarrollo normal como durante el envejecimiento.

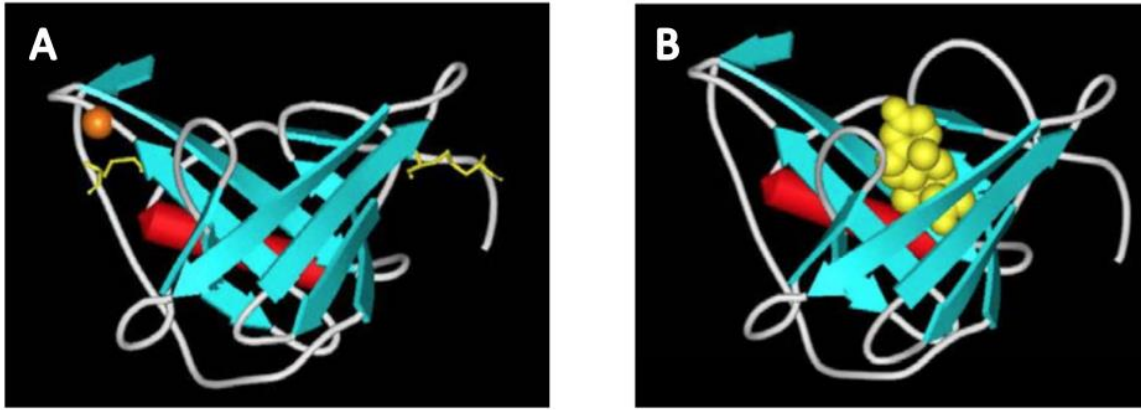
A pesar de su localización en HDL es una Apolipoproteína atípica ya que tras conocerse su estructura primaria (Drayna et al. 1986), así como su distribución en los tejidos pasó a formar parte de las lipocalinas.

Las lipocalinas son una familia de proteínas cuyo papel es la unión de pequeñas moléculas como lípidos, esteroides u hormonas químicas, así como metabolitos secundarios tales como vitaminas, cofactores u odorantes para diversos procesos fisiológicos. A nivel estructural, adoptan una estructura terciaria en forma de barril  $\beta$  formado por 8 láminas- $\beta$  antiparalelas estabilizadas por una hélice- $\alpha$  en la parte C-terminal. El barril  $\beta$  forma una cavidad o bolsillo típicamente delimitado por aminoácidos apolares, lo que permite la unión de pequeños ligandos hidrófobos (Eichinger et al. 2007).

La clasificación de las lipocalinas se basa en la presencia de elementos conservados de la estructura terciaria y las regiones de secuencia conservada (SCR) en las secuencias primarias de lipocalina. Estos elementos caracterizan a la familia de las lipocalinas para su clasificación en dos subfamilias que se distinguen en función del número de SCR. Así las clasificamos en lipocalinas típicas o tipo "Kernel" en las que se incluyen proteínas con 3 SRC como su principal representante, proteína de unión a retinol (RBP) y las lipocalinas atípicas con uno o dos SRC.

Así, se vio que ApoD tenía hasta un 25% de identidad con proteínas que unen retinol (RBP) y un 30-40% con proteínas de insecto que unen bilina (BBP) (Rassart et al. 2000).

La estructura primaria de ApoD consta de 189 aminoácidos que la dotan de un peso molecular (PM) de 18,1 KDa. La glicosilación varía en función de que tejido sintetice la ApoD con lo que variará su PM. En su secuencia consta de un péptido señal que será cortado dejando una proteína final de 169 aminoácidos. En su estructura química, la ApoD consta de 5 cisteínas formando 2 puentes disulfuro y dejando una cisteína desapareada (**Figura 1**). Esta cisteína podría conferirle propiedades reductasa/deshidrogenasa para la eliminación de radicales libres (Rassart et al. 2000). Esta quinta cisteína desapareada es una peculiaridad de ApoD humana que no se encuentra en el resto de los organismos conocidos, incluyendo el ratón.



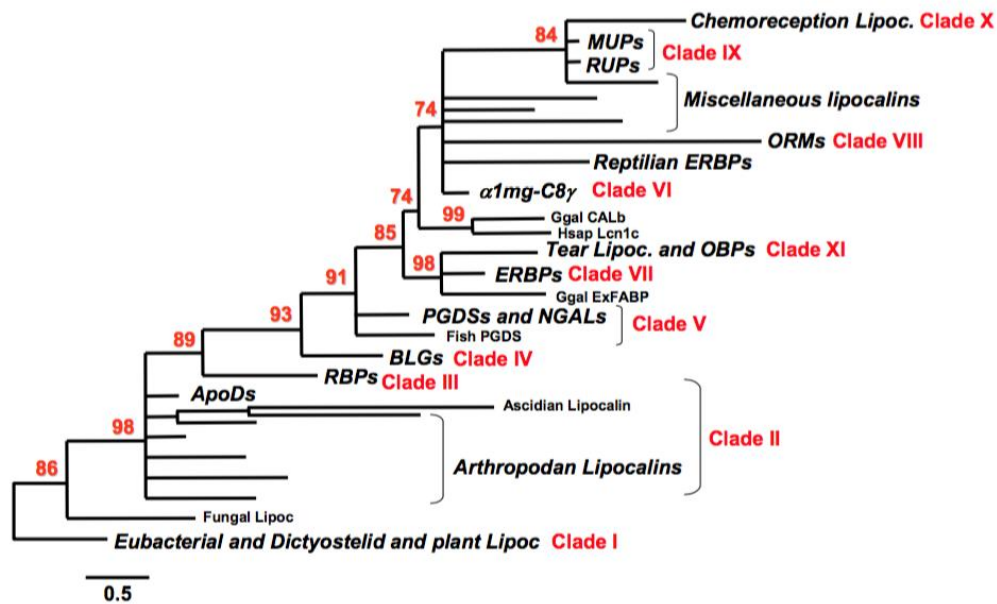
**Fig 1. A:** Modelo tridimensional de ApoD mostrando en amarillo los puentes disulfuro y la cisteína desapareada en naranja. **B:** Estructura de ApoD con el ligando progesterona en el bolsillo hidrofóbico.

ApoD es pleiotrópica, ya que se ha detectado su expresión en multitud de tejidos, sin embargo, se expresa mayoritariamente en páncreas, riñones, intestino, bazo y sobre todo en el sistema nervioso.

La amplia distribución de ApoD en mamíferos nos hace intuir su importancia, proponiéndose desde hace tiempo como una proteína multifuncional. Es posible que los ligandos asociados con esta proteína varíen dependiendo de las condiciones del tejido o del órgano en que se encuentre, pudiendo ser una proteína de fase aguda en la regeneración nerviosa, servir para evacuar moléculas tóxicas generadas en el bazo en la destrucción de los eritrocitos, o ayudar al transporte de esteroides en órganos como las glándulas adrenales o los testículos (Rassart et al. 2000).

En rata y ratón ApoD se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso en la médula espinal, cerebro y cerebelo como en el sistema nervioso periférico. A pesar de estas diferencias, la similitud de sus regiones codificantes indica una misma función transportadora de ligandos (Cofer y Ross 1996) (Séguin, Desforges y Rassart 1995).

Con respecto a su análisis filogenético, ApoD se sitúa en la base del árbol de la familia de las Lipocalinas (**Figura 2**) que tienen una estructura muy conservada más cercana a las lipocalinas de otros reinos (plantas, hongos, protoctistas y procariotas) y perteneciente al mismo clado que las lipocalinas de invertebrados (Flower 1996).



**Fig.2.** Árbol filogenético de la familia de las Lipocalinas elaborado por el método de máxima verosimilitud.

## APOD EN EL SISTEMA NERVIOSO

En el sistema nervioso central ApoD está expresada por astrocitos, oligodendrocitos, células precursoras de oligodendrocitos, algunas neuronas y células piales y perivasculares (Ganfornina et al. 2005) (Navarro, Del Valle y Tolviva 2004) (Navarro et al. 1998) (Sánchez, Ganfornina y Martínez 2002) mientras que en el sistema nervioso periférico se sintetizan en células de Schwann (Rassart et al. 2000). Así, la proteína es sintetizada por determinados tipos celulares y posiblemente captada por otros.

La expresión de ApoD se ha correlacionado, en algunas regiones del cerebro, con el envejecimiento normal y las enfermedades neurodegenerativas. Así, los resultados de (Navarro et al. 2010), indican que la ApoD podría jugar un papel fundamental en el envejecimiento del sistema nervioso central y en la reducción de productos derivados de la peroxidación lipídica. El incremento en la expresión de ApoD con el envejecimiento se puede incluir en un mecanismo global de protección celular para prevenir los efectos nocivos causados por el envejecimiento y no se limita sólo a humanos, habiéndose comprobado igualmente tanto en monos como en ratones (Loerch et al. 2008).

Resultados similares los de (Ganfornina et al. 2010) que concluye que la función de ApoD en el sistema nervioso parece estar muy relacionada con procesos de reparación y remielinización tras situaciones traumáticas.

A nivel fisiopatológico existe evidencia en numerosos casos. En la enfermedad de Parkinson, caracterizada por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, especialmente vulnerables al estrés oxidativo, hay un incremento

en la expresión de ApoD en las células gliales (Ordoñez et al. 2006). Igualmente, en otras enfermedades neurodegenerativas se encuentran elevados niveles de expresión de ApoD respecto a pacientes sanos, como es el caso de esquizofrenia, trastorno bipolar (Thomas et al. 2001) Niemann-Pick tipo C (Suresh et al. 1998) o esclerosis múltiple (Reindl et al. 2001).

Se ha evidenciado que en NLaz, uno de los homólogos de ApoD en *Drosophila*, está controlada por la vía de la JNK. (Hull-Thompson et al. 2009) En respuesta a estímulos de privación nutricional y estrés oxidativo. Las vías MAPK, y concretamente la vía de JNK se ponen en marcha en respuesta a muchos de los estímulos que inducen la expresión de ApoD. Se ha visto que fuera del sistema nervioso, la vía ERK está implicada en la señalización de ApoD donde inhibe las señales proliferativas del músculo liso vascular (Reindl et al. 2001) .

## **APOD Y ESTRÉS OXIDATIVO**

Desde hace años hay evidencias muy sólidas de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están estrechamente asociadas con muchas condiciones y procesos patológicos, especialmente con aquellas enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Los sistemas biológicos producen especies oxidantes de forma normal y cuando se encuentran en diversas condiciones patológicas.

Los radicales libres formados tienen un gran poder oxidante que puede alterar con un efecto dominó tanto proteínas como ácidos nucleicos y lípidos. La oxidación de las proteínas ocurre preferentemente en determinados residuos como las cisteínas mientras que la oxidación de los lípidos ocurre por peroxidación, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados que son abundantes en membranas celulares. Estas peroxidaciones se propagan, afectando a otros ácidos grasos adyacentes y produciendo roturas en las membranas que dejan de ser funcionales.

El mecanismo molecular por el cual ApoD se encarga de proteger a las células fue estudiado en astrocitos donde se demostró un papel fundamental de ApoD en el pH lisosomal sobre el estrés oxidativo inducido por Paraquat (Pascua-Maestro et al. 2017).

ApoD se endocita y se dirige a un subconjunto de lisosomas vulnerables a estrés ya que es funcionalmente estable en un entorno ácido y su presencia es suficiente para que los lisosomas se recuperen de la alcalinización producida por oxidación, tanto en astrocitos como en neuronas (Pascua-Maestro et al. 2017).

Sin embargo, existe controversia acerca de un mecanismo subcelular para la proteína ApoD que explique cómo se logra esta protección ya que desconocemos si interacciona y en qué medida si existiese esta interacción una vez es endocitada ApoD.

## OBJETIVOS

Como se ha expuesto en la introducción de este trabajo, ApoD se sintetiza fundamentalmente en el sistema nervioso en astrocitos para lo cual vamos a utilizar una línea astrocitaria de ratón.

Partimos de la evidencia de que ApoD es una glicoproteína que lleva a cabo funciones de regulación de la respuesta glial frente al estrés oxidativo mediando neuroprotección en astrocitos y neuronas impidiendo la oxidación de las membranas celulares por peroxidación lipídica inducida por ROS.

Mi objetivo general consiste en la realización de un estudio para conocer el/los posibles receptores intracelulares con función transductora de diversa naturaleza que colaboran en la cascada de acción neuroprotectora de ApoD en astrocitos. Este objetivo lo estudiaré inicialmente en una revisión bibliográfica de la literatura actual para conocer de manera detallada cual es la evidencia científica sobre la naturaleza de los receptores, si existe.

Con la información que se obtenga de la búsqueda bibliográfica, me planteo objetivos específicos que serán:

- Marcaje de la proteína seleccionada en base a la literatura en una inmunocitoquímica doble.
- Estudio de la colocalización ApoD-Proteína.
- Estudio de la localización subcelular de la interacción anterior.
- Posible papel molecular de la proteína transductora con ApoD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para la realización de la búsqueda bibliográfica, nos proponemos desde un inicio estudiar la literatura científica acerca de la mencionada ApoD en relación a sus posibles interacciones intracelulares con moléculas transductoras que hagan posible las funciones neuroprotectoras de ApoD.

El primer paso fue la realización de una búsqueda bibliográfica general utilizando palabras clave en relación al proceso que queremos estudiar. Así realizamos una búsqueda en la base de datos online PUBMED, utilizando por un lado el término ApoD como palabra clave y manejando operadores booleanos (OR, AND). Utilizamos también términos específicos del proceso a estudiar como son; *“interact”*, *“Membrane”*, *“Subcellular”*, *“Transduct”*, *“Signal”*, *“Recept”*, *“Distribution”*, *“Lipocalin”*, *“Neuroprotection”*. Tras esta búsqueda recopilamos un número total de artículos de 225. Para la clasificación y análisis de los artículos se ha utilizado Excel® 2010. En la **Tabla 1** se detallan las búsquedas realizadas.

|             | TÉRMINOS        | ARTÍCULOS |
|-------------|-----------------|-----------|
| ApoD<br>AND | INTERACT        | 44        |
|             | SIGNAL          | 44        |
|             | MEMBRANE        | 22        |
|             | SUBCELLULAR     | 17        |
|             | TRANSDUCTION    | 14        |
|             | RECEPT          | 35        |
|             | DISTRIBUTION    | 9         |
|             | LIPOCALIN       | 29        |
|             | NEUROPROTECTION | 11        |

**Tabla 1.** Clasificación de las distintas palabras clave y del registro de resultados obtenido.

Decido revisar este número total de artículos debido a la probable repetición de estos en las distintas búsquedas tras la cual, desciende el número de artículos a 173.

Para la selección de los artículos más específicos, aplico una serie de criterios de selección encaminados a obtener aquellos trabajos más enfocados y a la realización de una lectura de análisis específica.

Los principales criterios de selección fueron por orden de importancia:

- ApoD como molécula principal del estudio, que los estudios se realicen en torno a esta molécula y sus conclusiones estén enfocados en base a sus funciones.
- Que los artículos estén localizados en el sistema nervioso central, dato importante ya que nuestro estudio está relacionado con la neuroprotección.
- Restringir las búsquedas de artículos a 20 años para obtener información más actual sobre ApoD.
- Descartar aquellos artículos en los que en su parte experimental utilizan fármacos (Clozapina).

Tras la selección de artículos en base a los criterios de exclusión detallados anteriormente, obtengo finalmente una selección final de 24 artículos.

Se realiza una lectura crítica de estos 24 artículos obteniéndose información generalista sobre ApoD.

En base a la relación estrecha de mi objetivo con las distintas interacciones proteicas decido hacer una búsqueda en otra base de datos denominada STRING que se centra en las relaciones funcionales entre proteínas. Se realizaron dos búsquedas, por un lado, se buscaron todas las posibles interacciones de ApoD con proteínas en la especie *Homo sapiens*. Asimismo, se realizó una segunda búsqueda dentro de la especie *Mus musculus*. STRING realiza esta búsqueda en función de similitudes no solo estructurales sino también en función de su co-expresión, así como parámetros de similitud génica. Descarto esta búsqueda por no encontrar datos relevantes para el análisis bibliográfico.



En base a los resultados del primer análisis bibliográfico, planteo una segunda búsqueda basada en la recopilación de toda información acerca de las Lipocalinas, familia a la que pertenece ApoD, que me permita acercarme a los mecanismos de transducción de otras lipocalinas y así plantearme una hipótesis basada en este análisis.

Para esta segunda búsqueda bibliográfica nuevamente en PUBMED utilizo la palabra clave "*Lipocalin*" y los operadores booleanos (AND, OR) junto con palabras clave como "*subcellular*", "*structure*", "*family*", "*role*". Obteniendo un registro total de artículos de 233.

Como en la primera búsqueda utilizo unos criterios de exclusión que me acoten el número total de artículos. Son los siguientes:

- Restrinjo la búsqueda a aquellos artículos donde se analicen lipocalinas o sus subtipos.
- Excluyo todos los artículos relacionados con lipocalinas centrados en determinadas patologías.

Obtengo un registro final de 8 artículos. Durante esta búsqueda analizo y estudio las distintas lipocalinas que forman la familia y decido centrarme en una lipocalina, la proteína transportadora de retinol (RBP). De esta, se conoce más información acerca de sus interacciones intracelulares.

Busco información sobre RBP como palabra clave tanto estructural como funcional y mediante palabras específicas como "*gene function*", "*intracelular*", "*functions*" obtengo un registro de la búsqueda muy extenso con lo que decido modificar la palabra clave RBP y buscar mediante la forma soluble de la proteína transportadora de retinol (sRBP). De esta forma obtengo una búsqueda mucho más detallada del mecanismo intracelular de los distintos RBP quedándome con un registro de 5 artículos.

Una vez finalizada esta búsqueda, obtengo información relevante acerca de las proteínas intracelulares transductoras de RBP como son *CRBP/CRABP*. Esto me permite buscar estos ligandos como palabra clave en bases de datos de interacción de proteínas STRING/PROSITE, para encontrar potenciales ligandos de ApoD.

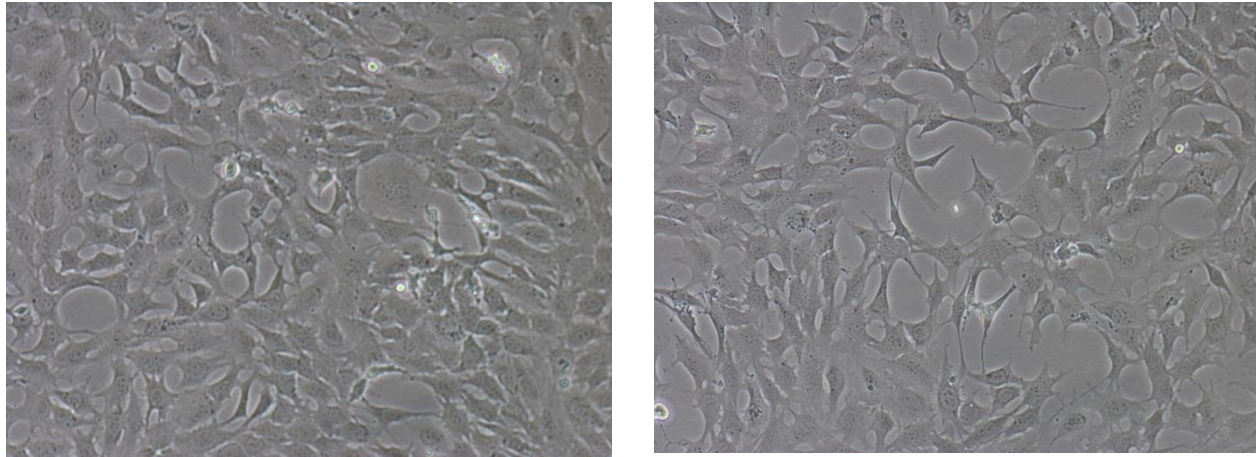
En base a esta búsqueda, decido hacer una última revisión bibliográfica para los resultados anteriores. De manera que utilizo como palabra clave una de las proteínas encontradas en las bases de datos. Como términos específicos utilizo "*neuroprotection*", "*astrocytes*", "*functions*", "*role*". Después de realizar esta búsqueda, obtengo un resultado de 9 artículos por lo que no he tenido necesidad de acotar el número de resultados obtenidos.

Los artículos analizados durante las distintas búsquedas bibliográficas han sido recopilados, analizados y estudiados en ZOTERO®, un gestor bibliográfico que me ha permitido seguir los pasos detallados anteriormente.

## **CULTIVOS CELULARES**

El modelo celular que ha sido utilizado durante esta investigación ha sido la línea celular de ratón IMA 2.1. Esta es una línea inmortalizada de células de astrocitos de

ratón como alternativa a los cultivos de astrocitos primarios. El análisis de marcadores astrocíticos indicó que IMA 2.1 representa una etapa de desarrollo de astrocitos relativamente temprana, GFAP-negativa. Además, la conversión de una toxina parkinsoniana MPTP por monoaminoxidasa B se desarrolló en IMA al menos tan rápido como en las células primarias (Schildknecht et al. 2012) En la **figura 3** se puede apreciar la morfología característica de esta línea celular.



**Fig. 3:** Imágenes de la línea celular IMA 2.1 de ratón utilizada en este cultivo. La morfología de las células astrocíticas murinas se aprecia más aplanada con respecto a líneas celulares astrocíticas de humano.

Para el mantenimiento de las células IMA 2.1 se ha usado el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con un 5% de suero bovino fetal (FBS), suplementado con glucosa (4,5 g/l) y piruvato (0,05 g/l) y con una mezcla de antibióticos: 1% P/S/A (Penicilina 10U/μl, Estreptomina 10 μg/μl y Anfotericina B 25 μg/ml).

Para la realización de los distintos lavados se utilizó tampón PBS pH 7,4 (*Phosphate buffered saline*) cuya composición se detalla a continuación en la **tabla 2**.

|                                      | Concentración (mmol/L) | Concentración (g/L) |
|--------------------------------------|------------------------|---------------------|
| <b>NaCl</b>                          | 137                    | 8,0                 |
| <b>KCl</b>                           | 2,7                    | 0,2                 |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | 10                     | 1,42                |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>  | 1,8                    | 0,2                 |

**Tabla 2.** Composición y concentración del PBS utilizado para en la Inmunocitoquímica

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar Telstar Biostar (con filtro HEPA capaz de retener con una eficacia del 99,9 % partículas superiores a 0,2  $\mu\text{m}$ ), usando material y soluciones estériles. Para la realización del cultivo celular, el primer paso es la limpieza de la misma con un detergente, el Cloruro de Benzalconio, seguidamente se limpia con Alcohol 70° como antiséptico.

Las células se cultivaron en su correspondiente medio a 37°C en un incubador Hera Cell 150 con una atmósfera de aire: CO<sub>2</sub> (95%: 5%).

## **SEMBRADO CELULAR PARA INMUNOCITOQUÍMICA**

Lo primero que realizamos es la preparación de los cristales de poli-L-lisina. Este es un compuesto que mejora la adhesión celular y la absorción de proteínas mediante modificaciones de las cargas de superficies en el sustrato de cultivo.

El procedimiento para la elaboración de cristales de poli-L-lisina se realiza en campana de flujo laminar y consiste en la deposición de una gota de Poli-L-lisina® (SIGMA) sobre un cubreobjetos depositado previamente en un pocillo. Lo más importante en este proceso es la deposición de la gota de forma uniforme. Después de esperar 5 minutos, retiramos la gota con una pipeta para pasarla a un tubo Falcon® de segundo uso. Se realiza un lavado con 400  $\mu\text{l}$  de agua destilada para retirarla después de 5 minutos y dejar secar los cubreobjetos.

Partimos de un cultivo celular IMA 2.1 donde trabajando en campana de flujo laminar lo primero que realizamos es un conteo celular y a continuación un sembrado celular de las mismas. El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera: Las células se dejaron crecer hasta un 80-90% de confluencia y seguidamente se procede a la separación de las células adherentes de las placas de cultivo para su subcultivo. Para esto, se añadió una solución de tripsina-EDTA (002% de EDTA y 005% de tripsina en PBS) en un volumen suficiente como para cubrir la superficie de la placa, que provoca que las células se despeguen de la superficie. Se dejaron en el incubador, a 37° durante 5 minutos para seguidamente visualizarlo al microscopio.

Tras la incubación, se añadió medio de cultivo para inhibir la acción de la tripsina en un volumen dos veces mayor que el volumen de tripsina. La suspensión de células obtenida se centrifugó durante 4 minutos a 1000 rpm (200 g). El pellet se resuspendió en 1ml de medio de cultivo y posteriormente se procedió al conteo celular empleando una cámara de Neubauer.

### *Contaje en Cámara de Neubauer*

La cámara de Neubauer es un instrumento en el que se colocan 10  $\mu\text{l}$  de suspensión celular para medir el número de células presentes en ese volumen y a partir de ahí determinar la densidad celular de la suspensión de origen. Esta cámara está adaptada al microscopio de campo claro o contraste de fases. Es un portaobjetos que tiene una depresión en el centro de 0,1 mm con una cuadrícula marcada. La cuadrícula se trata de un cuadro de 3x3 mm. El área marcada con una L se divide en 16 pequeños cuadrados de 0,25 mm de lado cada uno y corresponde a 1 mm cuadrado, que es lo que vamos a contar.

Además, sobre la cámara colocamos un cubreobjetos que va a estar separado de la superficie de la cámara 0,1 mm. Por tanto, el volumen entre la superficie "L" y el cubre será de 0,1 mm<sup>3</sup>, o lo que es lo mismo 0,1 µl.

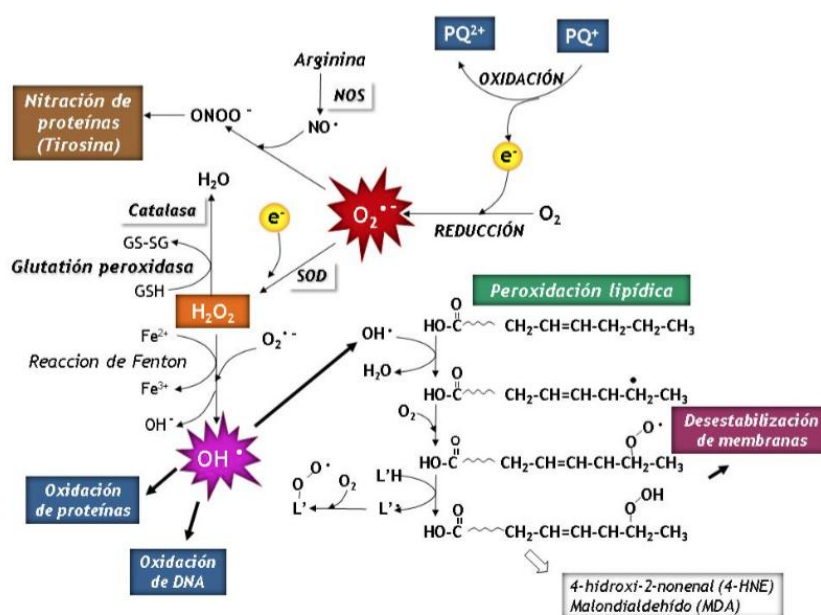
Una vez cuantificadas las células se calcula el volumen de la suspensión que hay que coger para asegurar un número fijo de células en cada pocillo. En nuestro caso para asegurar 50000 cel/pocillo hemos necesitado un volumen de 106 µl. El sembrado se realizó en placas de cultivo de plástico estéril de 9,6 cm<sup>2</sup> (Nunc, ThermoFisher Scientific). El sembrado se realiza en 4 placas donde una de ellas la destinamos a ser el control. Seguidamente incubamos a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y 90-95% de humedad. El medio fue cambiado a las 24 horas.

## ADICION DE PARAQUAT. ESTIMULO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Se realiza a las 24 horas donde para alcanzar una concentración de 300µM se adicionan 0.6µl de una solución de paraquat concentración 15 mM en cada pocillo.

El daño producido por paraquat se debe principalmente al estrés oxidativo que provoca la de la membrana y a la disminución de NADP.

El paraquat tiene carga, lo que le proporciona la capacidad de producir radicales libres que reaccionan con oxígeno, formando radicales iónicos como el superóxido y peróxido de hidrógeno, que al producirse en una cantidad elevada, la superóxido dismutasa de las células no pueden neutralizar. En la **Figura 4** se detalla el mecanismo molecular.



**Fig.4** El paraquat se oxida reduciendo el O<sub>2</sub> a anión superóxido. La superoxidodismutasa (SOD) transforma el superóxido en el anión hidroxilo capaz de oxidar proteínas, lípidos y ADN.

## INMUNOCITOQUÍMICA

La inmunocitoquímica es la técnica que permite la localización microscópica de las proteínas presentes en las células tomando como base la reacción antígeno-anticuerpo. Para su realización se llevan a cabo los siguientes pasos:

Después de recoger las células de la incubadora, se hacen dos lavados con PBS para eliminar el medio de cultivo con cuidado de no desprender las células. Seguidamente fijamos las células con formaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido el tiempo de fijación se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos con PBS para eliminar cualquier resto del fijador.

Una vez fijadas las células, es necesario permeabilizar y bloquearlas ya que nuestro objetivo es detectar proteínas intracelulares, para lo cual utilizamos una preparación Tween-20 0,1%/PBS y FBS 1%.

En estos experimentos de inmunocitoquímica en los que el anticuerpo secundario va unido a un fluorocromo se hizo una doble inmunocitoquímica secuencial: tras la primera inmunocitoquímica, donde se pretende observar ApoD, antes de montar, se realizó en los mismos cristales otra inmunocitoquímica dirigida a otro antígeno FABP7.

Los Anticuerpos se añadieron de la siguiente manera:

En primer lugar, se realizan tres lavados con PBS. El primer Anticuerpo es específico anti-proteína ApoD de manera que podamos ver el patrón de marcaje de la proteína. Una vez añadido dejamos incubar la noche en cámara fría. A la mañana siguiente, después de lavar 3 veces con PBS añadimos un Ac secundario de burro (anti-cabra) unido a un fluorocromo Alexa-488 y dejamos incubar en agitación durante 2 horas.

Para la segunda Inmunocitoquímica, se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS y se añadió el anticuerpo primario anti-proteína FBP7 de conejo. Se incubó durante toda la noche en cámara fría. Posteriormente se lavaron las muestras durante 5 minutos con PBS 3 veces y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra (anti conejo). El segundo anticuerpo está conjugado con el fluorocromo Cy3.5 Sellamos con parafina los pocillos y se dejan incubar 2 horas en agitación a temperatura ambiente. En la **tabla 3** se detallan los anticuerpos que se utilizaron.

| Anticuerpo Primario          | Anticuerpo Secundario                  |
|------------------------------|--|
| Goat $\alpha$ -ApoD 1:       | Donkey $\alpha$ -Goat Alexa 488 1:1000 |
| Rabbit $\alpha$ -FABP7 1:250 | Goat $\alpha$ -Rabbit Cy3.5 1:5000     |

**Tabla 3.** Anticuerpos Primarios y secundarios utilizados en la Inmunocitoquímica

Posteriormente, se realizó el montaje de las preparaciones mediante la retirada de PBS y adición de 800 $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O para evitar la formación de cristales salinos. Se montó directamente con EverBrite (Biotium)-DAPI que incorpora un estabilizador de fluorescencia y se selló con CoverGrip (Biotium).

La observación de las células se realizó en un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una Cámara Digital DMX 1200c, o con un confocal DMI 6000B-TCS SP5 (Leica).

## RESULTADOS

---

### RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Dado el papel que tiene ApoD en astrocitos en procesos relacionados con el estrés oxidativo, decido hacer una revisión sistemática, con el objetivo de esclarecer como interviene ApoD a nivel subcelular. Estudiar con qué moléculas actúa como transductores de señalización para generar la diversidad de funciones conocidas.

#### *Mecanismos y proteínas relacionadas con el papel neuroprotector de ApoD*

Tras la lectura y análisis de los 24 artículos, todos coinciden en el papel central neuroprotector de ApoD donde su expresión aumenta en neuropatologías y determinadas situaciones inflamatorias.

Varios de estos artículos se centran en la relación entre el estrés oxidativo y los niveles elevados de ApoD en distintas regiones cerebrales (Li et al. 2016) sin embargo, son pocos los que detallan los mecanismos intracelulares. Así, decido centrarme en conocer cuál o cuáles son los mecanismos de ApoD en SNC para llevar a cabo esta función.

De los 24 artículos que relacionan ApoD y neuroprotección, me centro en 6 donde se sugieren posibles mecanismos.

El mecanismo más ampliamente estudiado es el que lo relaciona con el Ácido Araquidónico (AA), uno de sus principales ligandos. (Thomas et al., 2003) sugirió el papel de ApoD en la regulación de la señalización y el metabolismo del AA, estabilizando la membrana, evitando su liberación por PLA2 (Fosfolipasa A2) o bien que ApoD quele al AA en el citosol y por tanto se impida la cascada inflamatoria.

(Do Carmo et al. 2008) estudia el papel de ApoD frente a la encefalitis inducida por OC4 de Coronavirus humano en ratones y observa no solo que ApoD se correlaciona positivamente con la carga del virus y la activación astrocítica y microglial, sino que también propone un posible mecanismo basado en el papel neuromodulador de ApoD sobre PLA2 y de esta manera controlar las concentraciones de Ácido Araquidónico (AA) libres.

(Pascua-Maestro et al. 2017) analiza el tráfico intracelular de ApoD, detallando la localización subcelular de ApoD dependiendo de si existen situaciones de estrés inducido por paraquat, así como el mecanismo por el que entra, mediante la formación de endosomas vía clatrina o caveolina. A nivel molecular, detalla que intervienen en lisosomas sensibles a condiciones de estrés y que contribuye a la

recuperación del H lisosomal mediante la alcalinización producida por agentes oxidantes.

Con respecto a la relación entre ApoD y determinadas patologías neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer (EA), la esquizofrenia o el trastorno bipolar, en el análisis bibliográfico se resuelve que existe consenso sobre la función antioxidante y por ende neuroprotectora aunque existe cierta controversia sobre el papel molecular de ApoD.

Hay grupos que sugieren que ApoD actúa como un antioxidante lipídico en el cerebro que contrarreste la peroxidación lipídica de las etapas tardías de la EA mediante la formación de dímeros de ApoD, así como otros grupos en los que sencillamente se afirma que el mecanismo molecular es desconocido.

### Vías de señalización de ApoD

Con respecto a las vías de señalización de ApoD, hemos analizado artículos en los que se estudia un mecanismo regulador. (Hull-Thompson et al. 2009) describe que la vía de señalización Jun-N-Terminal Quinasa (JNK) es necesaria para la homeostasis metabólica en moscas y que esta función se ha estudiado en el miembro de la familia Drosophila Lipocalin Neural Lazarillo (NLaz), un homólogo de Apolipoprotein D (ApoD) y Retinol Binding Protein 4 (RBP4) de vertebrados. La pérdida de función de NLaz, reduce la resistencia al estrés mientras que su sobreexpresión promueve la tolerancia al estrés.

Así coincide (Bajo-Grañeras R et al. 2011) en que la expresión de ApoD en astrocitos está controlada por la JNK sensible a estrés oxidativo. Estudian en 2 líneas celulares neuronales como se activa la vía JNK mediante paraquat (PQ) y mediante la apoptosis de la célula dopaminérgica inducida por PQ.

(Ruiz et al. 2013) en el estudio de la unión de ApoD a diferentes ligandos también afirma que la regulación de la expresión de ApoD y NLaz están controladas por la de señalización JNK bajo condiciones de estrés.

Únicamente se encontró un estudio preliminar donde se sugiere que ApoD es capaz de activar de forma temprana la de las quinasas activadas por mitógenos ERK cuya función final es la regulación de la transcripción modulando la expresión de distintos genes.

De los 31 artículos analizados, los estudios llevados a cabo sobre los mecanismos intracelulares no son concluyentes en cuanto a las uniones proteicas intracelulares y los mecanismos de transducción, por tanto, se hace necesaria una nueva búsqueda basada en la familia de lipocalinas a la que pertenece ApoD.

### Análisis bibliográfico de las lipocalinas

Decido hacer una revisión sistemática de las lipocalinas, la familia proteica a la que pertenece ApoD, donde encuentro que la proteína fijadora de retinol (RBP), es el

representante principal de las lipocalinas y que tiene una estructura terciaria semejante a ApoD.

Decido hacer una búsqueda más detallada de RBP, una lipocalina extracelular, encontrando que en suero es una proteína de transporte de retinol (RBP4) que forma un complejo con la transtiretina (TTR) para impedir su filtración por el . Además existe un receptor específico de membrana plasmática denominado Stra6 y este es esencial para la transferencia de retinol de RBP extracelular a la proteína de unión de retinol intracelular (CRBP).

CRBP es un miembro de las proteínas fijadoras de ácidos grasos (FABP) que esta estructuralmente relacionada con las lipocalinas (Smathers y Petersen 2011).

La principal proteína de unión al retinol intracelular, CRBP1, probablemente mejore el uso eficiente de retinoides al facilitar la captación de retinol desde sRBP. Las proteínas de unión al ácido retinoico intracelular (CRABP1 y 2 y FABP5) parecen tener funciones más diversas y distintivas para cada una, como dirigir el ácido retinoico al catabolismo, administrar ácido retinoico a receptores nucleares específicos y generar acciones no canónicas (Napoli 2016).

### Análisis en bases de datos proteicas

Conociendo por tanto que la lipocalina extracelular RBP tiene proteínas transductoras intracelulares CRBP/CRABP, busco en la base de datos de dominios proteicos, familias y sitios funcionales PROSITE la proteína CRABP y obtengo un resultado coincidente con mi análisis de literatura ya que existe una relación de semejanza funcional entre CRABP y FABP. CRABP es una proteína de bajo peso molecular que se une a ácidos grasos (fundamentalmente Acido Retinoico) y otros aniones orgánicos presentes en el citosol relacionada estructuralmente con la estructura de las lipocalinas y que pertenece a la familia de unión a ácidos grasos.

Esta misma base de datos me indica que dentro de la familia de unión a ácidos grasos FABP existen distintos tipos en función de los tejidos. Así, llego a la proteína de unión de ácidos grasos 7 (FABP7), que esta preferentemente en el cerebro.

Los motivos que me llevan a pensar en FABP7 como una posible proteína transductora de ApoD son los siguientes:

- La estructura es un barril  $\beta$  antiparalelo de 10 láminas con un bolsillo de unión para ligandos, estructura que corresponde a la de las lipocalinas y que comparte la familia de FABP.
- Es una lipocalina de unión a ácidos grasos con funcionalidad en membranas celulares que predomina en el SNC, lo que me lleva a pensar que podría estar relacionada en la transducción de la señal de ApoD.

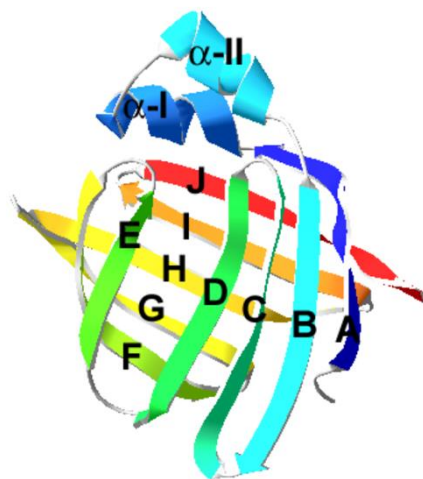
### Análisis bibliográfico de FABP7

Decido por tanto una nueva búsqueda bibliográfica en la que estudio la proteína FABP7 como posible transductor de la señal de ApoD.



(Veerkamp y Zimmerman 2001) estudia las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) también denominada (BLBP). Las define como proteínas citosólicas de 14-15 kDa, implicadas en la captación, el transporte y el direccionamiento de ácidos grasos (FA). Pueden modular la concentración de ácidos grasos y de esta manera podrían influir en la función de enzimas, membranas, canales iónicos y receptores, e incluso en la expresión génica.

La estructura general de las FABP (**Figura 5**) es una estructura general tridimensional muy bien conservada que resulta prácticamente superponible. Así, consiste en 10 cadenas  $\beta$  antiparalelas (nombradas desde  $\beta A$  hasta  $\beta J$  desde el extremo N-terminal hacia C-terminal) y dos  $\alpha$ -hélices cortas (denominadas  $\alpha$ -I y  $\alpha$ -II). Las 10 cadenas se agrupan en dos hojas  $\beta$  de 5 cadenas cada una las cuales se enfrentan con una orientación casi perpendicular determinando una cavidad central. La unión entre las cadenas  $\beta A$  y  $\beta B$  es el motivo hélice-giro-hélice; el resto de las cadenas presentan giros entre sí. Todos estos elementos de estructura secundaria se pliegan en una estructura de un solo dominio con un radio de giro de 14 Å (Banaszak et al. 1994).



**Fig. 5** Estructura común de las FABP. 10 cadenas  $\beta$  antiparalelas y dos  $\alpha$ -hélices cortas

El tejido nervioso contiene 4 tipos de FABP con una distribución espacio-temporal distinta. M-FABP en mielina y solo presente en nervios periféricos, B-FABP en cerebro, E-FABP en células gliales y neuronas y H-FABP en cerebro adulto.

Con respecto a las posibles funciones neuronales de los artículos analizados (KIPP et al. 2011) estudia el papel de FABP7 en la modulación de la función de astrocitos, así como su expresión, morfología y distribución. También estudia que la localización preferente de FABP7 está en los bordes anteriores de los astrocitos, pudiendo dar lugar a un aumento del contenido de ácidos grasos polinsaturados en estas membranas que provoca el aumento de su fluidez, elasticidad y permeabilidad y potencialmente podría afectar a la transducción de señales y la expresión génica

La función de los astrocitos que expresan FABP7 dependería de la presencia o ausencia de sus ligandos tales como ácidos grasos. El ácido graso poliinsaturado, ácido  $\omega$ -3 docosahexaenoico (DHA) es el ligando preferido de FABP7. También se une al ácido  $\omega$ -6 araquidónico (AA), aunque con una afinidad 4 veces menor.

Otra hipótesis funcionales proponen (Kagawa et al. 2015) que FABP7 controla la función de la balsa lipídica a través de la regulación de la expresión de caveolina-1 y participa en la respuesta de los astrocitos a estímulos externos. Estos estudios se llevaron a cabo mediante la estimulación con Lipopolisacarido (LPS). Realizaron un FABP7-Knockout (KO) en astrocitos donde vieron que se redujeron las concentraciones de los receptores Toll Like Receptor (TLR4) y el receptor alfa-1 del factor neurotrófico, receptores situados en la balsa lipídica, así como la caveolina-1 que se encontró disminuida a nivel proteico y transcripcional. También se redujeron las concentraciones de las proteínas quinasas activadas por mitógenos y del factor nuclear  $\kappa$ B. La reexpresión de FABP7 en astrocitos FABP7-KO rescató los niveles disminuidos de caveolina-1.

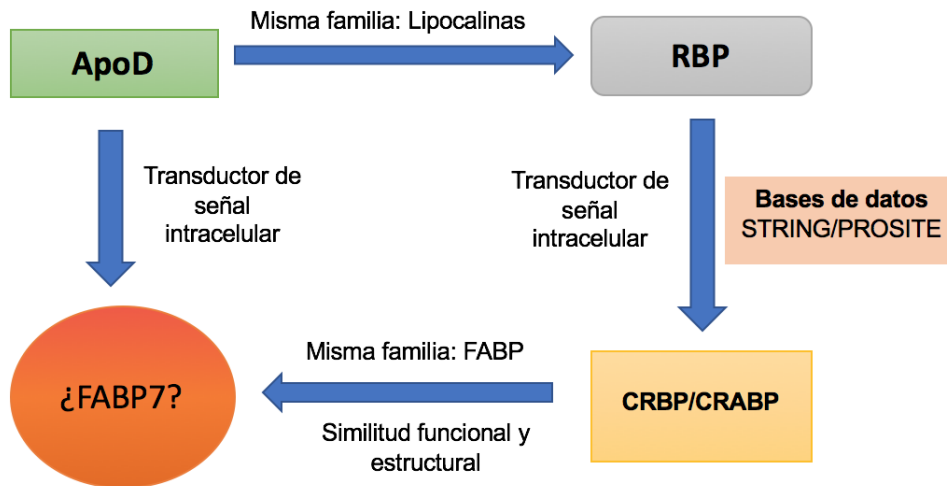
(Schnell et al. 2014) estudió otra posible implicación neuronal de FABP7, mediante la formación de Rev-ERBa (KO), receptor nuclear que es un represor de la transcripción. Esto condujo a la sobreexpresión de FABP7 en la zona subgranular del hipocampo (SGZ) donde las células progenitoras neuronales (NPC) pueden iniciar la neurogénesis adulta. Estos resultados son coincidentes con (Li et al. 2018) en los que relaciona que la proliferación de los astrocitos inducida por DHA está regulada directamente por FABP7

Después del análisis bibliográfico de las distintas funciones, estructura y distribución neuronal de FABP7 llego a las siguientes conclusiones:

- Las funciones de neuroprotección y neurogénesis son funciones muy similares a las llevadas a cabo por ApoD.
- La estructura de FABP7 estudiada tanto en las bases de datos como en la literatura corresponde a una estructura acorde a la familia de las lipocalinas.

Cabría esperar en base al análisis bibliográfico tanto de ApoD como de FABP7 que las funciones neuroprotectoras de ApoD, se pudiesen llevar a cabo conjuntamente con FABP7 ya que esta última podría operar como la proteína transductora intracelular objetivo de mi estudio.

Así, en el siguiente esquema se resumen los pasos llevados a cabo para proponer a FABP7 como proteína transductora.



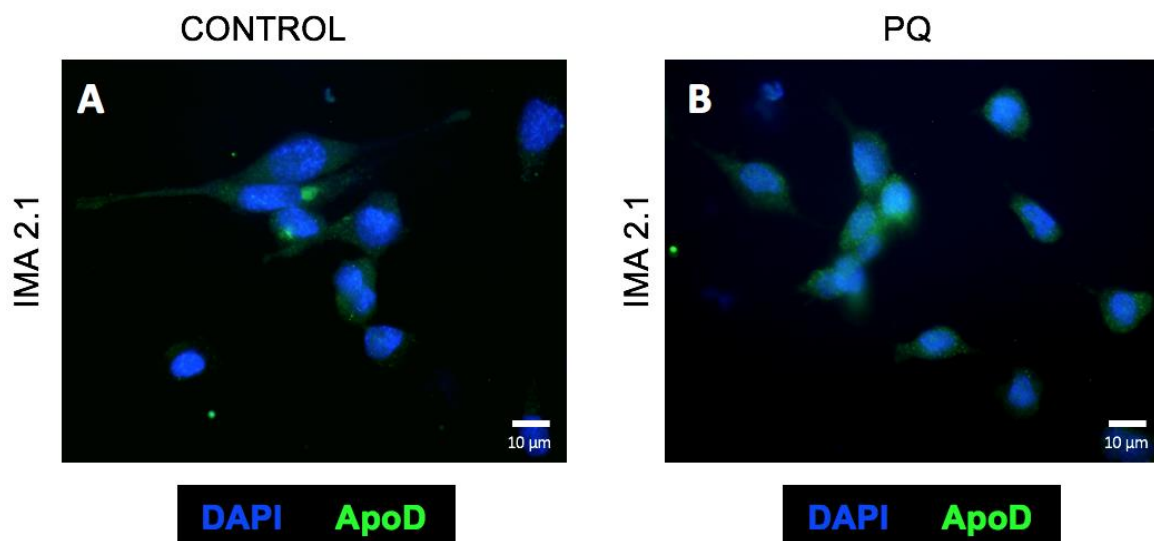
**Fig. 6** Esquema de la sistemática bibliográfica llevada a cabo para proponer la hipótesis de FABP7 como posible proteína transdutora de ApoD

## RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA. INMUNOCITOQUÍMICA

La inmunocitoquímica consistió en hacer una doble detección de las proteínas ApoD y FABP7, en los que se han revelado los núcleos con DAPI. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico en modo contraste diferencial interferencial (DIC).

En primer lugar, analizo la distribución de ApoD en las células control respecto de las células estimuladas de la línea celular IMA 2.1. Se observa que ApoD se distribuye en toda la célula tanto en las control como en las estimuladas (**Figura 7**). Esta observación es coincidente con el estudio de (Do Carmo, Levros y Rassart 2007) (Li et al. 2016) donde sugiere que en condiciones normales ApoD es principalmente perinuclear, pero se acumula en el citoplasma y el núcleo en estas condiciones de estrés.

La principal diferencia es el nivel de expresión, ya que en las células estimuladas se observa una sobreexpresión mayor de ApoD que en el caso de las células control probablemente por el ingreso en la célula de ApoD exógeno como consecuencia del estímulo pro-oxidativo.



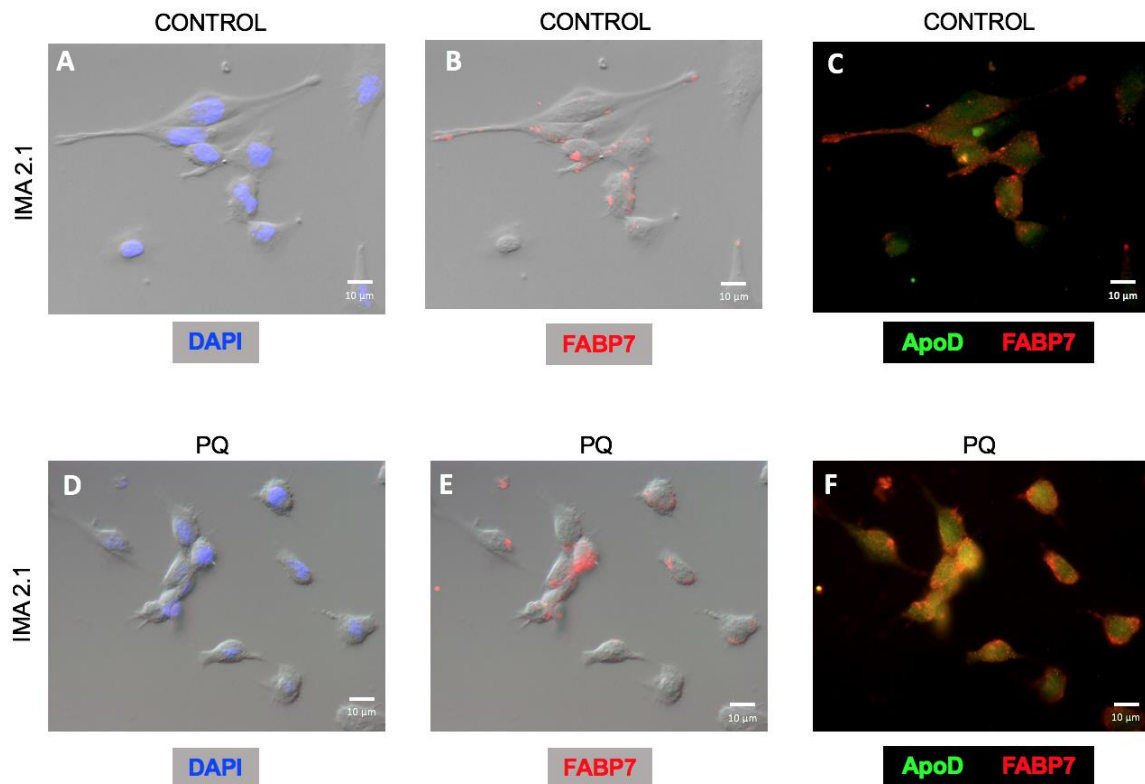
**Fig. 7 Inmunocitoquímica de células IMA 2.1 control (A) y tratadas con PQ (B). Las imágenes se han obtenido a 60x. El marcaje de ApoD se observa en verde. Los núcleos se revelan con DAPI.**

La primera observación es la diferente morfología de las células control con respecto a las células tratadas con un estímulo pro-oxidativo. En las células control existe una morfología conservada con prolongaciones citoplasmáticas mientras que se observa una disminución de estas mismas en las células tratadas con PQ (**ver Figura 8 A y D**).

Se observa, sin embargo, que existe poca o ninguna diferencia en la distribución y en la expresión de FABP7, tanto en células control como en las células tratadas con PQ. En los dos casos se observa una distribución de FABP7 hacia la membrana de la célula, resultado coincidente con los estudios de (KIPP et al. 2011) donde sitúa esta molécula en los bordes anteriores de la membrana de los astrocitos (**Ver Figura 8 B y E**).

Se observan claras diferencias cuando se revela la doble inmunofluorescencia ApoD-FABP7 en el control y en las células tratadas con PQ (**ver Figura 8 C y F**). En el caso de ApoD, existe un aumento de la expresión del mismo en condiciones de estrés oxidativo, dato igualmente coincidente con el análisis bibliográfico realizado (Do Carmo, Levros y Rassart 2007).

Con respecto a la **Figura 8 F**, existen zonas sombreadas en amarillo que implica una superposición de los marcajes lo que nos indica una proximidad espacial, que sugeriría una posible colocalización. Existen factores que dificultan y generan sesgo sobre una posible colocalización, como la superposición de las distintas capas y el posible sesgo generado por las distintas intensidades seleccionadas.



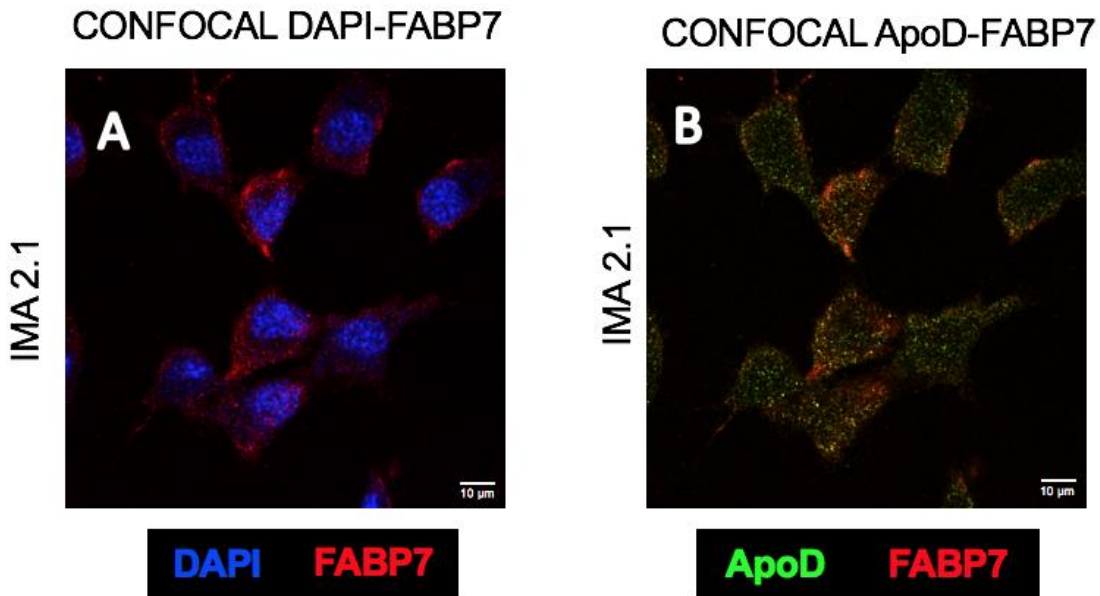
**Fig. 8** Doble inmunocitoquímica de células IMA 2.1 control (A-C) y tratadas con PQ (D-F). Las imágenes se han obtenido a 60x. El marcaje de FABP7 se observa en rojo y ApoD en verde. Los núcleos se revelan con DAPI.

Al analizar las imágenes de la inmunocitoquímica con el microscopio confocal eliminamos uno de los sesgos de la inmunofluorescencia óptica, como es la sobresaturación de luz como consecuencia de la excitación en los distintos planos de la célula.

Así, el microscopio confocal nos permite obtener imágenes centradas en un plano focal y eliminar la luz que está fuera de este mismo. Como se puede observar, la calidad de la imagen es mayor ya que existe mayor nitidez.

En el análisis de las imágenes confocales podemos observar en la **Figura 9 A** de forma más específica como la distribución de FABP7 es fundamentalmente de membrana, aunque se aprecia cierta localización intracelular, dato que coincide con las imágenes observadas en microscopio de fluorescencia o de campo amplio.

En la **Figura 9 B**, observamos de forma más específica como existe una colocalización entre ApoD-FABP7, en condiciones de estrés fundamentalmente en membrana. Aunque también se observa en citoplasma, lo que podría indicar una posible colocalización en otros orgánulos citoplasmáticos como lisosomas.



**Fig. 9** Imágenes de microscopía confocal de la doble inmunocitoquímica de células IMA 2.1 tratadas con PQ. Las imágenes se han obtenido a 60x. El marcaje de FABP7 se observa en rojo y ApoD en verde. Los núcleos se revelan con DAPI.

## DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

---

En base al estudio y resultados de la revisión bibliográfica que realicé, considero que existen datos contrastados acerca de ApoD respecto a su estructura y clasificación. Numerosos artículos analizan la estructura de esta proteína concretando que no está relacionada estructuralmente con las apolipoproteínas y que pertenece a la familia de las lipocalinas.

Centrándome en las posibles funciones que desempeña ApoD en el SNC, existen evidencias en numerosos artículos que la función principal es la neuroprotección, debido a su actividad antioxidante y antiinflamatoria. Se proponen distintos mecanismos celulares por los cuales ApoD llega a esta función principal, no encontrando un mecanismo subcelular detallado que me aporte información sobre como ApoD lleva a cabo esta neuroprotección.

Entre los mecanismos propuestos por los grupos de investigación, una gran diversidad de artículos se centra en su posible rol como modulador del estado de oxidación de moléculas lipídicas en membrana, donde uno de sus principales ligandos es el ácido araquidónico (AA). Este mecanismo neuroprotector relacionado con el AA es el más frecuentemente sugerido por los grupos que estudian la relación funcional entre ApoD y los distintos ligandos de unión.

Los artículos en los que se evalúa el papel de ApoD en diversas patologías como la Esquizofrenia, el trastorno bipolar o la enfermedad de Alzheimer se centran en la expresión y correlación positiva entre ApoD y la enfermedad neurodegenerativa en etapas tardías, así como en su potencial antioxidante. Nuevamente los grupos de investigación no se centran en mecanismos de transducción, sino que los estudios se enfocan en el posible papel de ApoD como diana terapéutica.

Dentro del análisis bibliográfico de ApoD, existe evidencia en determinados artículos en los que se cita que la vía de señalización utilizada por esta proteína es JNK. Son quinasas que se unen y fosforilan a la proteína c-Jun. Pertenecen a las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que se activan en situaciones de estrés. La isoforma JNK-1 que se encuentra en tejidos, así como la JNK-3 que se encuentra en el cerebro principalmente están implicadas en apoptosis, neurodegeneración, diferenciación celular y proliferación, así como en procesos inflamatorios.

Sin embargo, en estos artículos no se detalla el mecanismo molecular completo ya que no obtengo información ni se propone una proteína transductora de ApoD. No se ha encontrado relación entre esta vía de señalización y FABP7.

Es importante destacar que las proteínas que unen retinol (CRBP) y ácido retinoico (CRABP) están estrechamente relacionadas con las FABP ya que presentan una estructura terciaria muy similar. Entre los miembros de esta familia de proteínas se observa una elevada conservación de la estructura terciaria, aún con identidades de secuencia que llegan tan solo al 20% en algunos casos.

Las funciones de transporte de ácidos grasos, neuroprotección y proliferación de astrocitos estudiadas en la revisión de la literatura de FABP7 son en gran parte coincidentes con las funciones desempeñadas por ApoD, así como su estructura terciaria muy similar ya que pertenecen a la familia de las lipocalinas.

Estos datos me llevan a mi objetivo general, una vez revisada la literatura se sugiere la posible interacción de ApoD, tras ser internalizada directamente o a través de otros receptores proteicos, con la proteína citosólica FABP7. Así, esta proteína actuaría como transductora de la señal en la célula provocando una respuesta fisiológica.

La doble inmunocitoquímica fue el objetivo específico propuesto y se llevó a cabo marcando con anticuerpos específicos de ApoD y FABP7. Se permeabilizaron las células para conseguir un correcto marcaje del interior citoplasmático ya que la interacción de estudio se localiza una vez que ApoD se ha endocitado.

El resultado de esta técnica permitió observar que ambas moléculas colocalizaban, pudiendo comprobarlo tanto en microscopía óptica convencional como en microscopía confocal. Esta colocalización se detecta de manera aislada en el cultivo celular control (**ver Figura 7 C**) y de manera más abundante en el cultivo celular expuesto al estímulo pro-oxidativo (**ver Figura 7 F**).

Con respecto a esta figura cabe destacar que se observan 2 patrones de marcaje diferenciados. En las células cuya morfología es similar al control se observa un patrón de marcaje con mayor expresión de ApoD pero sin tanta colocalización. Esto podría implicar que dichas células se hayan visto menos afectadas por el tratamiento con PQ o que ApoD ya haya realizado su función neuroprotectora y

haya paliado el daño oxidativo por lo que parece lógico pensar que la señal de transducción ya haya ocurrido.

En el segundo patrón de marcaje se observan células que expresan abundante ApoD y FABP7. Se observa mayor tonalidad amarilla, lo que nos podría indicar que ApoD está realizando su función neuroprotectora junto a FABP7. Esta colocalización la observamos fundamentalmente en la membrana plasmática, aunque en estas imágenes de microscopía confocal se observa con nitidez como existe colocalización intracelular probablemente a nivel de membranas de orgánulos. En base a la literatura de ApoD, podrían ser membranas lisosomales, donde existe evidencia de que ApoD ejerce funciones antioxidantes modulando la peroxidación lipídica y manteniendo la integridad de las membranas de lisosomas vulnerables al estrés oxidativo.

Estos resultados apoyan la potencial interacción ApoD-FABP7, pero no son concluyentes ya que sería necesario complementar estos estudios con otros más concretos de interacción proteína-proteína.

Para determinar si esta colocalización implicase una interacción de relevancia funcional, en primer lugar, sería conveniente aislar el complejo ApoD-FABP7. Propondría técnicas basadas en la interacción proteína-proteína como una inmunoprecipitación del complejo formado.

## CONCLUSIONES

---

- Después de una revisión bibliográfica detallada de ApoD, se propone a FABP7 según criterios de semejanza estructural y funcional como una posible proteína transductora que medie la señal de ApoD para funciones neuroprotectoras.
- El cultivo celular sometido a condiciones de estrés oxidativo expresa una morfología claramente diferenciada con retracción de sus prolongaciones citoplasmáticas con respecto al cultivo celular en condiciones control.
- Existe una marcada diferencia entre el patrón de marcaje de ApoD en condiciones control respecto de las condiciones de estímulo pro-oxidativo donde se aprecia una marcada sobreexpresión y una mayor distribución.
- El resultado de la doble inmunocitoquímica de la línea celular de ratón IMA 2.1, revela la colocalización de ApoD-FABP7 mayoritariamente en membrana, aunque se aprecia también intracelularmente.
- Dado que ApoD es pleiotropica, considero que FABP7 puede ser la proteína transductora en el sistema nervioso con la cual lleva la amplia gama de funciones neuroprotectoras.



## BIBLIOGRAFÍA

---

BANASZAK, L., WINTER, N., XU, Z., BERNLOHR, D.A., COWAN, S. y JONES, T.A., 1994. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Advances in Protein Chemistry*, vol. 45, pp. 89-151. ISSN 0065-3233.

COFER, S. y ROSS, S.R., 1996. The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene*, vol. 171, no. 2, pp. 261-263. ISSN 0378-1119.

DO CARMO, S., JACOMY, H., TALBOT, P.J. y RASSART, E., 2008. Neuroprotective Effect of Apolipoprotein D against Human Coronavirus OC43-Induced Encephalitis in Mice. *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 41, pp. 10330-10338. ISSN 0270-6474, 1529-2401. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2644-08.2008.

DO CARMO, S., LEVROS, L.-C. y RASSART, E., 2007. Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1773, no. 6, pp. 954-969. ISSN 01674889. DOI 10.1016/j.bbamcr.2007.03.007.

DRAYNA, D., FIELDING, C., MCLEAN, J., BAER, B., CASTRO, G., CHEN, E., COMSTOCK, L., HENZEL, W., KOHR, W. y RHEE, L., 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 35, pp. 16535-16539. ISSN 0021-9258.

EICHINGER, A., NASREEN, A., KIM, H.J. y SKERRA, A., 2007. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 42, pp. 31068-31075. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/jbc.M703552200.

FLOWER, D.R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal*, vol. 318, no. Pt 1, pp. 1-14. ISSN 0264-6021.

GANFORNINA, M.D., DO CARMO, S., MARTÍNEZ, E., TOLIVIA, J., NAVARRO, A., RASSART, E. y SANCHEZ, D., 2010. ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia*, vol. 58, no. 11, pp. 1320-1334. ISSN 1098-1136. DOI 10.1002/glia.21010.

GANFORNINA, M.D., SÁNCHEZ, D., PAGANO, A., TONACHINI, L., DESCALZICANCEDDA, F. y MARTÍNEZ, S., 2005. Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, vol. 232, no. 1, pp. 191-199. ISSN 1058-8388. DOI 10.1002/dvdy.20193.

HULL-THOMPSON, J., MUFFAT, J., SANCHEZ, D., WALKER, D.W., BENZER, S., GANFORNINA, M.D. y JASPER, H., 2009. Control of Metabolic Homeostasis by Stress Signaling Is Mediated by the Lipocalin NLaz. En: E. RULIFSON (ed.), *PLoS Genetics*, vol. 5, no. 4, pp. e1000460. ISSN 1553-7404. DOI 10.1371/journal.pgen.1000460.

KAGAWA, Y., YASUMOTO, Y., SHARIFI, K., EBRAHIMI, M., ISLAM, A., MIYAZAKI, H., YAMAMOTO, Y., SAWADA, T., KISHI, H., KOBAYASHI, S., MAEKAWA, M., YOSHIKAWA, T., TAKAKI, E., NAKAI, A., KOGO, H., FUJIMOTO, T. y OWADA, Y., 2015. Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1. *Glia*, vol. 63, no. 5, pp. 780-794. ISSN 0894-1491. DOI 10.1002/glia.22784.

KIPP, M., CLARNER, T., GINGELE, S., POTT, F., AMOR, S. y BEYER, C., 2011. Brain Lipid Binding Protein (FABP7) as Modulator of Astrocyte Function. , vol. 60, pp. 12.

LI, H., RUBERU, K., KARL, T. y GARNER, B., 2016. Cerebral Apolipoprotein-D Is Hypoglycosylated Compared to Peripheral Tissues and Is Variably Expressed in Mouse and Human Brain Regions. En: M. GASSET (ed.), *PLOS ONE*, vol. 11, no. 2, pp. e0148238. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0148238.

LI, H., YANG, Q., HAN, X., TAN, X., QIN, J. y JIN, G., 2018. Low-dose DHA-induced astrocyte proliferation can be attenuated by insufficient expression of BLBP in vitro. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, vol. 134, pp. 114-122. ISSN 1098-8823. DOI 10.1016/j.prostaglandins.2017.09.003.

LOERCH, P.M., LU, T., DAKIN, K.A., VANN, J.M., ISAACS, A., GEULA, C., WANG, J., PAN, Y., GABUZDA, D.H., LI, C., PROLLA, T.A. y YANKNER, B.A., 2008. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS One*, vol. 3, no. 10, pp. e3329. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0003329.

MCCONATHY, W.J. y ALAUPOVIC, P., 1973. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: A new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Letters*, vol. 37, no. 2, pp. 178-182. ISSN 0014-5793. DOI 10.1016/0014-5793(73)80453-3.

NAPOLI, J.L., 2016. Functions of Intracellular Retinoid Binding-Proteins. En: M.A. ASSON-BATRES y C. ROCHETTE-EGLY (eds.), *The Biochemistry of Retinoid Signaling II* [en línea]. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 21-76. [Consulta: 21 julio 2018]. ISBN 978-94-024-0943-7. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-0945-1\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-0945-1_2).

NAVARRO, A., DEL VALLE, E., JUÁREZ, A., MARTINEZ, E., ORDÓÑEZ, C., ASTUDILLO, A. y TOLIVIA, J., 2010. Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, vol. 32, no. 1, pp. 85-96. ISSN 1574-4647. DOI 10.1007/s11357-009-9117-0.

NAVARRO, A., DEL VALLE, E. y TOLIVIA, J., 2004. Differential expression of apolipoprotein d in human astroglial and oligodendroglial cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, vol. 52, no. 8, pp. 1031-1036. ISSN 0022-1554. DOI 10.1369/jhc.3A6213.2004.

NAVARRO, A., TOLIVIA, J., ASTUDILLO, A. y DEL VALLE, E., 1998. Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neuroscience Letters*, vol. 254, no. 1, pp. 17-20. ISSN 0304-3940.

ORDÓÑEZ, C., NAVARRO, A., PEREZ, C., ASTUDILLO, A., MARTÍNEZ, E. y TOLIVIA, J., 2006. Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histology and Histopathology*, vol. 21, no. 4, pp. 361-366. ISSN 1699-5848. DOI

PASCUA-MAESTRO, R., DIEZ-HERMANO, S., LILLO, C., GANFORNINA, M.D. y SANCHEZ, D., 2017. Protecting cells by protecting their vulnerable lysosomes: Identification of a new mechanism for preserving lysosomal functional integrity upon oxidative stress. En: B. LU (ed.), *PLOS Genetics*, vol. 13, no. 2, pp. e1006603. ISSN 1553-7404. DOI 10.1371/journal.pgen.1006603.

RASSART, E., BEDIRIAN, A., DO CARMO, S., GUINARD, O., SIROIS, J., TERRISSE, L. y MILNE, R., 2000. Apolipoprotein D. *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1482, no. 1-2, pp. 185-198. ISSN 0006-3002.

REINDL, M., KNIPPING, G., WICHER, I., DILITZ, E., EGG, R., DEISENHAMMER, F. y BERGER, T., 2001. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 119, no. 2, pp. 327-332. ISSN 0165-5728.

RUIZ, M., SANCHEZ, D., CORRENTI, C., STRONG, R.K. y GANFORNINA, M.D., 2013. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS Journal*, vol. 280, no. 16, pp. 3928-3943. ISSN 1742464X. DOI 10.1111/febs.12394.

SÁNCHEZ, D., GANFORNINA, M.D. y MARTÍNEZ, S., 2002. Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, vol. 110, no. 1-2, pp. 225-229. ISSN 0925-4773.

SCHILDKNECHT, S., KIRNER, S., HENN, A., GASPARIC, K., PAPE, R., EFREMOVA, L., MAIER, O., FISCHER, R. y LEIST, M., 2012. Characterization of mouse cell line IMA 2.1 as a potential model system to study astrocyte functions. *ALTEX*, vol. 29, no. 3, pp. 261-274. ISSN 1868-596X. DOI 10.14573/altex.2012.3.261.

SCHNELL, A., CHAPPUIS, S., SCHMUTZ, I., BRAI, E., RIPPERGER, J.A., SCHAAD, O., WELZL, H., DESCOMBES, P., ALBERI, L. y ALBRECHT, U., 2014. The Nuclear Receptor REV-ERB $\alpha$  Regulates Fabp7 and Modulates Adult Hippocampal Neurogenesis. En: H. OSTER (ed.), *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, pp. e99883. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0099883.

SÉGUIN, D., DESFORGES, M. y RASSART, E., 1995. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Research. Molecular Brain Research*, vol. 30, no. 2, pp. 242-250. ISSN 0169-328X.

SMATHERS, R.L. y PETERSEN, D.R., 2011. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Human Genomics*, vol. 5, no. 3, pp. 170. ISSN 1479-7364. DOI 10.1186/1479-7364-5-3-170.

SURESH, S., YAN, Z., PATEL, R.C., PATEL, Y.C. y PATEL, S.C., 1998. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *Journal of Neurochemistry*, vol. 70, no. 1, pp. 242-251. ISSN 0022-3042.

THOMAS, E.A., DEAN, B., PAVEY, G. y SUTCLIFFE, J.G., 2001. Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology

of psychiatric disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 7, pp. 4066-4071. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.071056198.

VEERKAMP, J.H. y ZIMMERMAN, A.W., 2001. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 16, no. 2, pp. 133-142. ISSN 1559-1166. DOI 10.1385/JMN:16:2-3:133.