



Instituto de Biología y Genética Molecular

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología

Universidad de Valladolid – CSIC

Estudio de las interacciones con la membrana plasmática de la Apolipoproteína D

Trabajo de Fin de Máster en Investigación Biomédica

RITA LOSA RODRÍGUEZ

Directores: Diego Sánchez y María Dolores Ganfornina

Septiembre 2018

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| Funciones de ApoD en el sistema nervioso | 5 |
| El sistema nervioso y el estrés oxidativo | 6 |
| Objetivos | 7 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| Búsqueda bibliográfica | 8 |
| Cultivo celular | 10 |
| Siembra para realizar marcajes con inmunocitoquímica | 11 |
| Preparación de cristales de poli-L-Lisina | 11 |
| Separación de las células adherentes | 11 |
| Contaje en cámara de Neubauer | 11 |
| Aplicación de un estímulo pro-oxidativo | 12 |
| Inmunocitoquímica | 13 |
| RESULTADOS | 14 |
| Análisis de la literatura | 14 |
| Ob-Rb como posible receptor de ApoD | 16 |
| Basigina como posible receptor de ApoD | 18 |
| Inmunocitoquímica | 19 |
| Diferencia de expresión de hApoD | 19 |
| Localización de BSG y hApoD en situación de estrés oxidativo | 20 |
| DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS | 23 |
| CONCLUSIONES | 26 |
| BIBLIOGRAFÍA | 27 |

INTRODUCCIÓN

La Apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las Lipocalinas, expresada durante el desarrollo normal y el envejecimiento. Fue aislada por primera vez en el plasma, asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL)⁽¹⁾, por McConathy y Alaupovic en 1973.

El gen de hApoD (ApoD humana) se sitúa en el cromosoma 3 (3q26.2) humano, compuesto por 5 exones⁽²⁾ que dan como resultado un DNA codificante de 855 bp⁽³⁾. En el promotor del gen de ApoD se han identificado sitios de unión de elementos de respuesta al estrés y de respuesta a hormonas (estrógenos, progesterona y glucocorticoides).

Las Lipocalinas son una familia de pequeñas proteínas globulares extracelulares de 150-250 aminoácidos que comparten propiedades moleculares de reconocimiento como la unión de pequeñas moléculas hidrofóbicas, unión a receptores específicos de superficie y la formación de complejos covalentes y no covalentes con otras macromoléculas solubles. Están implicadas en transporte y almacenaje de vitaminas y hormonas, así como en la regulación del metabolismo, la respuesta inmune y el estrés. En un principio se postuló la pertenencia de ApoD al grupo de las apolipoproteínas debido a su localización en las HDL, pero con el estudio de su estructura y su distribución tisular se descartó por falta de homología y se incorporó a las Lipocalinas⁽³⁾. Se vio que ApoD tenía hasta un 25% de identidad con proteínas que unen retinol (RBP) y 30-40% con proteínas de insecto que unen bilina (BBP)⁽⁴⁾, miembros de esta familia.

La estructura primaria de ApoD es una cadena de 189 aminoácidos, correspondiendo los 20 primeros del extremo N-terminal al péptido señal que codifica la secuencia de exportación de la proteína al lumen del retículo endoplásmico. Este péptido señal será eliminado dando lugar a una proteína madura de 169 aminoácidos que puede ser secretada al medio extracelular. Según el tejido en el que sea sintetizada, varía el patrón de glicosilación originando un peso entre 19-32 kDa^(4,5). ApoD humana presenta dos puntos de glicosilación, en las asparraginas Asn45 y Asn78.

La estructura terciaria de ApoD es característica de la familia de las Lipocalinas. Consta de un barril- β formado por 8 láminas β antiparalelas estabilizadas por una hélice α y conectadas entre sí por 7 lazos. Las 5 cisteínas de su secuencia forman dos puentes disulfuro que ayudan a mantener el barril ligeramente distendido⁽⁶⁾, quedando la quinta cisteína desapareada y con la posibilidad de unirse a otras macromoléculas del plasma, como en las HDL donde está asociada a LCAT (Lecitin Colesterol Acil Transferasa).

El barril β contiene en su interior un bolsillo delimitado por aminoácidos apolares que permite la unión de posibles ligandos hidrofóbicos⁽⁷⁾. Varias moléculas hidrofóbicas muestran alta afinidad *in vitro*, destacando el ácido araquidónico, progesterona, retinol, ácido retinoico, anandamida y esfingomielina. Sin embargo, los únicos ligandos unidos a ApoD en condiciones fisiológicas encontrados hasta el momento son la progesterona⁽⁶⁾ (**Figura 1**) y el odorante E-3-metil-2-ácido hexenoico, presente en la piel de la axila humana⁽⁵⁾.

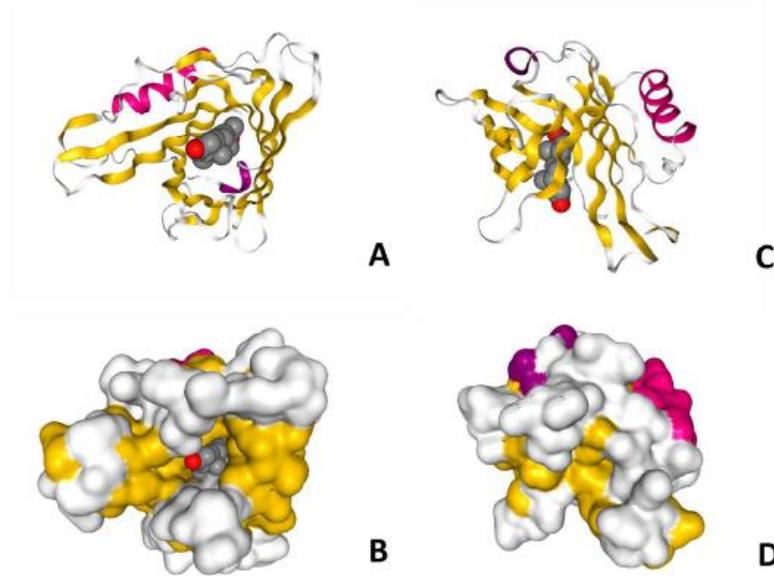


Figura 1. Estructura terciaria de ApoD y su interacción con Progesterona. **A y C:** Modelos tipo *Cartoon*. **B y D:** Modelos de superficie. Se muestran dos orientaciones ortogonales, con la entrada al bolsillo visible en A y B. Las láminas β se muestran en amarillo y la hélice α en rosa. Imágenes obtenidas de *Protein Data Bank*.

Debido a estas características, se ha propuesto como una proteína multifuncional, pudiendo tener funciones locales y paracrinas, ayudando en la distribución de sus ligandos a tejidos diferentes de aquellos donde se expresa⁽⁸⁾. Se cree que los ligandos asociados varían según las condiciones del tejido donde está expresándose pudiendo ser una proteína de fase aguda en la regeneración nerviosa, una ayuda al transporte de esteroides en las glándulas adrenales o los testículos, o puede servir para evacuar moléculas tóxicas generadas en el bazo en la destrucción eritrocitaria⁽⁴⁾.

La síntesis de ApoD en humanos se localiza en el páncreas, la placenta, el bazo, los pulmones, los ovarios y testículos, los riñones y el sistema nervioso⁽⁴⁾. En otros mamíferos, como mono y conejo, se encuentra igualmente una amplia distribución en los tejidos corporales^(8,9); pero en rata y ratón está prácticamente limitada al sistema nervioso central y periférico. A pesar de esta diferencia, la similitud de sus regiones codificantes indica una misma función transportadora de ligandos.

FUNCIONES DE APOD EN EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es uno de los lugares de máxima expresión de ApoD en los mamíferos, sintetizándose tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. La proteína es sintetizada por determinados tipos celulares y posiblemente captada por otros. En otros tejidos la función de ApoD es dudosa o es variable según el lugar de secreción, pero en el sistema nervioso ha sido muy estudiada y se conoce su implicación en procesos de reparación y remielinización tras situaciones traumáticas.

Gracias al trabajo del Nobel de Fisiología y Medicina de 1906 conjunto para Cajal y Golgi conocemos que el tejido nervioso está formado por dos categorías de células divididas en células nerviosas (neuronas) y células gliales (**Figura 2**).

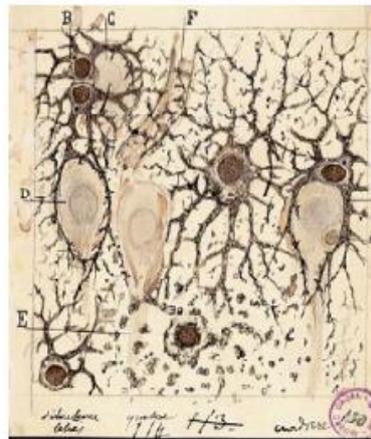


Figura 2. Ilustración de Ramón y Cajal mostrando a los astrocitos en el sistema nervioso. Destaca su capacidad de división y su íntima relación con las neuronas.

Las neuronas se encargan de la comunicación sináptica, gracias al buen funcionamiento del citoesqueleto, los orgánulos y los componentes de las membranas.

Las células gliales engloban a los astrocitos, los oligodendrocitos y células microgliales. Los astrocitos tienen prolongaciones que les confieren un aspecto estrellado y que desempeñan una variedad de funciones, entre las que destaca la de un mantenimiento apropiado de la señalización y transmisión de información entre neuronas. Los oligodendrocitos depositan una envoltura laminada y rica en lípidos llamada mielina alrededor de algunos axones. La mielina tiene efectos importantes sobre la velocidad de transmisión de señales eléctricas. Su equivalente en el sistema nervioso periférico son las células de Schwann. La microglía desempeña funciones fagocíticas y de señalización y modulación inflamatoria.

Además, los astrocitos son muy resistentes, especialmente cuando el cerebro envejece. El estrés oxidativo, concomitante a la mayoría de las formas de daño en el sistema nervioso central y a la neurodegeneración, es un estímulo muy conocido para activar la reactividad de los astrocitos.

En el sistema nervioso central, ApoD se expresa principalmente en células gliales de la sustancia blanca, como astrocitos y oligodendrocitos^(10,11), algunas neuronas y células piales y perivasculares.

En el sistema nervioso periférico se expresa en fibroblastos y en las células de Schwann, donde puede contribuir al mantenimiento, homeostasis y movimiento de lípidos en los nervios periféricos⁽¹²⁾. La presencia de ApoD se ve aumentada en el nervio periférico de roedores tras una lesión y su falta denota una disminución en la velocidad de la conductividad motora y vainas de mielina más delgadas. Se ha demostrado que ApoD ayuda a recuperar la función locomotora promoviendo la limpieza de mielina y regulando el número de macrófagos en la zona dañada⁽¹³⁾.

El incremento de ApoD en el sistema nervioso no ocurre únicamente ante un daño, sino que también se ha observado durante el desarrollo y envejecimiento, en el cual la inflamación es un proceso fundamental⁽¹⁴⁾. Este aumento se ha observado tanto en humanos como en monos y ratones⁽¹⁵⁾.

Se ha detectado un incremento anormal de ApoD en líquido cefalorraquídeo, en el hipocampo y en el córtex prefrontal en pacientes con la enfermedad de Alzheimer^(16,17). En la enfermedad de Parkinson, caracterizada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (especialmente sensibles al estrés oxidativo), se ha visto también un incremento de ApoD en las células gliales⁽¹⁸⁾. Asimismo, en otras enfermedades del sistema nervioso como la esquizofrenia, trastorno bipolar⁽¹⁹⁾, Niemann-Pick tipo C⁽²⁰⁾ o esclerosis múltiple⁽²¹⁾ se ha visto aumentada respecto a pacientes sanos.

EL SISTEMA NERVIOSO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo en los sistemas biológicos es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos encargados de eliminarlos o reparar los daños que generan. Las ROS (especies reactivas de oxígeno) y las RNS (especies reactivas de nitrógeno) son pequeñas moléculas muy reactivas debido a la presencia de electrones desapareados en su capa de valencia que les confieren un alto poder oxidante.

De manera basal, se encuentran en concentraciones cuyos daños pueden ser reparados constantemente. Para protegerse, las células despliegan una variedad de mecanismos defensivos que incluyen el recambio lipídico, la degradación de proteínas y la reparación de DNA además de la producción de una amplia batería de moléculas antioxidantes. Los antioxidantes más relevantes son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa.

Sin embargo, los ROS y RNS a niveles fisiológicos tienen funciones señalizadoras que pueden contribuir a la homeostasis celular, pudiendo actuar de manera autocrina, paracrina o intracelular implicándose en muchos procesos señalizadores⁽²²⁾.

Un desbalance en el estado redox resulta tóxico para la célula al producirse daños tanto en las proteínas como en los lípidos y los ácidos nucleicos que podrían llegar a provocar la muerte celular por apoptosis, si el daño es moderado, o por necrosis, si es elevado. La mayoría de los efectos que el estrés oxidativo ejerce resultan en cambios estructurales que conllevan a su disfunción o pérdida de actividad⁽²³⁾.

La fuente de oxígeno reactivo más importante en condiciones normales es la mitocondria, a través de la respiración oxidativa. La respiración celular es un conjunto de reacciones que degradan compuestos orgánicos (hidratos de carbono, ácidos grasos, aminoácidos o cuerpos cetónicos) por oxidación utilizándolos como combustible para la obtención de energía (ATP, nucleótido trifosfato).

Las células del sistema nervioso están expuestas a una fuerte y constante producción de ROS y RNS, debido a un metabolismo muy demandante. Además, durante el envejecimiento o en determinadas enfermedades el sistema nervioso se ve afectado por factores que incrementan la degeneración debido a un aumento en la producción y/o una reducción en la eliminación de ROS.

Utilizando el estrés oxidativo inducido de manera experimental por el tratamiento con Paraquat (PQ), se ha demostrado que ApoD tiene efectos protectores sobre la supervivencia del organismo, tanto en ratones como en moscas, y que ayuda a mantener la homeostasis del tejido nervioso mediante el mantenimiento de bajos niveles de peroxidación lipídica^(24,25).

Los lisosomas son vesículas intracelulares ácidas esenciales para el óptimo funcionamiento de muchas enzimas, para el proceso de reciclaje celular mediante autofagia, endocitosis y exocitosis. En el sistema nervioso, la función lisosomal es esencial para la supervivencia de neuronas, la actividad fagocítica de la microglía y la mielinización. Así, se conoce que la disfunción lisosómica es la base de mecanismos patogénicos en patologías como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y del envejecimiento fisiológico.

Se ha demostrado el papel de ApoD en la homeostasis del pH de un conjunto de lisosomas especialmente vulnerables a la oxidación en astrocitos y neuronas, dotando de estabilidad a la membrana de este subgrupo en condiciones de estrés oxidativo⁽²⁶⁾.

Toda esta información revela que ApoD posee un papel neuroprotector, que se pone en marcha ante el estrés oxidativo y la inflamación para evitar el efecto dañino que estos procesos tienen sobre las células⁽²³⁾.

OBJETIVOS

Como hemos mencionado anteriormente, ApoD se sintetiza fundamentalmente en el sistema nervioso. Ejerce una función protectora frente al estrés oxidativo tanto en las células que la producen como a las de su entorno. Sus funciones en este sistema han sido ampliamente estudiadas, en

parte por su aplicación futura dirigida a la clínica de enfermedades neurodegenerativas y orientadas a garantizar un envejecimiento lo más saludable posible.

Existen numerosos trabajos que evidencian los múltiples efectos de la función de ApoD en los distintos tejidos. Sin embargo, hay diversidad de opiniones y controversia sobre el mecanismo a través del cual se producen estos efectos, y aún no se ha esclarecido totalmente.

El OBJETIVO GENERAL de mi trabajo consiste en estudiar cómo se relaciona ApoD con la membrana plasmática de astrocitos humanos, recopilar la información bibliográfica disponible sobre el tema y proponer una posible proteína receptora que permita la internalización de ApoD para que ejerza su papel neuroprotector ante un estímulo de estrés oxidativo.

Los OBJETIVOS ESPECÍFICOS son:

- Realización de una búsqueda bibliográfica orientada y lectura crítica de la información publicada hasta el momento sobre la relación de ApoD con las membranas biológicas y la posibilidad de que posea un receptor específico en la misma.
- Selección de una proteína candidata a ser el receptor específico de ApoD.
- Estudio de la colocalización mediante inmunocitoquímica de la proteína seleccionada y ApoD en cultivo celular de astrocitos humanos en situación de estrés oxidativo.
- Estudio de la idoneidad y evidencias de que la proteína seleccionada sea el receptor específico de membrana de ApoD.

MATERIALES Y MÉTODOS

BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Para revisar la información disponible acerca de ApoD y su posible interacción con proteínas receptoras en la membrana plasmática, se realizó una revisión sistemática utilizando la base de datos bibliográfica online PubMed y la base de datos de interacciones proteína-proteína STRING. Para la organización y análisis de la información obtenida se ha empleado Microsoft Excel 2010 y el gestor de referencias Zotero.

En la base de datos PubMed, se utilizaron las palabras clave “*Apolipoprotein D*” o “*ApoD*”, acompañadas de uno o varios de los siguientes términos: “*lipocalin*”, “*signal*”, “*membrane*”, “*interact*”, “*extracellular*”, “*receptor*”, “*protein binding*” y “*trafficking*”, como se muestra en la **Tabla 1**.

Se encontraron 289 artículos que tras descartar los repetidos, se obtuvieron 203 en total.

| Palabras clave | Artículos obtenidos | Filtros | Artículos filtrados | |
|---|-----------------------------|---------|-------------------------------------|-----|
| ApoD OR Apolipoprotein D | AND <i>lipocalin</i> * | 87 | Últimos 10 años | 41 |
| | AND <i>signal</i> * | 42 | | |
| | AND <i>membrane</i> * | 270 | <i>Membrane</i> [Title/Abstract] | 36 |
| | AND <i>interact</i> * | 6 | | |
| | AND <i>extracellular</i> | 22 | | |
| | AND <i>receptor</i> | 122 | <i>Receptor</i> [Title/Abstract] | 113 |
| | AND <i>protein binding</i> | 23 | | |
| | AND <i>trafficking</i> | 6 | | |

Tabla 1. Resultados de la búsqueda bibliográfica según las palabras clave seleccionadas.

Debido al amplio número de artículos que aparecían, se preseleccionaron para su lectura completa aquellos que contuvieran:

- “*ApoD*” o “*Apolipoprotein D*” como palabra clave en título y/o resumen.
- “*Receptor*”, “*membrane*” o “*extracellular*” como palabra clave en título y/o resumen.
- ApoD como protagonista en las conclusiones.
- Fecha de publicación en los últimos 20 años (1998-2018).

Tras esta búsqueda exhaustiva se seleccionaron 31 artículos para su lectura completa (**Figura 3**). Para la evaluación de los artículos escogidos se realizó una lectura crítica teniendo en cuenta la presentación de la información, relevancia e hipótesis.



Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de selección de artículos.

CULTIVO CELULAR

Línea celular 1321N1

Se ha empleado la línea celular de astrocitoma humano 1321N1, que presenta una característica morfología glial (**Figura 4**). Esta línea es de amplio uso en estudios sobre enfermedades neurológicas que incluyen los efectos de factores neurotróficos, transporte transmembrana y enfermedades neurodegenerativas.

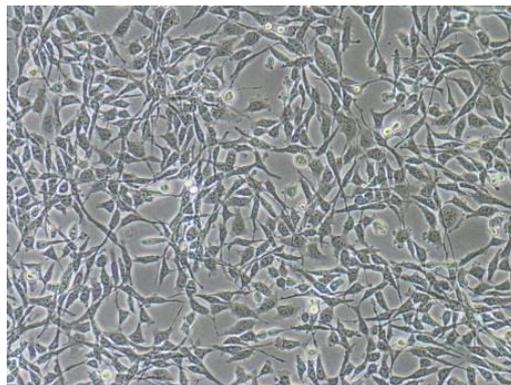


Figura 4. Cultivo de la línea celular 1321N1 empleada.

El manejo de la línea se ha realizado en condiciones de esterilidad mediante campanas de flujo laminar vertical Telstar Biostar, con filtros HEPA capaces de retener partículas superiores a 0,2 μm con un 99,9% de eficacia, ubicadas en la sala de cultivos del IBGM (Instituto de Biología Genética y Molecular, Valladolid). Para su correcta utilización, tras dejar actuar la luz UV durante aproximadamente 30 minutos, se limpia la superficie de trabajo con Cloruro de

Benzalconio 0,04% y posteriormente con Etanol 70%. Para minimizar el riesgo de contaminación, todos los materiales introducidos en la campana y los guantes se rocían previamente con Etanol 70%. A la hora de manipular los distintos frascos y medios, se pasan por la llama antes y después de su empleo.

Mantenimiento de la línea celular y medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados son DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1% L-Gln (L-Glutamina) y 1% P/S/A (Penicilina 10 U/ μ L, Estreptomicina 10 μ g/ μ L, Anfotericina B 25 μ g/ μ L). Se rebajó la cantidad de FBS al 0,2% antes de aplicar el estímulo pro-oxidativo para favorecer la acción del PQ.

El mantenimiento de la línea se ha realizado en frascos de cultivo Falcon® ventilado de 25 mL, haciendo el pase aproximadamente cada 48 horas, intentando mantener el 80-90% de confluencia. Para el crecimiento se empleó un incubador Hera Cell 150 en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 90-95% de humedad.

SIEMBRA PARA REALIZAR MARCAJES CON INMUNOCITOQUÍMICA

Preparación de cristales de poli-L-Lisina

La poli-L-Lisina es un compuesto cargado positivamente utilizado para mejorar la adhesión celular a superficies de vidrio, ya que produce la adsorción de proteínas mediante modificaciones de las cargas de superficies en el sustrato de cultivo.

Para ello, se colocan los cubreobjetos a tratar en una placa y se deposita una gota de poli-L-Lisina sobre cada uno de ellos, asegurándose de cubrirlos completamente. Tras 5 minutos de espera, se retira la poli-L-Lisina y se lava con abundante H₂O miliQ durante otros 5 minutos. Posteriormente se elimina el agua y se dejan secar bien los cristales para su posterior utilización.

Este proceso se realizó en la cabina de flujo laminar vertical, en las condiciones de trabajo expuestas anteriormente.

Separación de las células adherentes

El despegue de las células adherentes del frasco de cultivo, tanto para la realización de pases como para su contaje y ajuste de número para la siembra se ha realizado mecánicamente con ayuda de PBS (*phosphate buffered saline*) en frío.

Contaje en cámara de Neubauer

Es necesario realizar un contaje de las células obtenidas para poder sembrar a una densidad adecuada para el crecimiento y la correcta aplicación de técnicas inmunocitoquímicas.

Para ello se emplea la cámara de Neubauer, instrumento en el que se colocan 10 μL de suspensión celular para medir el número de células presentes en dicho volumen. De este modo se puede determinar la densidad celular de la suspensión de origen. Esta cámara contiene una depresión en el centro de 0,1 mm con una cuadrícula marcada, con dimensiones 3x3 mm. El área marcada con una L en la **Figura 5** se divide en 16 cuadrados de 0,25 mm de lado, correspondiente a 1 mm^2 .

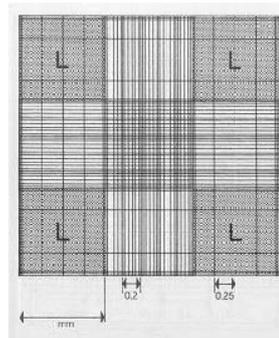


Figura 5. Cámara de Neubauer.

Sobre la cámara se coloca un cubreobjetos, dejando una separación de la superficie de la cámara de 0,1 mm. Por tanto, el volumen entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0,1 mm^3 (0,1 μL), que es lo que vamos a medir.

La suspensión celular obtenida tras la separación del frasco de cultivo se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se resuspende el pellet con 1 mL de medio DMEM y se toman 10 μL para el conteo en la cámara de Neubauer. Tras los cálculos pertinentes, se toma la cantidad adecuada de suspensión celular para sembrar a una densidad de 50000 células por pocillo.

APLICACIÓN DE UN ESTÍMULO PRO-OXIDATIVO

El Paraquat (PQ), debido a su carga (al ser derivado de amonio cuaternario) y a su estructura electrónica conjugada, tiene la propiedad de producir radicales libres que al reaccionar con el oxígeno forman radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. El daño se debe principalmente a la peroxidación lipídica de la membrana y a la disminución del transportador de electrones NADP, originando un exceso de estrés oxidativo que implica la pérdida de permeabilidad de membrana e incluso muerte celular (**Figura 6**).

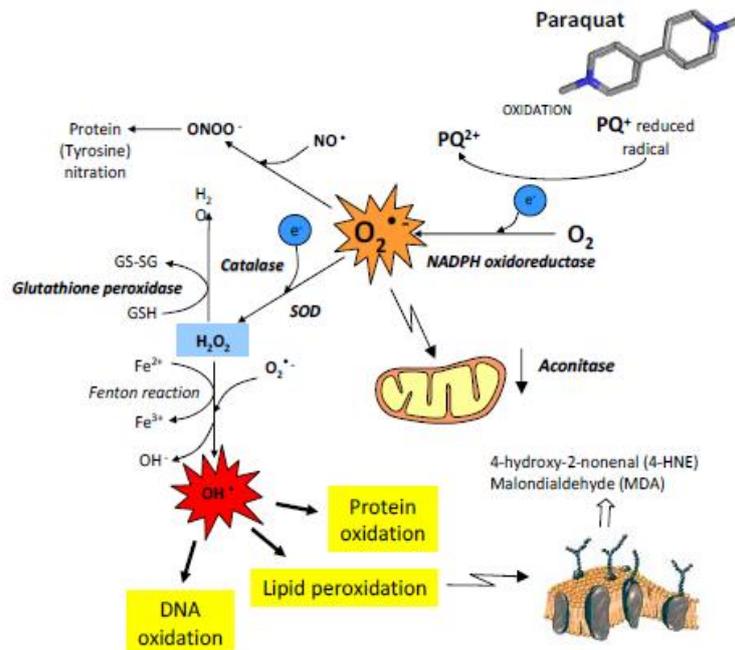


Figura 6. Generación de ROS inducida por PQ en una célula. Reacciones de oxidación-reducción que producen radicales libres y dañan las proteínas, los lípidos y el DNA.

El PQ fue el tratamiento elegido como generador de estrés oxidativo en cultivo por ser un compuesto cuya utilización está estandarizada en el laboratorio para este fin. La concentración utilizada fue 300 µM, añadidos a las 24 horas de la siembra y mantenido durante 24 horas en incubación. Se realizó el experimento por triplicado con su correspondiente control.

INMUNOCITOQUÍMICA

Las técnicas inmunocitoquímicas permiten la detección de antígenos mediante anticuerpos en cultivos celulares fijados, gracias a que el anticuerpo lleva acoplado un marcaje fluorescente detectable mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.

Se llevó a cabo una doble inmunocitoquímica secuencial con anticuerpos específicos recogidos en la **Tabla 2** para la detección de hApoD y la proteína de interés,

| Anticuerpos primarios | Anticuerpos secundarios |
|-----------------------|--------------------------------|
| Rabbit α-HApoD 1:1000 | Goat α-Rabbit Alexa 488 1:1000 |
| Rat α-BSG 1:1000 | Goat α-Rat Alexa 594 1:1000 |

Tabla 2. Lista de anticuerpos empleados

La fijación de las células se llevó a cabo con formaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y agitación después de haber realizado 2 lavados con PBS de 10 min cada uno, con cuidado de que no se despegasen

las células. Transcurrido el tiempo de fijación se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos con PBS para eliminar cualquier resto del fijador.

A continuación, se realiza el bloqueo con una mezcla de PBS y Tween-20 0,1% con GS 1% (suero de cabra no inmunizada) durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución mezcla de PBS y Tween-20 0,1%.

Tras añadir el anticuerpo primario *Rabbit α -hApoD* se mantiene en incubación 12 horas a 4°C y en agitación. Después de haber realizado 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, se añade el anticuerpo secundario *Goat α -Rabbit* permaneciendo 2 horas en incubación a temperatura ambiente. Finalmente se realizan otros 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Al ser una doble inmunocitoquímica, se realiza a continuación el mismo procedimiento de lavados e incubaciones con los anticuerpos primario y secundario dirigidos a la detección de BSG.

Se lleva a cabo un último lavado de los pocillos con H₂O miliQ para evitar la formación de microcristales salinos debidos al PBS en el tiempo de montaje que puedan interferir con la visualización microscópica.

El montaje de las muestras se realizó con medio *EverBrite*-DAPI diluido 1:2 con H₂O miliQ, sellándolas con *CoverGrip* (Biotium).

La observación de las células se realizó en un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una cámara digital DMX 1200c, y con un microscopio confocal DMI 6000B-TCS SP5 (Leica). El procesamiento de las imágenes obtenidas se realizó con el programa informático Fiji-ImageJ.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA LITERATURA

A pesar de la numerosa información sobre las múltiples funciones de ApoD en los distintos tejidos, los artículos generales apenas aportan información sobre la manera en que la proteína atraviesa la membrana plasmática.

Se conoce su presencia tanto en el medio extracelular, unida a diferentes lipoproteínas, como en el medio intracelular en los lisosomas perinucleares. Por tanto, se pone de manifiesto la necesidad de su interacción con alguna estructura de la membrana plasmática, específica o inespecífica, que permita su paso a través de la misma.

Teniendo en cuenta esta premisa, decidimos realizar una revisión sistemática con el objetivo de responder a la pregunta: **¿Con qué estructura receptora interacciona ApoD en la membrana plasmática?**

Tras la lectura y análisis de los 31 artículos seleccionados, 16 apuntan a la presencia de un receptor específico para ApoD, aún sin identificar.

Encontramos evidencias experimentales de la existencia de receptores de membrana específicos para otros miembros de la familia de las Lipocalinas. De hecho, en varios artículos (7) señalan esta circunstancia como una característica de la familia, aunque no todos se hayan identificado actualmente. En la revisión de Flower 2000^(7,27,28) se recogen, por ejemplo, la información relativa a los ligandos y receptores específicos de las Lipocalinas RBP, α -microglobulina, β -lactoglobulina, MUP y OBP (*Odorant Binding Protein*).

La gran mayoría de artículos descarta una internalización general e inespecífica. Eichinger et al 2007⁽⁶⁾ sugiere con sus estudios de cristalización y modelización que la propia estructura terciaria de ApoD, común a las Lipocalinas, facilita la interacción con un receptor transmembrana por la base del barril β , mientras que el bolsillo hidrofóbico quedaría accesible a la unión de ligandos.

Bajo Grañeras et al 2011⁽²⁹⁾, realizó el mismo experimento en dos tipos celulares distintos, ambos sin expresión constitutiva de ApoD, revelando la internalización de hApoD únicamente en uno de ellos y de manera saturable. Estos resultados sugieren que la internalización no se debe a endocitosis inespecífica de proteínas presentes en el medio de cultivo, y es compatible con una endocitosis mediada por receptor. Del mismo modo, la saturación de la endocitosis de ApoD es el hecho clave que remarca Muffat y Walker 2010⁽³⁰⁾.

Asimismo, Pascua-Maestro et al 2017⁽²⁶⁾ detalla que el tráfico de ApoD depende de las vías endocíticas clatrina y caveolina dependientes, para concentrarse en la membrana de los lisosomas especialmente vulnerables al estrés oxidativo.

Únicamente se encuentran 2 artículos sobre la identificación de un potencial receptor transmembrana para ApoD: Liu et al 2001⁽³¹⁾ propone la forma extendida del receptor de leptina (Ob-Rb) y Najyb et al 2015⁽³²⁾ plantea la proteína Basigina (BSG). Ambas propuestas se detallarán posteriormente.

De forma paralela, realizamos una búsqueda en la base de datos STRING tanto de ApoD humana, que es realmente nuestro objetivo; como de ApoD en *Mus musculus*, teniendo en cuenta que es probable que nos aporte más información al ser el principal modelo animal que se utiliza para obtener datos experimentales. Las redes funcionales de asociación de proteínas obtenidas se muestran en la **Figura 7**.

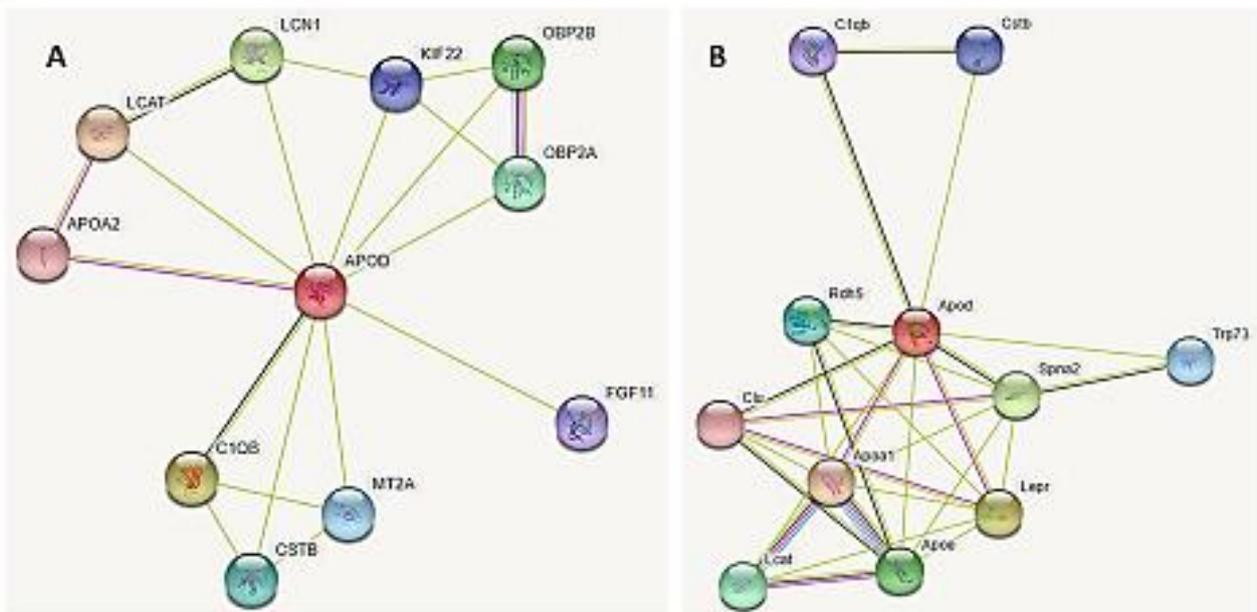


Figura 7. Redes funcionales de asociación de proteínas de ApoD humana (A) y ApoD murina (B).
A: Las proteínas más relacionadas con ApoD son mediante *textmining* (línea de unión amarilla), además de datos experimentales (línea de unión rosa) con ApoA2 y por coexpresión (línea de unión azul oscuro) con C1QB. **B:** Además de por *textmining* (línea de unión amarilla), se observan datos experimentales para ApoA1 y Lepr, y por coexpresión (línea de unión azul oscuro) con C1qb, Clu, Rhd5 y Spna2.

En la primera red podemos observar que los datos que relacionan ApoD humana con otras proteínas son principalmente teóricos, por algoritmos aplicados a datos ya conocidos (*textmining*). Únicamente existen datos experimentales que la relacionen con APOA2 (Apolipoproteína A2), proteína estabilizadora de HDL por su interacción con lípidos.

En la segunda red podemos observar la relación mediante datos experimentales de ApoD murina con otra apolipoproteína, la ApoA1 (Apolipoproteína A1), participante del transporte reverso de colesterol de los tejidos al hígado actuando como cofactor de LCAT. Asimismo, ApoD se relaciona experimentalmente con Lepr (Receptor de leptina) refiriéndose al artículo de Liu et al 2001⁽³¹⁾.

Ob-Rb como posible receptor de ApoD

Liu et al 2001⁽³¹⁾ propone como potencial receptor de ApoD a nivel hipotalámico a la forma extendida del receptor de leptina (Lepr, Ob-Rb), poniendo de manifiesto el papel de ApoD en el control de la homeostasis energética y su relación con la hormona leptina.

Utiliza para su estudio técnicas de *representational difference analysis* (RDA), bioinformática para identificar patrones de sobreexpresión de distintas proteínas en el hipotálamo de ratas con obesidad inducida. Compararon si las proteínas obtenidas interactuaban con Ob-Rb, ya que este receptor se estimula con dietas altas en grasa y controla la ingesta y el peso corporal.

Se hizo un screening de una librería *yeast two-hybrid*, obteniendo coincidencias de sobreexpresión conjunta del receptor investigado y ApoD. Además, se realizó un segundo screening con el dominio citoplasmático de Ob-Rb (Ob-Rbc) de una librería cDNA, encontrando coincidencia con otro fragmento de la zona amino-terminal de ApoD.

A nivel experimental, para confirmar la unión entre ApoD y Ob-Rbc realizó un experimento de LexA *two-hybrid system* e inmunoprecipitación entre ApoD y Lepr.

Propone la siguiente hipótesis (**Figura 8**): la grasa proveniente de la dieta estimula la expresión de ApoD en las neuronas hipotalámicas, así como la producción de leptina. ApoD interaccionaría en el interior celular con el dominio intracelular de Ob-Rb, sufriendo un cambio conformacional y saliendo al espacio extracelular. Allí se uniría a un ligando generado por la interacción de leptina con Lepr. Esta unión ApoD-ligando podría originar señales endocrinas y paracrinas que contribuyan a la regulación de la grasa corporal.

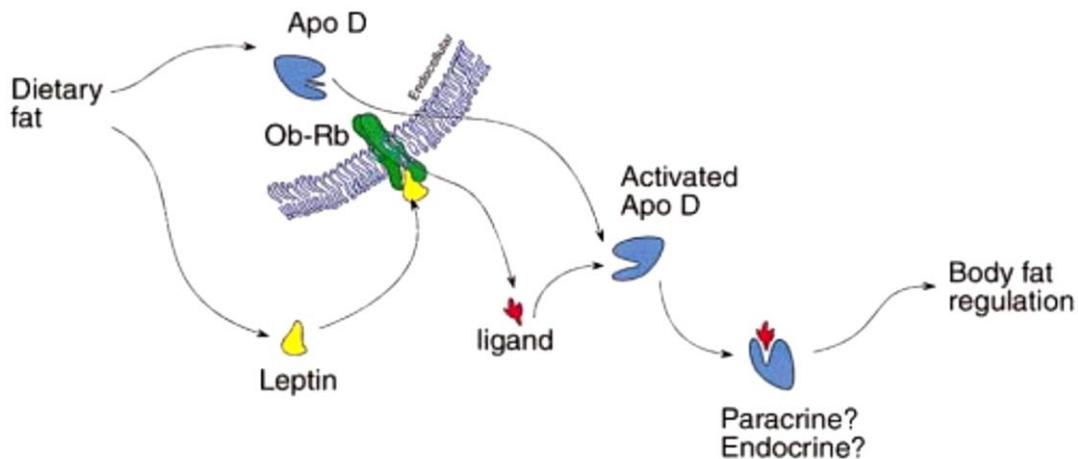


Figura 8. Mecanismo de la interacción de ApoD con Ob-Rb. Extraído de Liu et al 2001.

Tras hacer una lectura crítica del artículo, decido **descartar Ob-Rb** para realizar los posteriores experimentos de inmunocitoquímica debido a las siguientes causas:

- La generalidad de la hipótesis planteada. Como conocemos gracias a la bibliografía existente, ApoD no está aislada en el citosol ya que al internalizarse vía clatrina o caveolina dependiente formará parte de una vesícula de membrana lipídica. Por tanto, ¿Cómo puede interaccionar con Ob-Rb?
- En el caso de que la hipótesis fuera cierta, no explicaría la internalización de ApoD en las células, ya que la interacción es exclusiva con el dominio intracelular de Lepr.
- El artículo se centra en potenciales funciones de ApoD alejadas de la neuroprotección.
- Aunque aparezca en la base STRING (*ver Figura 7B*), ningún otro grupo de trabajo ha anunciado nada referente a la interacción de ApoD con Ob-Rb desde la publicación de este artículo en 2001.

Basigina como posible receptor de ApoD

Najyb et al 2015⁽³²⁾ propone como potencial receptor de ApoD una glicoproteína transmembrana denominada Basigina (BSG), mediante diversos experimentos en líneas celulares HEK293T (células embrionarias de riñón humano) y SH-SY5Y (células de neuroblastoma humanas).

Para la identificación del receptor, diseñó una estrategia para estabilizar la interacción ApoD-receptor mediante partículas magnéticas, lo que permitió su visualización mediante electroforesis SDS-PAGE y su análisis por espectrometría de masas. De las diferentes uniones obtenidas y analizadas, únicamente la correspondiente al complejo covalente de ApoD-BSG cumplía las características de un peso molecular compatible para un potencial receptor. BSG puede presentarse altamente glicosilada (HG-BSG, 45-65 kDa) o con baja glicosilación (LG-BSG, ~32 kDa), siendo LG-BSG la molécula que forma el complejo con ApoD en una banda de 60 kDa.

Sus resultados muestran mediante inmunocitoquímica la colocalización de ApoD con BSG en vesículas intracelulares. Mediante RNAi (RNA de interferencia) específico para BSG comprobó que el silenciamiento de BSG disminuye ampliamente la internalización de ApoD en las células; y la sobreexpresión de BSG incrementa la endocitosis de ApoD. Al emplear Ciclofilina A, un conocido ligando de BSG, la internalización de ApoD disminuye debido a la competición de ambas moléculas por BSG.

BGN, también denominada CD147 o EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*), es una glicoproteína transmembrana que juega un importante papel en el crecimiento, diferenciación, supervivencia y adhesión celular⁽³³⁾. También destaca su papel en el transporte de ácidos monocarboxílicos a través de la membrana plasmática, y es el receptor para la proteína RH5, imprescindible para la infección por *Plasmodium falciparum*. Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tiene dos dominios tipo inmunoglobulina extracelulares.

La forma LG-BSG se considera un precursor de la formación de HG-BSG en el retículo endoplásmico. Mientras que HG-BSG se relaciona con tumorigénesis y la inducción de metaloproteinasas que pueda contribuir a la invasión tumoral, LG-BSG no mantiene estas propiedades⁽³⁴⁾.

Se expresa en diferentes tejidos, incluyendo el sistema nervioso central, especialmente en el hipocampo, córtex y cerebelo. En roedores deficientes en BSG se ha observado defectos a nivel de aprendizaje y memoria. Además, BSG y ApoD podrían tener funciones similares, ya que la expresión de ambos se ha visto incrementada en patologías relacionadas con la inflamación, como aterosclerosis, isquemia, esclerosis múltiple y encefalomiелitis.

Tras la lectura crítica del artículo, decido **seleccionar BSG** como potencial receptor de ApoD y comprobar mediante inmunocitoquímica los resultados existentes en la literatura. Las causas de la selección son las siguientes:

- Los datos experimentales se han comprobado mediante varias vías: por silenciamiento y por bloqueo de BSG con un agonista, obteniendo los mismos resultados.

- La similar distribución tisular y funcional de ApoD y BSG. Aunque en el artículo no se centran en ninguna función concreta, sí que muestran la relevancia del papel neuroprotector de ambas moléculas.
- El artículo se ha publicado recientemente, en 2015, por lo que no hay información disponible de otros grupos de trabajo que corroboren la hipótesis propuesta.

INMUNOCITOQUÍMICA

Diferencia de expresión de hApoD

En primer lugar, se estudian los patrones de expresión de las proteínas de interés, BSG y hApoD en la línea celular 1321N1 (**Figura 9**). Esta línea celular expresa de manera constitutiva ambas proteínas. Ya ha sido descrito en la literatura el incremento de expresión de ApoD tras un estímulo pro-oxidativo *in vitro* como la adición de PQ, de modo que pueda contrarrestar o minimizar el impacto de este en las células. Sin embargo, no se dispone de información adicional sobre BSG en estas condiciones.

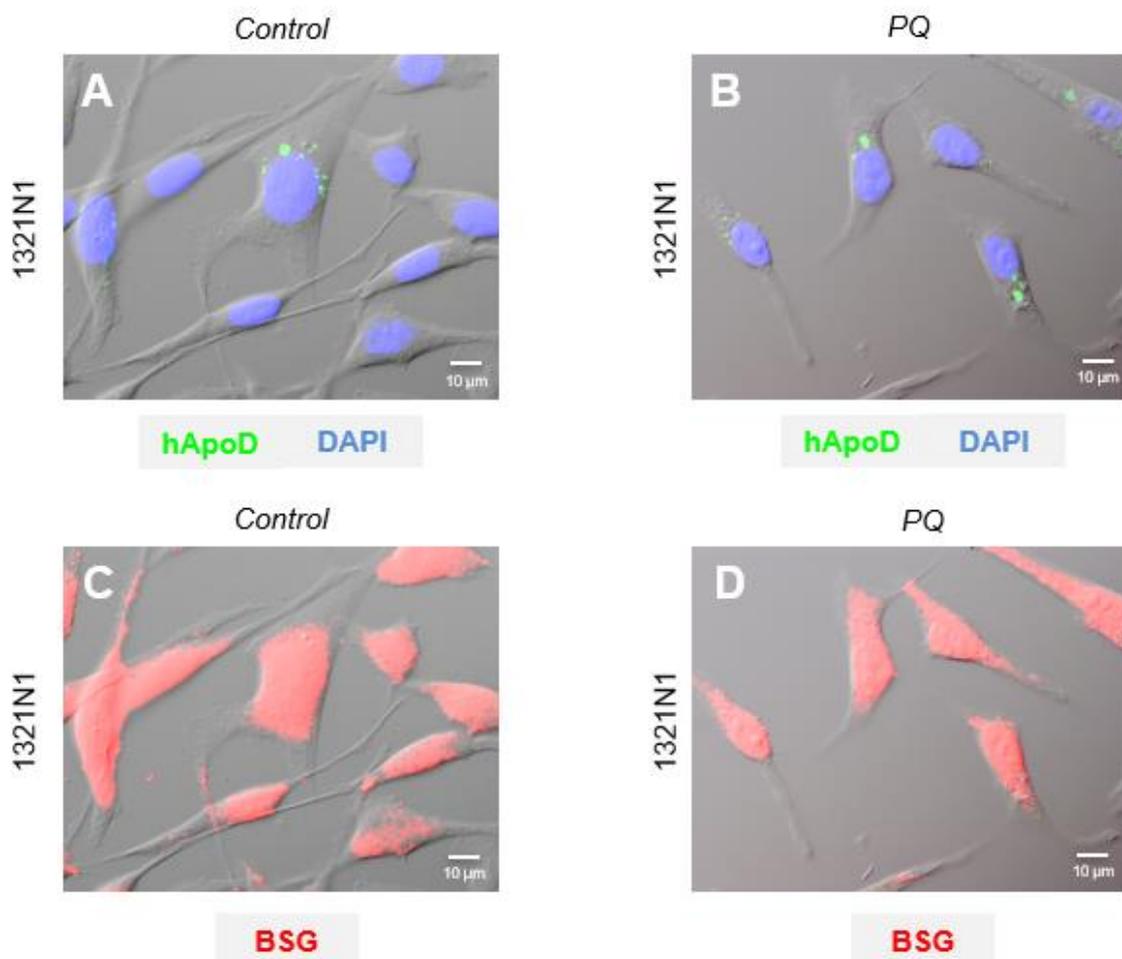


Figura 9. Microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC) de células 1321N1 control (A y C) y tratadas con PQ (B y D). Las fotografías fueron tomadas a 60x. Se observa la superposición de la fluorescencia obtenida con hApoD en verde y BSG en rojo. Los núcleos se revelan con DAPI.

Se puede observar la diferencia de la confluencia celular del cultivo control respecto al tratado con PQ, realizados en las mismas condiciones de medios e incubación. Se puede comprobar el menor número de células y de menor tamaño tras la aplicación del estímulo pro-oxidativo (*ver figura 9B y D*), ya que parte de las células no pudieron contrarrestarlo y entraron en apoptosis.

En cuanto a la expresión de hApoD, se puede observar en alguna célula aislada del cultivo control (*ver Figura 9A*). Sin embargo, en el cultivo tratado con PQ dicha expresión se muestra abundante en todas las células. En ambos casos, se localiza predominantemente en vesículas de la zona perinuclear.

Respecto a la expresión de BSG, no se detectan diferencias entre el cultivo control y el tratado con PQ (*ver Figura 9C-D*). Cabe destacar la moderada eficiencia en el marcaje de esta proteína, ya que ha sido necesario saturar bastante para poder visualizar las imágenes superpuestas con las originales DIC. Se observa una fluorescencia general de membrana, menos intensa en las prolongaciones axonales. A simple vista no se observa BSG en acumulaciones citoplasmáticas.

Localización de BSG y hApoD en situación de estrés oxidativo

Para determinar la posible colocalización de BSG y hApoD se realizó una doble inmunocitoquímica secuencial con anticuerpos específicos en cultivo de células 1321N1 tratadas con PQ, con su correspondiente control.

En la **Figura 10** se muestran las imágenes obtenidas con microscopía óptica, el marcaje individual y la combinación para comprobar si existe colocalización de las proteínas de interés.

Se puede observar un marcaje general y no demasiado intenso de BSG en la membrana plasmática tanto de las células control como de las tratadas con PQ (*ver figura 10 A y D*), concordando con los resultados reflejados en el apartado anterior.

El marcaje de hApoD predomina en la zona perinuclear del citoplasma de las células control y tratadas con PQ, siendo en estas últimas más intenso. En las células tratadas con PQ se puede ver, además, una cierta abundancia en la membrana plasmática de la mayoría de las células (*ver figura 10 B y E*).

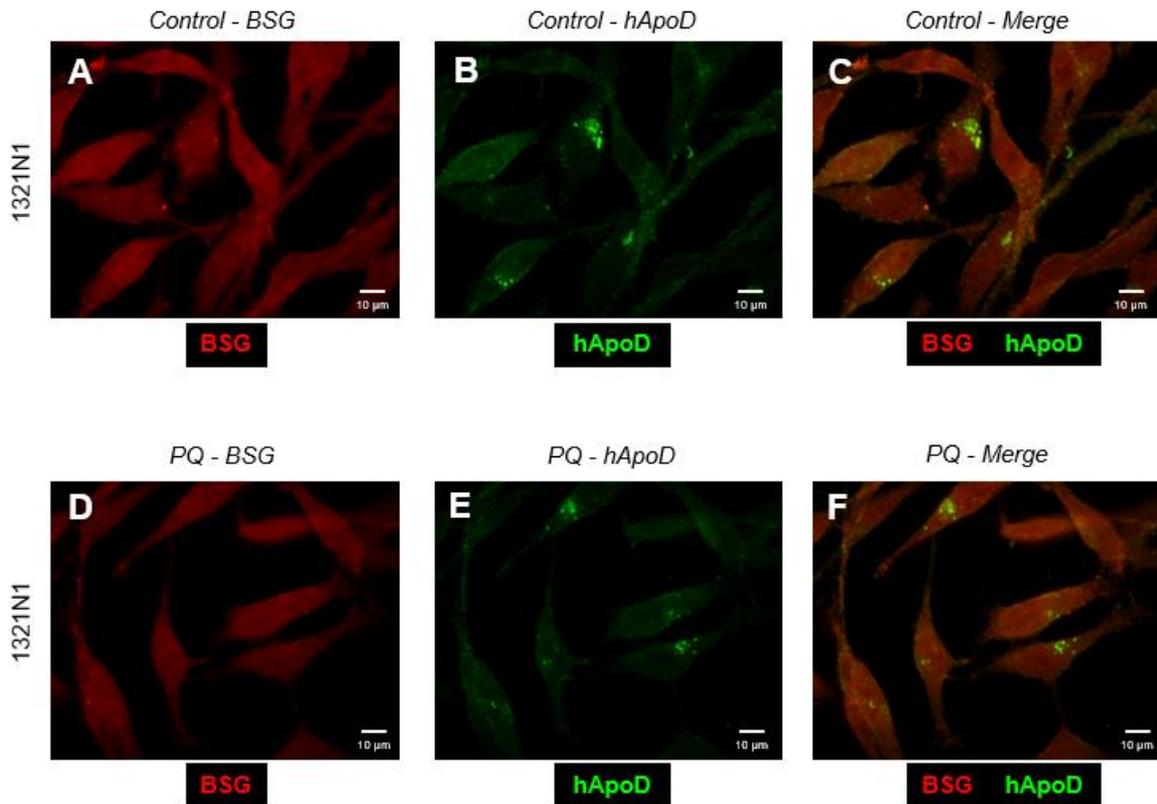


Figura 10. Inmunocitoquímica doble de células 1321N1 control (A-C) y tratadas con PQ (D-F). Las fotografías fueron tomadas a 60x. Se observa el marcaje BSG en rojo y de hApoD en verde. La posible colocalización BSG-hApoD se mostraría en amarillo.

En cuanto a la posible colocalización, se deberían observar zonas amarillas intensas allí donde el marcaje de ambas proteínas coincidiera y se superpusiera. Se puede ver una tenue coloración amarilla respecto a los marcajes individuales en las células control (*ver figura 10C*), algo más intensa en las células tratadas con PQ (*ver figura 10F*). Al comprobar la ubicuidad de BSG en la membrana plasmática y tener todos los planos celulares incorporados en la misma imagen, es lógico apreciar una cierta combinación de colores ya que BSG tapiza toda la superficie celular, por lo que no es posible distinguir una verdadera colocalización con hApoD.

Teniendo en cuenta esta problemática, se decide ver el resultado de la inmunocitoquímica mediante microscopía confocal (**Figura 11**). De este modo, se elimina la sobresaturación de luz y se evita la fluorescencia de diferentes planos de la célula, quedándonos únicamente con un plano focal.

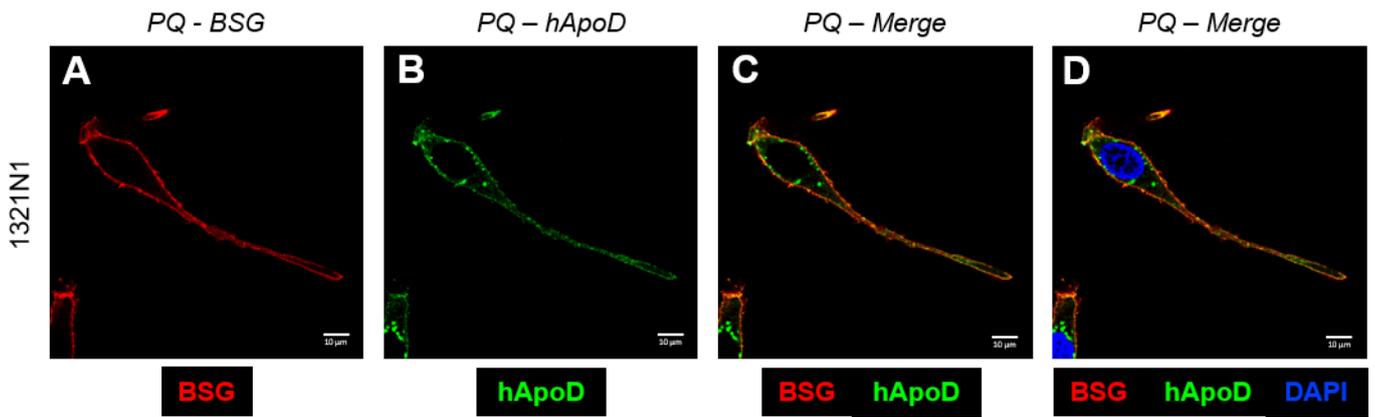


Figura 11. Microscopía confocal de la inmunocitoquímica doble de células 1321N1 tratadas con PQ. Las fotografías fueron tomadas a 60x. Se observa el marcaje BSG en rojo y de hApoD en verde. Los núcleos se revelaron con DAPI. La posible colocalización BSG-hApoD se mostraría en amarillo.

Gracias a la microscopía confocal se observa de una manera mucho más precisa el marcaje de BSG (*ver Figura 11A*). Este se limita a la membrana plasmática de la célula, presentándose de manera ubicua y abundante en la misma con puntos concretos de mayor intensidad a lo largo de la membrana. El marcaje no muestra su presencia en el citoplasma, con lo que podemos intuir que no colocalizará con las vesículas intracelulares que contengan a hApoD.

Sin embargo, la fluorescencia perteneciente al marcaje de hApoD se detecta tanto en la membrana plasmática como en el interior celular (*ver Figura 11B*), corroborando los resultados obtenidos con el microscopio óptico. Los puntos citoplasmáticos se localizan cerca del núcleo (*ver Figura 11D*).

En cuanto a la posible colocalización, se puede observar una franja amarilla perteneciente a la superposición de la fluorescencia que recorre la membrana plasmática (*ver Figura 11C*). Sin embargo, no se aprecia en el interior celular, estando presente únicamente el marcaje de hApoD. Esto implica que BSG no se internalizaría de manera conjunta a hApoD. Además, viendo el marcaje general de BSG en la membrana no podemos afirmar ni siquiera que la colocalización con hApoD en la misma tenga relevancia funcional o que implique una interacción entre ambas proteínas.

Teniendo en cuenta esto, parece complicado pensar que BSG pueda ser el receptor específico de membrana de ApoD.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

ApoD se ha vinculado con el envejecimiento, la neurodegeneración y las lesiones en el sistema nervioso en multitud de estudios. Los trabajos recientes realizados en organismos modelo tan diversos como plantas, moscas o roedores han demostrado que ApoD contribuye de forma significativa a los mecanismos de supervivencia en la lucha contra el estrés oxidativo en diversas situaciones.

En este trabajo nos hemos centrado en el papel neuroprotector de ApoD, conocido desde hace décadas, pero cuyos mecanismos subcelulares no han empezado a identificarse hasta estudios recientes. La gran mayoría de los estudios experimentales centrados en el papel de ApoD en el sistema nervioso han sido realizados con roedores. Teniendo en cuenta las similitudes en la distribución tisular, estructural y la funcionalidad de esta proteína entre roedores y humanos, no cabe duda de que estos modelos animales son particularmente adecuados para extrapolar resultados.

En el presente trabajo se ha empleado una línea de astrocitoma humano. Hemos partido de las premisas de otros trabajos realizados en animales modelo y diferentes líneas celulares para la selección del potencial receptor y las condiciones experimentales. Asumimos las diferencias ya que aunque la estructura de hApoD difiere con la de roedores en, por ejemplo, la presencia de una quinta cisteína desapareada⁽⁴⁾, la estructura terciaria en barril β de hApoD se mantiene en homólogos de otras especies. La interacción con la membrana plasmática se llevaría a cabo por la base de este, mientras que el interior del barril, donde se ubicaría el bolsillo hidrofóbico, quedaría disponible para la unión con pequeños ligandos.

En cuanto al primer objetivo, la realización de la búsqueda bibliográfica orientada a la identificación del receptor transmembrana de ApoD no resultó sencilla. Existen varios grupos de trabajo centrados en caracterizar ApoD, destacando especialmente su papel en el sistema nervioso (del que ya hemos hablado ampliamente) así como su rol emergente en el control del ciclo celular y su relación con tumores. Se ha observado un incremento de expresión de ApoD en la detención de crecimiento y diferenciación celular, y su expresión desciende en condiciones de mayor tasa proliferativa⁽³⁵⁾.

Sin embargo, apenas se le ha dado importancia al mecanismo de internalización de ApoD, bien en situaciones basales o ante el estímulo que provoca la activación de sus funciones. Se conoce su endocitosis vía clatrina o caveolina, predominando la primera⁽²⁶⁾; y en varios estudios mencionan la necesidad de que el potencial receptor sea específico. De los únicos dos trabajos centrados en este tema que han sido publicados, cabe destacar que ambos se centran en la localización de ApoD en el sistema nervioso. Esto resulta llamativo, puesto que esperábamos encontrar también información de su presencia en otros tejidos vinculada con su papel en el cáncer, ya que en cuanto aparece una proteína posiblemente relacionada con este tema su investigación se pone en el punto de mira.

El trabajo de Liu et al 2001⁽³¹⁾ sobre la relación entre ApoD y Ob-Rb fue la primera aproximación publicada sobre un receptor específico de membrana. Ha resultado un artículo complicado a la hora de analizar, ya que el apartado de metodología es bastante escaso y en general dificultoso de valorar debido a las complejas técnicas bioinformáticas empleadas. No podemos esclarecer la calidad de los resultados obtenidos, pero el hecho que tras más de 15 años no haya ningún otro estudio, ni del mismo grupo ni otros, que haya publicado algo al respecto fue determinante para descartar la proteína Ob-Rb como potencial receptor en este trabajo.

En cuanto al artículo publicado de Najyb et al 2015⁽³²⁾ sobre la relación entre ApoD y BSG, a simple vista nos pareció prometedor para nuestro segundo objetivo. En el artículo utilizan diversas técnicas para comprobar la interacción de BSG con ApoD, mediante estudios de *down-regulation* con RNAi y bloqueo de BSG con un conocido ligando. Estas técnicas nos enfocan a un mismo resultado, así como los múltiples aspectos en común entre BSG y ApoD nos decidió a seleccionar BSG como una adecuada proteína candidata.

Sin embargo, somos críticos a la hora de poder llegar a conclusiones sobre la interacción con un único estudio publicado. Así, tampoco se menciona la potencial afinidad de ApoD con BSG, que podría ser crucial, ni el mecanismo de internalización una vez ambas proteínas hayan establecido contacto. Además, BSG no aparece relacionada con ApoD en las redes proteicas funcionales de STRING. Esto puede ser debido a la reciente publicación del artículo ya que no encontramos información sobre la frecuencia con la que actualizan dicha base de datos.

Con estas incógnitas en mente, se lleva a cabo el tercer objetivo mediante una doble Inmunoquímica secuencial con anticuerpos específicos para BSG y hApoD. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada y está optimizada para el marcaje de hApoD. Sin embargo, el marcaje de BSG ha sido más dificultoso, ya que era más tenue y generalizado, y ha resultado complicado extraer conclusiones hasta utilizar la microscopía confocal.

Las imágenes obtenidas con la microscopía DIC, en el que se aprecia a disminución del número de células y los cambios en su morfología (*ver Figura 9*) nos hacen pensar que la aplicación del estímulo pro-oxidativo fue exitosa. Se intentó ajustar la concentración de PQ para aplicar un moderado estímulo oxidativo, que no fuera tan potente como para llevar a las células a la muerte, pero lo suficiente para que ApoD entrara en funcionamiento y aumentase su expresión. Sin embargo, no se pudo evitar perder parte de la viabilidad celular, aunque no parece que haya afectado a la eficacia de la inmunocitoquímica.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica convencional no nos aportaron la información que creíamos (*ver Figura 10*). Debido al marcaje general de BSG en la membrana plasmática, la superposición con la fluorescencia perteneciente a hApoD originó una imagen poco limpia con un leve tono amarillo. Esperábamos ver un intenso amarillo en los puntos de la membrana donde ApoD fuera abundante que implicaría una clara colocalización, algo imprescindible para una posible interacción. Tampoco se observa en el interior celular, allí donde hApoD se encuentra en vesículas y membrana lisosomal en el caso de situación de estrés oxidativo.

Respecto a lo que se conoce sobre la endocitosis de ApoD, la proteína se internalizaría junto con su receptor, englobándose en una invaginación de la membrana plasmática que acabaría por desprenderse para incorporarse al citoplasma. Se ha relacionado a ApoD con las vías de endocitosis clatrina y caveolina dependientes.

La primera de ellas es la más abundante y se relaciona con funciones imprescindibles como la homeostasis y comunicación intracelular. La vía de la caveolina se ha descrito más recientemente, y es particularmente abundante en el sistema nervioso. Las caveolas son vesículas más densas recubiertas de Caveolina-1, cuyo papel resulta esencial en la transducción de señales, la homeostasis del colesterol, siendo la principal alternativa a la clatrina en el transporte de vesículas⁽³⁶⁾.

Debido a este procedimiento de internalización, parece lógico pensar que si BSG es el receptor específico de ApoD se endocite formando parte de las mismas vesículas, por lo que mostraría colocalización en el citoplasma en los resultados de la inmunocitoquímica. Para ello, tuvimos la precaución de permeabilizar la célula a la hora de realizar el bloqueo previo a la adición de los anticuerpos, de modo que el marcaje pudiera atravesar la barrera que supone la membrana plasmática intacta.

Estos resultados de falta de colocalización citoplasmática se ven mucho más claros al emplear la microscopía confocal (*ver Figura 11*). Al seleccionar un único plano focal, se elimina la fluorescencia residual del resto de la célula y observamos nítidamente la ausencia de BSG citoplasmática.

Basándonos en los resultados obtenidos, en nuestro *cuarto objetivo* no compartimos las conclusiones detalladas en el artículo de Najyb et al 2015⁽³²⁾ sobre la necesidad de interacción entre BSG y ApoD para la internalización de esta última.

A priori BSG era una buena proteína candidata por sus puntos en común con ApoD, su localización transmembrana y la estructura de su forma menos glicosilada. Sin embargo, al profundizar en los mecanismos conocidos de internalización de BSG encontramos evidencias de que se endocita y recicla por una vía clatrina-independiente^(37,38). Teniendo en cuenta que se conoce la dependencia, al menos parcial, de ApoD por la vía de la clatrina esto sugiere que BSG no puede ser el único receptor específico, necesario y suficiente, para la internalización de ApoD.

Aunque nuestros resultados preliminares no parezcan ir en consonancia con el artículo mencionado, es necesario llevar a cabo más estudios experimentales para poder concluir la posible relación entre BSG y ApoD.

Una aproximación experimental que podría aportar datos relevantes en esta cuestión sería la realización de experimentos de captación y expresión de ApoD en modelos animales BSG-KO (*knock-out*), más fiables e irrefutables que únicamente el silenciamiento de la proteína vía RNAi. También convendría poder aislar el complejo BSG-ApoD mediante coprecipitación de proteínas.

Asimismo, no se conoce demasiado sobre el mecanismo de transducción de la señal intracelular de ApoD, aunque sí se ha relacionado con las vías de señalización MAPK (*Mitogen Activated Protein kinases*), concretamente las JNK (*c-JUN-N-terminal kinases*)⁽²⁹⁾. Profundizar en este campo podría aportar nuevas perspectivas y ampliar el campo de acción al permitir relacionar a ApoD con otras potenciales proteínas receptoras de membrana, no tenidas en cuenta por el momento.

Mientras tanto, el potencial receptor específico de ApoD sigue siendo un misterio sin resolver.

CONCLUSIONES

- Las diversas funciones de ApoD han sido ampliamente estudiadas, particularmente la correspondiente al sistema nervioso. Destaca el papel neuroprotector de esta proteína.
- El estrés oxidativo es el principal estímulo para la sobreexpresión y actuación de ApoD. Su presencia es mucho más abundante en el citoplasma de los astrocitos sometidos a la acción de PQ.
- Existe poca información disponible sobre el posible receptor específico de ApoD en la membrana plasmática, aunque sí parece haber consenso en que su internalización no se debe a fagocitosis o endocitosis inespecífica.
- La proteína seleccionada como candidata a ser el receptor específico de hApoD no muestra colocalización con hApoD en el interior celular en situación basal ni en estrés oxidativo.
- Esto nos hace pensar que BSG no es el receptor específico, necesario y suficiente para la endocitosis de hApoD. Sin embargo, no podemos descartar una relación parcial con la misma, ya que la ubicuidad de BSG en la membrana plasmática podría permitir un encuentro BSG-ApoD en el mismo espacio y período de tiempo.
- Son necesarios más estudios para esclarecer el receptor específico de ApoD, cuya aplicabilidad futura a la clínica está fuera de toda duda.

BIBLIOGRAFÍA

1. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: A new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Letters*. 1 de diciembre de 1973;37(2):178-82.
2. Sánchez D, Ganfornina MD, Gutiérrez G, Marín A. Exon-Intron Structure and Evolution of the Lipocalin Gene Family. *Mol Biol Evol*. 1 de mayo de 2003;20(5):775-83.
3. Drayna D, Fielding C, McLean J, Baer B, Castro G, Chen E, et al. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem*. 15 de diciembre de 1986;261(35):16535-9.
4. Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, et al. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta*. 18 de octubre de 2000;1482(1-2):185-98.
5. A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. [Internet]. [citado 20 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC39076/>
6. Eichinger A, Nasreen A, Kim HJ, Skerra A. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem*. 19 de octubre de 2007;282(42):31068-75.
7. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*. 15 de agosto de 1996;318 (Pt 1):1-14.
8. Provost PR, Weech PK, Tremblay NM, Marcel YL, Rassart E. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J Lipid Res*. noviembre de 1990;31(11):2057-65.
9. Smith KM, Lawn RM, Wilcox JN. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J Lipid Res*. junio de 1990;31(6):995-1004.
10. Pérez C, Navarro A, Martínez E, Ordóñez C, Del Valle E, Tolivia J. Age-related changes of apolipoprotein D expression in female rat central nervous system with chronic estradiol treatment. *Age (Dordr)*. agosto de 2012;34(4):895-904.
11. del Valle E, Navarro A, Astudillo A, Tolivia J. Apolipoprotein D Expression in Human Brain Reactive Astrocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. octubre de 2003;51(10):1285-90.
12. Boyles JK, Notterpek LM, Anderson LJ. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*. 15 de octubre de 1990;265(29):17805-15.
13. Ganfornina MD, Do Carmo S, Martínez E, Tolivia J, Navarro A, Rassart E, et al. ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia*. 15 de agosto de 2010;58(11):1320-34.
14. Navarro A, del Valle E, Juárez A, Martínez E, Ordóñez C, Astudillo A, et al. Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *Age (Dordr)*. marzo de 2010;32(1):85-96.

15. Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, et al. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS ONE*. 2 de octubre de 2008;3(10):e3329.
16. Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, et al. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem*. octubre de 1998;71(4):1643-50.
17. Thomas EA, Laws SM, Sutcliffe JG, Harper C, Dean B, McClean C, et al. Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol Psychiatry*. 15 de julio de 2003;54(2):136-41.
18. Ordoñez C, Navarro A, Perez C, Astudillo A, Martínez E, Tolivia J. Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol Histopathol*. 2006;21(4):361-6.
19. Thomas EA, Dean B, Pavey G, Sutcliffe JG. Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 27 de marzo de 2001;98(7):4066-71.
20. Suresh S, Yan Z, Patel RC, Patel YC, Patel SC. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem*. enero de 1998;70(1):242-51.
21. Reindl M, Knipping G, Wicher I, Dilitz E, Egg R, Deisenhammer F, et al. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1 de octubre de 2001;119(2):327-32.
22. Jin S, Zhou F, Katirai F, Li P-L. Lipid Raft Redox Signaling: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 15 de agosto de 2011;15(4):1043-83.
23. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*. 2010;2:12.
24. Sanchez D, López-Arias B, Torroja L, Canal I, Wang X, Bastiani MJ, et al. Loss of glial lazarrillo, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol*. 4 de abril de 2006;16(7):680-6.
25. Hull-Thompson J, Muffat J, Sanchez D, Walker DW, Benzer S, Ganfornina MD, et al. Control of Metabolic Homeostasis by Stress Signaling Is Mediated by the Lipocalin NLaz. Rulifson E, editor. *PLoS Genetics*. 24 de abril de 2009;5(4):e1000460.
26. 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 Genetics*. 9 de febrero de 2017;13(2):e1006603.
27. Flower DR, North ACT, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 18 de octubre de 2000;1482(1):9-24.
28. Flower DR. The lipocalin protein family: A role in cell regulation. *FEBS Letters*. 31 de octubre de 1994;354(1):7-11.

29. Bajo-Grañeras R, Ganfornina MD, Martín-Tejedor E, Sanchez D. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia*. octubre de 2011;59(10):1551-66.
30. Muffat J, Walker DW. Apolipoprotein D: An overview of its role in aging and age-related diseases. *Cell Cycle*. 15 de enero de 2010;9(2):269-73.
31. Liu Z, Chang G-Q, Leibowitz SF. Apolipoprotein D interacts with the long-form leptin receptor: a hypothalamic function in the control of energy homeostasis. *The FASEB Journal*. mayo de 2001;15(7):1329-31.
32. Najyb O, Brissette L, Rassart E. Apolipoprotein D Internalization Is a Basigin-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 26 de junio de 2015;290(26):16077-87.
33. Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol*. 2003;18(3):981-7.
34. Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 Function, Glycosylation, and Caveolin-1. *Mol Biol Cell*. septiembre de 2004;15(9):4043-50.
35. 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 USA*. 13 de mayo de 2008;105(19):7088-93.
36. Schnitzer JE. Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*. 28 de julio de 2001;49(3):265-80.
37. Eyster CA, Higginson JD, Huebner R, Porat-Shliom N, Weigert R, Wu WW, et al. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic*. mayo de 2009;10(5):590-9.
38. Maldonado-Báez L, Cole NB, Krämer H, Donaldson JG. Microtubule-dependent endosomal sorting of clathrin-independent cargo by Hook1. *J Cell Biol*. 15 de abril de 2013;201(2):233-47.