



**FACULTAD
DE MEDICINA**

IBGM
INSTITUTO DE BIOLÓGIA
Y GENÉTICA MOLECULAR



Universidad de Valladolid

Trabajo de Fin de Grado:

PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN LA FAGOCITOSIS DE LA MIELINA POR LAS CÉLULAS MICROGLIALES.

David Sardonís Camarero

Curso 2019 - 2020

Tutorizado por:
Diego Sánchez Romero
M^a Dolores Ganfornina Álvarez

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Microglía.....	2
Apolipoproteína D.....	4
ApoD y desmielinización en SNP.....	5
ApoD y desmielinización en SNC.....	5
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
1. Revisión bibliográfica.....	6
2. Obtención, cuantificación y marcaje de mielina.....	7
3. Cultivo de la línea celular BV2.....	8
4. Ensayos de fagocitosis de mielina: Curso temporal.....	9
5. Estudio del efecto de ApoD sobre la fagocitosis de mielina por la microglía.....	9
6. Procesado y análisis de imagen.....	10
7. Representación gráfica y análisis estadístico.....	10
RESULTADOS.....	10
1. Ensayo de fagocitosis de mielina a diferentes tiempos.....	10
2. Comprobación de la interiorización de la mielina por las células BV2.....	12
3. Ensayo de la fagocitosis de mielina en presencia de ApoD.....	12
4. Estudio de la fagocitosis de mielina y adición de ApoD en células individuales.....	13
5. Análisis de las partículas de mielina en células individualizadas.....	14
DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIONES.....	16
BIBLIOGRAFÍA.....	17

RESUMEN

Los residuos de mielina que se generan tras una lesión desmielinizante en el Sistema Nervioso interfieren con el proceso de remielinización y reparación axonal, por lo que su aclaramiento es esencial para el restablecimiento de la homeostasis tisular. Este aclaramiento se lleva a cabo mediante la fagocitosis por parte de la microglía, células inmunitarias del SNC. Por otra parte, la lipocalina ApoD tiene una función protectora ante diversas patologías neurodegenerativas, incluyendo las desmielinizantes, y se ha demostrado su implicación en la fagocitosis de residuos de mielina en el SNP. En este trabajo experimental, se han realizado ensayos de fagocitosis de mielina con la línea de microglía murina BV2, y se ha estudiado el efecto de la adición exógena de ApoD durante dicha fagocitosis. Se ha comprobado que la mielina ApoD-KO es fagocitada con mayor avidez que la mielina WT. Además, la adición exógena de ApoD estimula de forma significativa la fagocitosis de los residuos de mielina ApoD-KO.

Palabras clave: *Apolipoproteína D, Microglía, Fagocitosis, Mielina*

INTRODUCCIÓN

La mielina es la envoltura membranosa que rodea los axones de ciertas neuronas tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) para permitir una conducción más rápida y eficiente del potencial de acción mediante el fenómeno de la conducción saltatoria. Ciertas lesiones de etiología traumática o tóxica, así como enfermedades autoinmunes, infecciosas, isquémicas, metabólicas o neurodegenerativas llevan a la desmielinización con el subsecuente daño axonal y pérdida de la función fisiológica de la transmisión del potencial de acción.

Las distintas células gliales que forman parte del SN interactúan entre sí mediante diversas moléculas mediadoras con el fin de reparar el daño local de dicha lesión (1). Se ha observado que el ambiente proinflamatorio y la liberación de moléculas inhibitorias que aparece tras la ruptura de la mielina puede dificultar el proceso posterior de regeneración axonal (2,3) y remielinización (4). Por ello, es fundamental la correcta eliminación de todos los residuos de mielina de la zona dañada a través de la fagocitosis.

Microglía.

La microglía fue identificada y nombrada por primera vez en 1919 por Pío del Río Hortega, quien estudió y predijo múltiples funciones de este tipo celular que se han ido corroborando en estudios posteriores (5,6). La microglía está constituida por células inmunitarias que residen en el SNC, al cual migran durante el desarrollo embrionario, y tal y como ya describió Río Hortega, sus funciones principales son la proliferación, migración y fagocitosis (5). En definitiva, la microglía es el tipo celular responsable de responder a las lesiones del parénquima cerebral.

En el caso concreto de una lesión desmielinizante, la microglía juega un papel fundamental en el proceso de regeneración por varios motivos (revisado por 7). De forma análoga a los macrófagos de otros tejidos, en los últimos años diversos autores han comenzado a diferenciar dos estados de actividad de la microglía, denominados M1 y M2, cada uno de ellos con un patrón diferente de expresión génica y distintas funciones (8). Se ha comprobado que la microglía en estado M2, generalmente asociado a un patrón antiinflamatorio, promueve la diferenciación de los oligodendrocitos a través de la Activin-A durante el proceso de remielinización en el SNC (9). Otras moléculas expresadas por la microglía que favorecen la regeneración son los factores de crecimiento IGF-1 y FGF-2, expresadas tras la activación de la microglía por una vía antiinflamatoria (10). Por el contrario, se ha comprobado que la activación de la microglía por la vía proinflamatoria del IFN-1 resulta deletérea para la regeneración tras una lesión de la

sustancia blanca en el SNC (11). Frente a esta polarización, algunos autores han propuesto que los distintos estados de la microglía forman parte de un espectro en el que el patrón de expresión génica va variando conforme evoluciona la lesión desmielinizante (8). Otros autores van más allá llegando a negar la existencia tanto de la polarización dicotómica M1/M2 como del espectro continuo entre ambos estados, proponiendo una mayor complejidad en cuanto a los distintos estados de la microglía (12). En cualquier caso, parece claro que no existe un patrón único de expresión génica por parte de la microglía, y algunos de estos patrones serían beneficiosos para la remielinización y la regeneración axonal.

Además de propiciar un ambiente antiinflamatorio y liberar mediadores, el papel más destacado de la microglía ante un proceso de desmielinización es la fagocitosis y aclaramiento de los residuos de mielina (7,10,13), los cuales, como se explicó anteriormente, imposibilitan la reparación. Para que dicha fagocitosis se lleve a cabo, los astrocitos deben activar a la microglía a través de la quimiocina CXCL10 (14).

En un estudio *in vivo* de la expresión génica de la microglía durante el proceso de desmielinización generada por administración de cuprizona y la posterior remielinización, se comprobó que existía un único fenotipo de la célula glial cuyo patrón de expresión de distintos grupos de genes iba cambiando a lo largo de este proceso (15). En concreto, se observó que, tras la fagocitosis de los residuos de mielina, se producía un aumento de la expresión de genes relacionados con el reciclaje lipídico, destacando la apolipoproteína E y la lipoproteína lipasa, por lo que se propuso que la microglía pudiese reciclar el colesterol y otras moléculas lipídicas para que volviesen a estar disponibles para la oligodendroglía. En otro estudio (16), se describe una técnica de microscopía electrónica, “*serial block-face scanning electron microscopy*”, con la que se pudo observar *in vivo* cómo la microglía activada fagocitaba los residuos de mielina en esclerosis múltiple (EM) .

Se han propuesto y estudiado diversos receptores de la microglía implicados en la fagocitosis de residuos de mielina. La fagocitosis microglial mediada por la vía de Trem2 propicia una respuesta antiinflamatoria en la que se favorece la regeneración (10), mientras que en animales Trem2-KO se observó una respuesta con liberación de citocinas proinflamatorias (17). En otro estudio con ratones Trem2-KO se observó la incapacidad para la fagocitosis de residuos de mielina tras la administración de cuprizona (18).

En una revisión (19) de los receptores microgliales implicados en la fagocitosis de diversas sustancias, se recogieron como receptores de residuos miélinicos CR3, SIRP α , SIRP β 1, Fc γ RI y SR-A. Se ha comprobado que los residuos de mielina son capaces de

interferir con el receptor SIRP α mediante la molécula CD47 de la mielina, dificultando así su propio aclaramiento (3).

Apolipoproteína D.

La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las lipocalinas. Se han descrito múltiples ligandos para ApoD, así como múltiples funciones de entre las que destacan su papel neuroprotector, la regulación en el tráfico de lípidos, la respuesta ante estrés oxidativo y su actividad antiinflamatoria (20, revisado por 21).

Se ha demostrado que la función de ApoD como molécula protectora ante el estrés oxidativo en neuronas y células gliales se debe a la estabilización de las membranas lisosomales de estos grupos celulares (22).

Por su parte, la actividad antiinflamatoria de ApoD se ha relacionado fundamentalmente con el ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas, el cual es el ligando que se une con mayor afinidad a esta lipocalina (23). Varios autores han propuesto que el efecto antiinflamatorio de ApoD en el SN podría deberse a su capacidad para estabilizar el ácido araquidónico en la membrana celular, limitando así la síntesis de biomoléculas proinflamatorias (revisado por 21).

Además, esta actividad antiinflamatoria ha sido estudiada *in vivo* con un modelo murino de encefalitis, provocada mediante una inyección intracerebral del coronavirus OC43 (24). Los ratones transgénicos que sobreexpresaban ApoD humana a los que se les inoculó este virus, tuvieron una mayor tasa de supervivencia y redujeron sus niveles de inflamación (25). Además, se encontró una correlación topográfica y temporal entre la infección vírica, la expresión de ApoD, la activación de la microglía y la astrogliosis. Esta modulación que ApoD ejerce sobre la microglía en enfermedades inflamatorias del SNC también ha sido confirmada en diversos ensayos por microarrays (26).

En cuanto a la homeostasis de la mielina, el correcto funcionamiento de ApoD juega un importante papel durante la mielinización tanto en el SNP como en el SNC, al posibilitar la compactación extracelular de las capas contiguas de mielina. Este control sobre la compactación de la mielina se debe al correcto mantenimiento de las membranas lisosomales de las que ApoD forma parte, lo que posibilita la acción de las sialidasas, encargadas de la eliminación de residuos siálicos del glicocálix hidrofílico en la membrana de dicha mielina (27).

ApoD y desmielinización en SNP.

En un trabajo anterior de nuestro grupo, se estudió el papel regulador de ApoD en la fagocitosis y la actividad mielínolítica de los macrófagos activados tras una lesión del SNP, concretamente en el nervio ciático de ratón. Se demostró que ApoD intervenía en los procesos de síntesis y mantenimiento de la mielina, así como en la fagocitosis macrófagica de la misma tras una desmielinización, y en la modulación de la respuesta inflamatoria en nervio periférico (28). En el SNP, tras una degeneración Walleriana del nervio ciático, se comprobó que tanto los macrófagos de ratones silvestres (WT) como aquellos provenientes de ratones que no expresaban ApoD (ApoD-KO) tenían una menor avidez por la mielina ApoD-KO que la WT (29).

ApoD y desmielinización en SNC.

En cuanto al SNC, encontramos que la EM constituye un ejemplo paradigmático, ampliamente estudiado, de lesiones desmielinizantes.

Se ha comprobado que existe un aumento significativo en la producción intratecal de ApoD en pacientes con EM, que es especialmente elevado durante los primeros brotes de la enfermedad, cuando el SNC aún tiene capacidad para llevar a cabo la remielinización (30). No obstante, diferentes estudios proteómicos posteriores en los que se analizó el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM y sujetos control, arrojaron resultados contradictorios en cuanto a si ApoD se encuentra aumentada (31) o disminuida (32), por lo que se ha sugerido que el patrón de expresión de ApoD es variable en el transcurso de la enfermedad.

En este sentido, un estudio histopatológico de placas desmielinizantes en diferentes fases de pacientes con EM (33), reveló una disminución global de la señal de ApoD en las lesiones desmielinizantes respecto al tejido sano, teniendo las lesiones en fase de remielinización un marcaje significativamente mayor que las lesiones caracterizadas como activas e inactivas. Además, se observó un patrón de colocalización entre la mielina y ApoD, mayoritariamente debido a la presencia de esta última en una subpoblación de oligodendrocitos. Dicho patrón de co-localización era especialmente abundante en las áreas de remielinización, lo cual apoya la idea de que ApoD podría estar implicada en el control de la remielinización espontánea tras una lesión desmielinizante. Asimismo, se describió marcaje de ApoD en astrocitos reactivos y células macrófagicas en los bordes de las placas activas.

En un trabajo anterior de nuestro grupo (22) se estudió la funcionalidad de la ApoD endógena de astrocitos que fagocitaban residuos de mielina. Se comprobó que los

astrocitos ApoD-KO tendían a acumular en su citoplasma partículas de mielina de mayor tamaño y durante más tiempo que los astrocitos WT. Estas diferencias se explican por la alteración del pH lisosomal, que no es lo suficientemente ácido en los astrocitos que no expresan ApoD.

Cabe señalar que, a diferencia de los astrocitos en los que se ha comprobado ampliamente la expresión endógena de ApoD (34–36), hasta ahora ningún estudio de proteómica (37) ni de transcriptómica (38,39) ha conseguido demostrar que la microglía exprese ApoD. Por el contrario, investigaciones previas de nuestro laboratorio han evidenciado que la microglía endocita moléculas de ApoD desde el medio extracelular (40).

Si bien todos estos antecedentes parecen indicar que tanto ApoD como la microglía juegan un papel esencial en el aclaramiento de la mielina durante una lesión desmielinizante, no se ha estudiado de forma específica la relación entre ApoD y la microglía, así como su efecto durante el proceso de fagocitosis. Con este trabajo se pretende evaluar de forma conjunta la función de estos dos actores del proceso de remielinización, y esclarecer si existe alguna interacción entre ambos.

OBJETIVOS

1. Estudiar si existen diferencias *in vitro* en la fagocitosis microglial de mielinas provenientes de organismos WT y ApoD-KO.
2. Estudiar si el pre-tratamiento con ApoD modifica dicha fagocitosis.
3. Identificar y cuantificar las variables relevantes que pudiesen sugerir una hipótesis sobre el origen de las diferencias encontradas si las hubiese.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Revisión bibliográfica.

La búsqueda bibliográfica se realizó en la base de datos MEDLINE empleando el buscador PubMed. Se realizó una primera fase de búsqueda inicial con el fin de obtener una aproximación al estado del arte acerca del tema del presente trabajo.

Para realizar la búsqueda avanzada, se emplearon los operadores booleanos y los filtros de búsqueda descritos a continuación junto con variaciones de los tres conceptos clave de este trabajo: ApoD, mielina y microglía.

Parámetro de búsqueda	Filtros aplicados	Resultados
(Apolipoprotein D) OR (ApoD)	-	782
	“Últimos 10 años” y “Review”	14*
((Apolipoprotein D) OR (ApoD)) AND (myelin (demyelination) AND ((Apolipoprotein D) OR (ApoD)))	-	14*
	-	6*
((remyelination[Title/Abstract]) AND (microglia[Title/Abstract]))	“Últimos 10 años” y “Review”	76*
	-	54
(microglia[Title/Abstract]) AND (myelin phagocytosis[Title/Abstract])	“Últimos 10 años”	25*
	“Últimos 10 años” y “Review”	3*
	-	86
(microglia[Title/Abstract]) AND (“myelin debris”[Title/Abstract])	-	86
	“Últimos 10 años” y “Review”	17*
((Apolipoprotein D) OR (ApoD)) AND (Microglia)	-	6*

Tabla 1

Se estudió la adecuación al tema de los artículos encontrados con los parámetros de búsqueda marcados con un asterisco (*) en la Tabla 1 mediante la lectura de su título y Abstract, y finalmente se seleccionaron 24 artículos para su lectura completa.

Posteriormente, se llevó a cabo una segunda fase de búsqueda basada en la bibliografía relevante de los artículos anteriores o búsquedas específicas para completar la información presentada. Se empleó el gestor bibliográfico Zotero.

2. Obtención, cuantificación y marcaje de mielina.

Se hizo un cruce de ratones heterocigotos WT/ApoD-KO procedentes de una línea de ratones generada por nuestro grupo anteriormente (41). Se genotipó la descendencia por PCR (Anexos, Figura A1A-E) para seleccionar ratones WT y ApoD-KO, de los que se extrajo el cerebro para la obtención de mielinas (Anexos, Figura A1F-I).

Los cerebros fueron procesados siguiendo el protocolo modificado de Norton (42) para la extracción de mielina mediante centrifugación en un gradiente de sacarosa y su posterior purificación.

Se homogeneizó cada cerebro con un homogeneizador en tampón TED (Tris-HCl (20 mM), EDTA (1 mM), DTT (1 mM) y *cocktail* de inhibidores de proteasas (AEBSF)) con 0.3 M sacarosa. Se rellenó hasta la mitad de su capacidad tubos de ultracentrífuga con tampón TED 0.83 M sacarosa, y se enrasó la otra mitad con el homogeneizado. Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 75000 g (4°C) con aceleración y deceleración máximas. Se recogió la interfase de mielina con una pipeta Pasteur obteniéndose unos 4 ml por cerebro procesado.

Las mielinas obtenidas se sometieron a un proceso de purificación mediante 3 ciclos sucesivos de dilución en tampón TED sin sacarosa, homogenización, centrifugado, aspiración del sobrenadante y resuspensión del pellet de mielina.

Tras la última centrifugación, el pellet de mielina de cada cerebro procesado se resuspendió en 200 µl de PBS estéril y se almacenó a -20°C.

Se llevó a cabo una cuantificación de proteína total con el método del ácido bicinónico (BCA; Pierce) empleando un tampón 2% SDS para las disoluciones y la curva patrón.

Para el marcaje con el colorante fluorescente Dil (indocarbocianina; PubChem CID 5706735; Sigma) se incubaron 1 mg/ml de cada tipo de mielina con Dil en DMSO (12.5 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C, y se volvió a ultra-centrifugar la mielina para retirar el colorante no unido. El pellet de mielina marcada se resuspendió con PBS para obtener una preparación de trabajo a 1 mg/ml.

Finalmente, se comprobó que la intensidad de marcaje de las mielinas WT y ApoD-KO fuese equivalente mediante fluorimetría (Exc 545 nm / Em 490-600 nm).

3. Cultivo de la línea celular BV2.

Para estudiar la fagocitosis de mielina se empleó la línea celular BV2, constituida por microglía inmortalizada de origen murino (43). Esquema en Anexos, Figura A2A-E.

Se descongeló un Criovial conservado a -196°C con una concentración de 10^6 células BV2 en 1ml de suero bovino fetal (FBS) con 10% DMSO. Se empleó para ello un medio de cultivo RPMI 1640 con 1% de penicilina – estreptomycin (P/S), 1% de L-glutamina y 10% de FBS. Tras 2 lavados con medio de cultivo (con centrifugación a 300 g), las células se cultivaron a 37°C y 5% CO₂. Los primeros dos pases (subcultivos) tras la descongelación se realizaron con un intervalo de 48 horas empleando el medio con una concentración del 10% de FBS, para estimular la proliferación celular.

Para llevar a cabo los pases de mantenimiento, se redujo la concentración de FBS del medio de cultivo al 5% y se empleó tampón GHCKS (NaCl (6.37 g/L), KCl (0.30 g/L), citrato trisódico (3 g/L), glucosa (2 g/L) y tampón HEPES (4.77 g/L)) para despegar las células del frasco. En cada pase se sembraron, previo conteo en una cámara de Neubauer, 0.5×10^6 células en frascos de 25cm² con 4ml de medio de cultivo, conservándose en un incubador a 37°C y 5% CO₂. Los pases de mantenimiento se realizaron al alcanzar la confluencia celular, cada 48 – 72h.

Para los experimentos, se sembraron 75×10^3 células en pocillos sobre un cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro con 500 µl de medio con 5% FBS durante 24 h. Tras

este tiempo las células se mantuvieron en 200 μ l de medio sin FBS antes de la incubación con mielina.

4. Ensayos de fagocitosis de mielina: Curso temporal.

El primer estudio consistió en la incubación de células BV2 con las mielinas WT y ApoD-KO marcadas con Dil durante diferentes tiempos para determinar el curso temporal de la fagocitosis (Anexos, Figura A2H-K). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Las mielinas marcadas con Dil se sonicaron en baño durante 5 minutos, justo antes de ser añadidas a los respectivos pocillos (Anexos, Figura A2L) con una concentración final de 25 μ g/ml, en los 200 μ l de medio sin FBS. Las células expuestas a mielina se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 5, 30 o 60 minutos. Tras el tiempo de incubación, se retiró el medio de los pocillos y se realizaron dos lavados con PBS. A continuación, se fijaron las células en formaldehído 4% en PBS durante 15 minutos a 20°C, seguidos de dos lavados en PBS y montaje de los cubreobjetos sobre porta con 2 μ l de EverBrite Mounting Medium®.

Cada cubreobjetos se visualizó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i, usando un objetivo de 20x. Para recoger la fluorescencia del Dil se usó un bloque de filtros G2-A (Exc 510-560 / Em 590LP), y para las fotos de campo claro se usó la óptica Nomarski. Para el marcaje de núcleos se usó el marcador fluorescente DAPI. Se tomaron fotografías de, al menos, 5 campos aleatorios de cada preparación con una cámara digital Nikon DS-Ri1i y el software NIS-Elements, con exposiciones de 100 ms. Para tomar imágenes de microscopía confocal se usó un confocal Leica SP8 del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la UVa.

5. Estudio del efecto de ApoD sobre la fagocitosis de mielina por la microglía.

El segundo grupo de experimentos consistió en replicar las condiciones anteriores en presencia o ausencia de ApoD humana con el tiempo de incubación seleccionado en el primer estudio (Anexos, Figura A2G). La ApoD empleada fue extraída y purificada de líquido quístico mamario (44), y se conserva a -20°C.

La ApoD se añadió al medio de cultivo de los pocillos correspondientes (Anexos, Figura A2M) a una concentración final de 50 nM, y se incubó durante tres horas para que la proteína pudiese ser endocitada por las células BV2. Pasado este tiempo, se añadieron las mielinas marcadas con Dil y sonicadas de forma idéntica a la descrita en el apartado anterior. En vista de los resultados en cuanto al tiempo de exposición de las BV2 a la

mielina, se decidió mantener 60 minutos de exposición a la mielina en todas las réplicas, ya que parece un tiempo suficiente para que se produzca la fagocitosis de esta. Se realizaron 5 réplicas de este experimento.

6. Procesado y análisis de imagen.

Se empleó el programa de análisis de imagen FIJI (45–47). Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron procesadas de forma equivalente en su brillo y contraste, así como el escalado pixel/ μm de acuerdo a la calibración con el objetivo utilizado. Se contó el número de células de cada fotografía y se midió la intensidad de fluorescencia integrada (*Raw Integrated Density*) de las partículas marcadas con Dil.

Adicionalmente, en el segundo grupo de experimentos se escogió una de las imágenes de óptica Nomarski por réplica y condición experimental, y se delimitó manualmente el contorno de cada célula, exceptuando aquellas cuyo borde no estuviese bien diferenciado o quedase en parte fuera de la imagen. La elección de la imagen estudiada de cada grupo se hizo de forma independiente del marcaje con Dil.

Se realizó una segmentación (*Color Thresholding*) de la imagen Dil correspondiente a cada imagen de óptica de Nomarski y se diseñó una macro (Anexos, Figura A3) para realizar automáticamente un análisis global de cada célula (región de interés; ROI) y el análisis de partículas (*Analyze Particles*) de cada ROI seleccionado. Estos valores se exportaron a una hoja de cálculo de Excel para su posterior análisis cuantitativo.

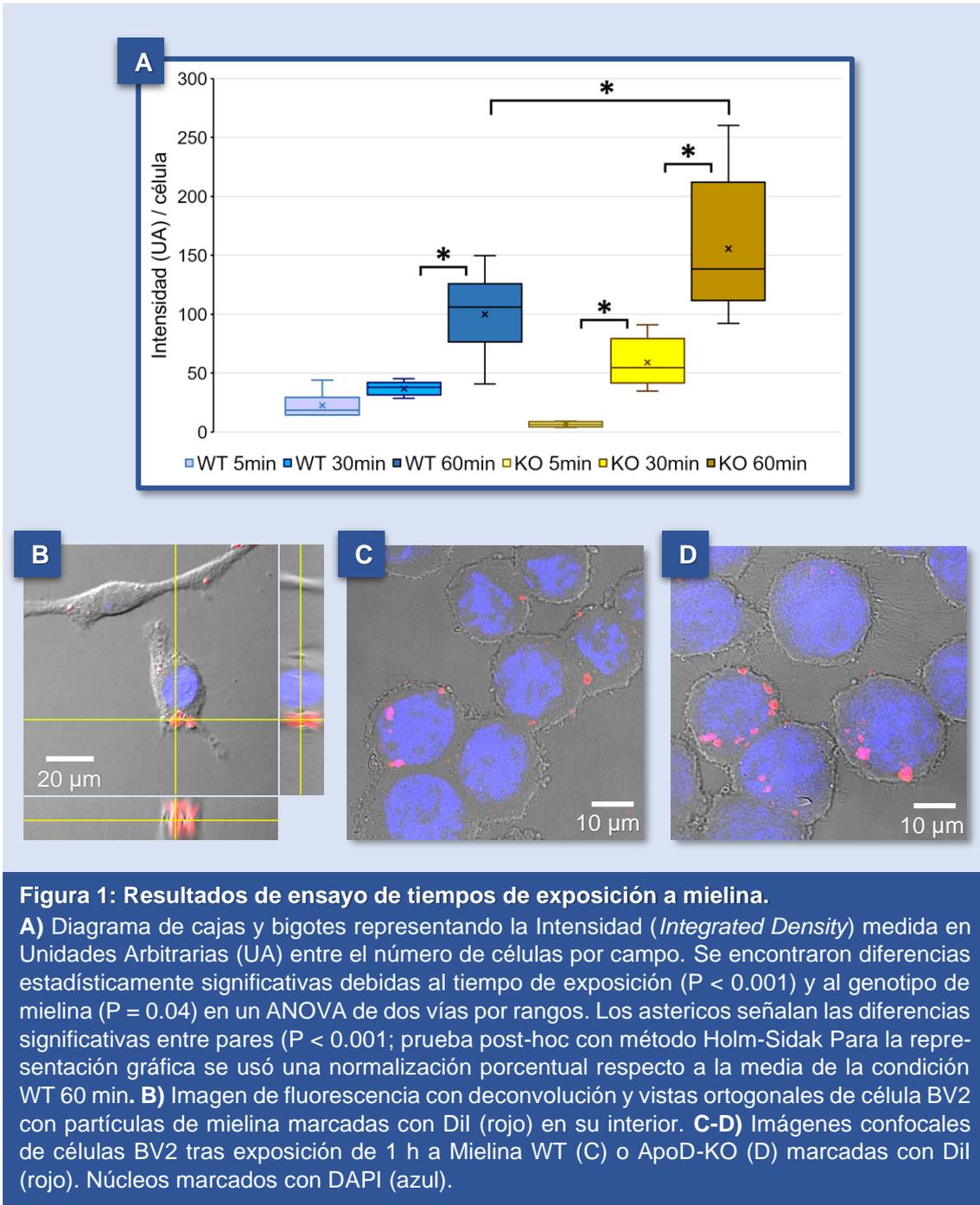
7. Representación gráfica y análisis estadístico.

Se emplearon los programas Excel (con el complemento de análisis de datos) así como Statgraphics 18 y Sigmaplot. Los estadísticos utilizados se describen en los resultados de cada experimento. Se consideró un P-valor < 0.05 como umbral de significación estadística para las comparaciones entre grupos experimentales.

RESULTADOS:

1. Ensayo de fagocitosis de mielina a diferentes tiempos.

En esta primera fase del estudio, se comprobó que la microglía BV2 fagocitaba las partículas de mielina sonicada y se optimizó el tiempo de incubación necesario para dicha fagocitosis. Se fotografiaron 64 campos, la mitad con cada tipo de mielina, de los cuales 12 correspondían a tiempos de incubación con mielina de 5 minutos, 20 a 30 minutos, y el resto a 60 minutos. Dos de las fotografías fueron descartadas durante el análisis posterior por presentar artefactos en la fluorescencia o errores técnicos.



Para el análisis estadístico, se usó la intensidad de fluorescencia global de la foto (*Integrated Density*) dividida entre el número de células contabilizadas en la imagen de óptica de Nomarski correspondiente. Este parámetro se normalizó en cada grupo de experimentos respecto al valor promedio de la condición mielina WT 60 minutos (Figura 1A). Tanto el tiempo de incubación como el genotipo de la mielina mostraron diferencias significativas en la variable respuesta (Intensidad/célula). Sólo se encontraron diferencias entre el grupo WT y el ApoD-KO a los 60 min de incubación, por lo que se escogió este tiempo de incubación con mielinas para el segundo grupo de experimentos.

2. Comprobación de la internalización de la mielina por las células BV2.

Se empleó uno de los cubres del experimento anterior, con la condición mielina WT 60 minutos, para comprobar por microscopía confocal que las partículas de mielina estuviesen en el interior de la célula y no adheridas a su superficie externa. Se hizo un primer análisis mediante deconvolución a partir de imágenes de fluorescencia (Figura 1B), que sugería la internalización de las partículas de mielina en las células. Para confirmar estos resultados, se reconstruyó tridimensionalmente una de las células a partir de un apilado de secciones confocales de la fluorescencia, con el que se demostró que las partículas de mielina estaban en el interior de la misma (Figura 1C-D).

3. Ensayo de la fagocitosis de mielina en presencia de ApoD.

En estos experimentos se realizaron fotografías de un total de 102 campos de visualización con las cuatro condiciones experimentales explicadas en el apartado de Material y métodos. La intensidad de fluorescencia por célula fue afectada significativamente por el factor genotipo de la mielina (Figura 2), siendo mayor la intensidad de fluorescencia por célula con las mielinas ApoD-KO.

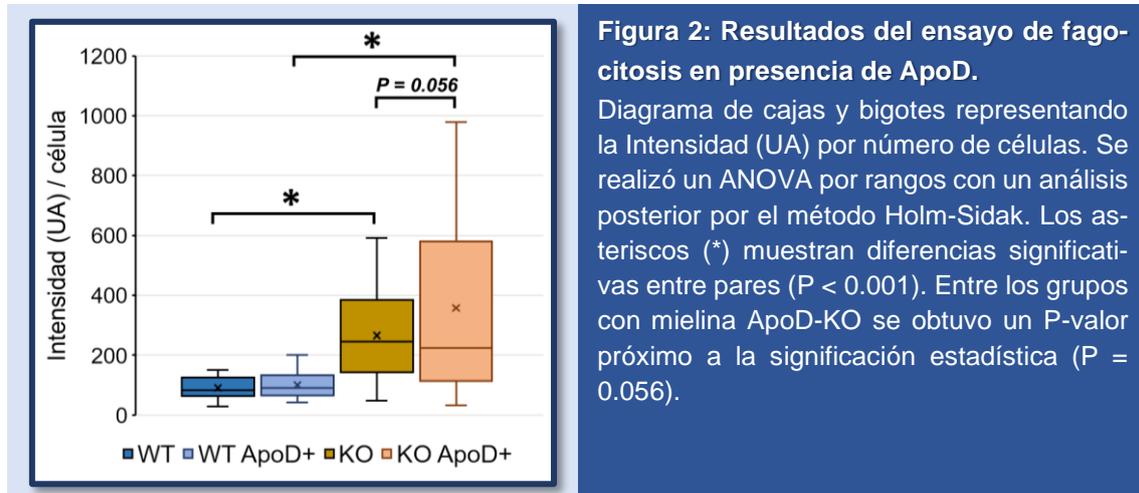


Figura 2: Resultados del ensayo de fagocitosis en presencia de ApoD.

Diagrama de cajas y bigotes representando la Intensidad (UA) por número de células. Se realizó un ANOVA por rangos con un análisis posterior por el método Holm-Sidak. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre pares ($P < 0.001$). Entre los grupos con mielina ApoD-KO se obtuvo un P-valor próximo a la significación estadística ($P = 0.056$).

Dado que entre los grupos mielina ApoD-KO con y sin pre-tratamiento con ApoD se obtuvo un P-valor muy próximo a la significación estadística ($P = 0.056$), se puede apreciar una tendencia que apunta a que la adición exógena de ApoD aumenta la intensidad de fluorescencia por célula.

4. Estudio de la fagocitosis de mielina y adición de ApoD en células individuales.

Con el fin de refinar el análisis anterior, se llevó a cabo un estudio con células individualizadas a partir de una de las fotos de cada condición y experimento. Se procesaron 19 fotografías con óptica de Nomarski de las que se individualizaron un total de 1875 células (381 WT, 460 WT ApoD+, 552 KO, 482 KO ApoD+). Tras aplicar una segmentación para la fluorescencia roja (*Color Segmentation*) idéntica para cada fotografía Dil, se midió la densidad integrada de cada célula individual (Figura 3).

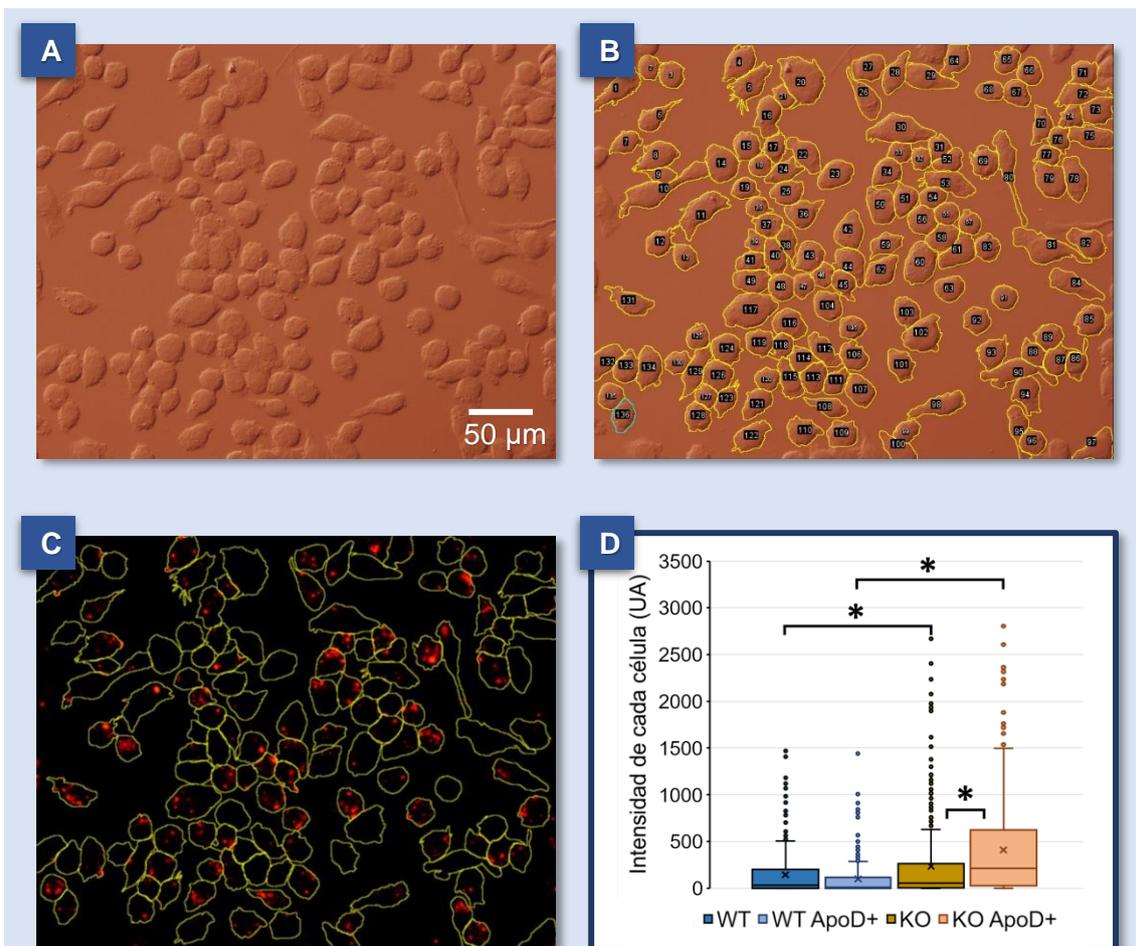


Figura 3: Resultados de células individualizadas.

A) Fotografía con óptica de Nomarski a 20 aumentos. En este caso, se trata de una condición experimental de mielina ApoD-KO sin adición de ApoD. **B)** La misma fotografía con las células individualizadas mediante regiones de interés (ROIs) **C)** Las ROIs trasladadas a la correspondiente imagen con fluorescencia por Dil. **D)** Diagrama de cajas y bigotes representando la Intensidad (Raw Integrated Density) de la fluorescencia de Dil (unidades arbitrarias) de cada célula individual. Se realizó un ANOVA por rangos con un análisis posterior por el método Holm-Sidak. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre pares ($P < 0.001$). Para la representación gráfica se usó una normalización porcentual respecto a la media de la condición WT.

5. Análisis de las partículas de mielina en células individualizadas.

Hasta este punto, solo se hemos estudiado la intensidad de la fluorescencia que presenta cada célula del cultivo. Dado que dicha intensidad puede deberse a múltiples factores, como el número de partículas fagocitadas o el tamaño individual de las mismas, se decidió llevar a cabo un estudio detallado de las características de cada partícula. En este apartado se han descartado aquellas células que no hubiesen captado ninguna partícula (726 del total de 1875 células individualizadas), y de las restantes se estudió el número de partículas por célula (Figura 4A) y el porcentaje de superficie celular ocupado por partículas (Figura 4B).

Para ambas variables, el genotipo de la mielina produjo diferencias significativas, teniendo un mayor número de partículas (Figura 4A) y ocupando éstas un mayor porcentaje del área (Figura 4B) en las células que fagocitaron mielina ApoD-KO.

No se encontraron diferencias en el número de partículas entre los grupos sin y con ApoD. Sin embargo, el área ocupada por las partículas de mielina ApoD-KO sí fue afectada por el tratamiento, siendo mayor en el grupo pre-expuesto a ApoD.

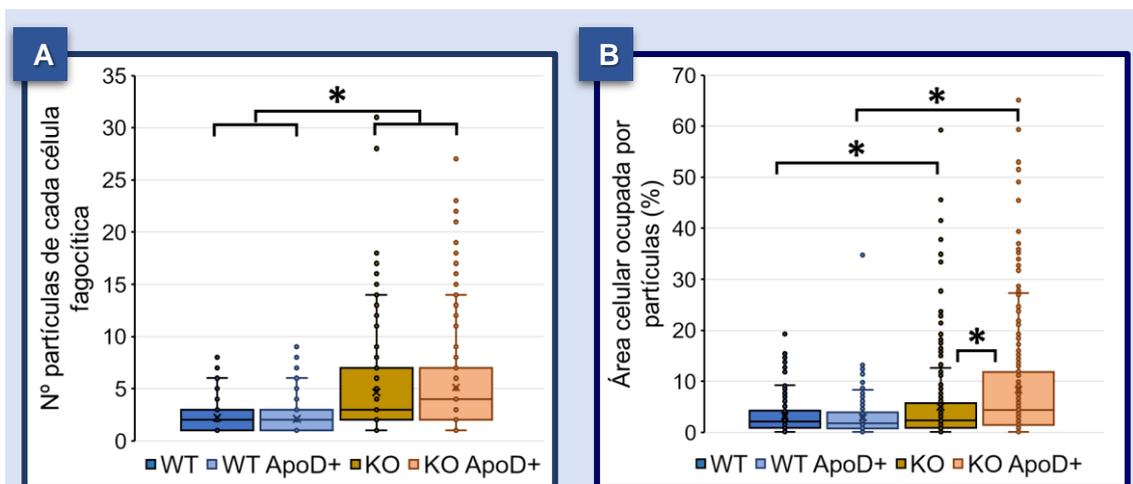


Figura 4: Análisis de las partículas.

Diagramas de cajas y bigotes en los que se representa: **A)** Número de partículas fagocitadas de cada célula fagocítica (excluyendo aquellas que no fagocitasen ninguna partícula). El ANOVA por rangos solo demostró diferencias en la variable genotipo de mielina ($P < 0.001$), representado con el asterisco (*). **B)** Área celular ocupada por partículas (%). Se realizó un ANOVA por rangos con un análisis post-hoc por el método Holm-Sidak. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre pares ($P < 0.001$).

DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos, parece razonable pensar que ApoD interviene de dos formas diferentes en la fagocitosis microglial de residuos de mielina. Por una parte,

todos los experimentos apuntan a una diferencia de fagocitosis en función del fenotipo del cerebro del que se extrajo la mielina, teniendo las células BV2 una mayor avidez por la mielina ApoD-KO. Sabemos, tal y como se explicaba en el apartado Introducción, que la mielina ApoD-KO es estructuralmente diferente a la mielina de organismos silvestres, ya que la falta de esta lipocalina durante la mielinogénesis produce un fallo de la actividad de las sialidasas, lo que provoca una alteración del glicocáliz de la mielina y con ello un fallo en la compactación entre sus capas (27). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que ese cambio bioquímico y estructural de la mielina se mantiene a pesar de su purificación y de la sonicación los 5 minutos previos a su adición al cultivo con las BV2, y que las células microgliales responden de forma diferencial a estos cambios.

Por otra parte, los resultados obtenidos demuestran que la adición de ApoD humana aumenta la fagocitosis por parte de las BV2; no obstante, este efecto solo aparece con la mielina ApoD-KO. Esto podría indicar, siguiendo con la hipótesis anterior, que la microglía solo ve incrementada su capacidad fagocítica a través de la ApoD presente en el medio cuando se trata de residuos patológicos, con una estructura anómala, de mielina. Dado que la microglía no expresa ApoD, sino que endocita la que otras células gliales (fundamentalmente los astrocitos) liberan al medio, podríamos pensar que en una situación patológica en la que se han producido residuos de mielina anómalos, se produce una astrogliosis y una microgliosis reactivas que se retroalimentan entre sí a través de una serie de citocinas y biomoléculas, entre las cuales se encuentra ApoD. En el contexto de este ambiente de activación glial, la microglía podría polarizarse hacia un estado que favoreciese la fagocitosis. Esto está en consonancia con los estudios citados anteriormente, en los que se encontró un patrón histológico de co-localización entre microglía activada, astrogliosis y un aumento tisular de ApoD en las lesiones en fase activa e incluso mayor en la fase regenerativa de la esclerosis múltiple (33).

Si bien en este trabajo se ha estudiado la fagocitosis por parte de una línea celular de microglía, cabe plantearse ampliar el estudio para obtener una visión más global del trinomio microglía – ApoD – desmielinización, ya que otra variable a tener en cuenta es la degradación de las partículas de mielina una vez que han sido internalizadas. Es posible que la mielina estructuralmente anómala por la ausencia de ApoD en el oligodendrocito durante la mielinogénesis sea fagocitada con mayor avidez por la microglía, pero se acumule en el interior de su citoplasma al no ser capaz de degradarla. Es decir, una hipótesis a comprobar es si esta fagocitosis aumentada de mielina ApoD-KO es o no una fagocitosis eficiente.

Por lo tanto, parece claro que las diferencias estructurales de la mielina promueven el proceso de fagocitosis, pero podrían dificultar la degradación o bien producir ambas alteraciones simultáneamente. Para esclarecer esta cuestión, este trabajo sería el antecedente para un estudio en el que, a las células microgliales, tras haber sido cultivadas durante una hora con mielina, se les retire el medio de cultivo y se observe la presencia de partículas de mielina en diferentes tiempos. Además, debido a que el marcador fluorescente Dil podría dar señal de fondo una vez degradada la mielina, un estudio complementario tanto al presentado en este trabajo como al de degradación de mielina, consistiría en la medición de la misma a través de pruebas cuantitativas como el Western-Blot.

Otra línea de trabajo futura que se podría estudiar sería el patrón de co-localización entre ApoD y la mielina. Los resultados aquí presentados, especialmente en los grupos en los que se empleó mielina ApoD-KO y adición exógena de la lipocalina, muestran una gran variabilidad. Este dato debe hacernos pensar en que no todas las células BV2 responden de forma uniforme, y cabe plantearse si el aumento de partículas mielínicas (ya sea por incremento de fagocitosis o por falta de degradación) se correlaciona con células que hayan captado una mayor cantidad de ApoD.

CONCLUSIONES

Del trabajo experimental realizado en este Trabajo Fin de Grado se derivan las siguientes conclusiones:

1. La mielina formada en organismos que no expresan ApoD es fagocitada con mayor avidez por la microglía *in vitro* en tiempos de exposición de 60 minutos.
2. La microglía BV2 fagocita más partículas y éstas ocupan una mayor superficie celular cuando se trata de mielina ApoD-KO.
3. La pre-exposición a ApoD incrementa la fagocitosis y la superficie celular ocupada por partículas únicamente en los casos en los que la microglía BV2 se expuso a mielina ApoD-KO. Sin embargo, el número de partículas fagocitado por cada célula no se vio alterado.
4. Es necesario estudiar el proceso de degradación de las partículas de mielina en el interior de la microglía, ya que el correcto aclaramiento de los residuos mielínicos ha demostrado ser una parte esencial del proceso de remielinización en condiciones patológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:71.
2. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature.* 27 de junio de 2002;417(6892):941-4.
3. Gitik M, Liraz-Zaltsman S, Oldenborg P-A, Reichert F, Rotshenker S. Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRP α (signal regulatory protein- α) on phagocytes. *J Neuroinflammation.* 15 de marzo de 2011;8:24.
4. Franklin RJM, Goldman SA. Glia Disease and Repair-Remyelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 18 de mayo de 2015;7(7):a020594.
5. Sierra A, de Castro F, Del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. The «Big-Bang» for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia.* 2016;64(11):1801-40.
6. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1359-69.
7. Lloyd AF, Davies CL, Miron VE. Microglia: origins, homeostasis, and roles in myelin repair. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;47:113-20.
8. Chen Z, Trapp BD. Microglia and neuroprotection. *J Neurochem.* enero de 2016;136 Suppl 1:10-7.
9. Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci.* septiembre de 2013;16(9):1211-8.
10. Voss EV, Škuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, et al. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis.* enero de 2012;45(1):519-28.
11. Lloyd AF, Davies CL, Holloway RK, Labrak Y, Ireland G, Carradori D, et al. Central nervous system regeneration is driven by microglia necroptosis and repopulation. *Nat Neurosci.* 2019;22(7):1046-52.
12. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci.* 26 de 2016;19(8):987-91.
13. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain.* febrero de 2009;132(Pt 2):288-95.
14. Skripuletz T, Hackstette D, Bauer K, Gudi V, Pul R, Voss E, et al. Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain.* enero de 2013;136(Pt 1):147-67.

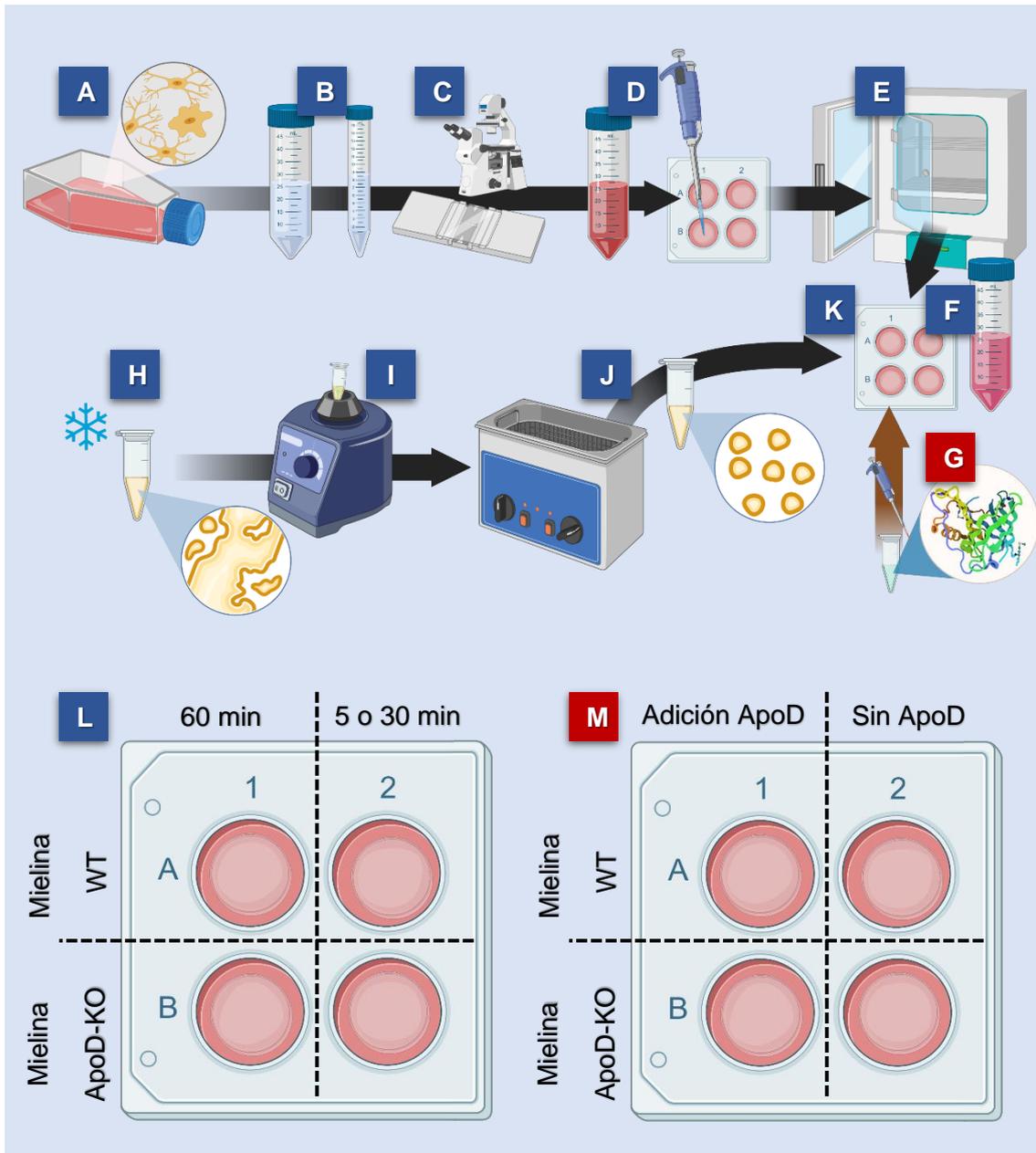
15. Olah M, Amor S, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, et al. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia*. febrero de 2012;60(2):306-21.
16. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*. 28 de julio de 2014;211(8):1533-49.
17. Takahashi K, Rochford CDP, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med*. 21 de febrero de 2005;201(4):647-57.
18. Poliani PL, Wang Y, Fontana E, Robinette ML, Yamanishi Y, Gilfillan S, et al. TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *J Clin Invest*. 1 de mayo de 2015;125(5):2161-70.
19. Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:6.
20. Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging*. julio de 2014;35(7):1632-42.
21. Rassart E, Desmarais F, Najyb O, Bergeron K-F, Mounier C. Apolipoprotein D. *Gene*. 15 de junio de 2020;756:144874.
22. Pascua-Maestro R, Diez-Hernando 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. *PLoS Genet*. 2017;13(2):e1006603.
23. Morais Cabral JH, Atkins GL, Sánchez LM, López-Boado YS, López-Otin C, Sawyer L. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett*. 5 de junio de 1995;366(1):53-6.
24. Jacomy H, Talbot PJ. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology*. 10 de octubre de 2003;315(1):20-33.
25. Do Carmo S, Jacomy H, Talbot PJ, Rassart E. Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *J Neurosci*. 8 de octubre de 2008;28(41):10330-8.
26. Gebicke-Haerter PJ. Microarrays and expression profiling in microglia research and in inflammatory brain disorders. *J Neurosci Res*. 1 de agosto de 2005;81(3):327-41.
27. García-Mateo N, Pascua-Maestro R, Pérez-Castellanos A, Lillo C, Sanchez D, Ganfornina MD. Myelin extracellular leaflet compaction requires apolipoprotein D membrane management to optimize lysosomal-dependent recycling and glycocalyx removal. *Glia*. 2018;66(3):670-87.
28. García-Mateo N. Función de la Apolipoproteína D en la mielinización y en la respuesta al daño en el sistema nervioso periférico. [Internet]. Universidad de Valladolid; 2013. Disponible en: <https://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarSeleccion.do>

29. García-Mateo N, Ganfornina MD, Montero O, Gijón MA, Murphy RC, Sanchez D. Schwann cell-derived Apolipoprotein D controls the dynamics of post-injury myelin recognition and degradation. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:374.
30. 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.
31. Stoop MP, Singh V, Dekker LJ, Titulaer MK, Stingl C, Burgers PC, et al. Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *PLoS ONE.* 27 de agosto de 2010;5(8):e12442.
32. Kroksveen AC, Guldbrandsen A, Vedeler C, Myhr KM, Opsahl JA, Berven FS. Cerebrospinal fluid proteome comparison between multiple sclerosis patients and controls. *Acta Neurol Scand, Suppl.* 2012;(195):90-6.
33. Navarro A, Rioseras B, Del Valle E, Martínez-Pinilla E, Astudillo A, Tolivia J. Expression Pattern of Myelin-Related Apolipoprotein D in Human Multiple Sclerosis Lesions. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:254.
34. Patel SC, Asotra K, Patel YC, McConathy WJ, Patel RC, Suresh S. Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuroreport.* 7 de marzo de 1995;6(4):653-7.
35. del Valle E, Navarro A, Astudillo A, Tolivia J. Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J Histochem Cytochem.* octubre de 2003;51(10):1285-90.
36. Navarro A, Del Valle E, Tolivia J. Differential expression of apolipoprotein d in human astroglial and oligodendroglial cells. *J Histochem Cytochem.* agosto de 2004;52(8):1031-6.
37. Sharma K, Schmitt S, Bergner CG, Tyanova S, Kannaiyan N, Manrique-Hoyos N, et al. Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat Neurosci.* diciembre de 2015;18(12):1819-31.
38. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 3 de septiembre de 2014;34(36):11929-47.
39. Gerrits E, Heng Y, Boddeke EWGM, Eggen BJL. Transcriptional profiling of microglia; current state of the art and future perspectives. *Glia.* 2020;68(4):740-55.
40. Bendito-Guilarte B, Corraliza-Gomez M, Poncela M, Villa-Valdes M, Arribas-Rodriguez E, Ganfornina MD, et al. Role of Apolipoprotein D in microglial response to oxidative stress and Amyloid-beta triggered damage. En: *Communication #320.* 2019.
41. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell.* agosto de 2008;7(4):506-15.
42. Norton WT, Poduslo SE. Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem.* octubre de 1973;21(4):749-57.

43. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol.* mayo de 1990;27(2-3):229-37.
44. Ruiz M, Sanchez D, Correnti C, Strong RK, Ganfornina MD. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J.* agosto de 2013;280(16):3928-43.
45. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* julio de 2012;9(7):671-5.
46. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods.* julio de 2012;9(7):676-82.
47. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 29 de noviembre de 2017;18(1):529.

ANEXOS:

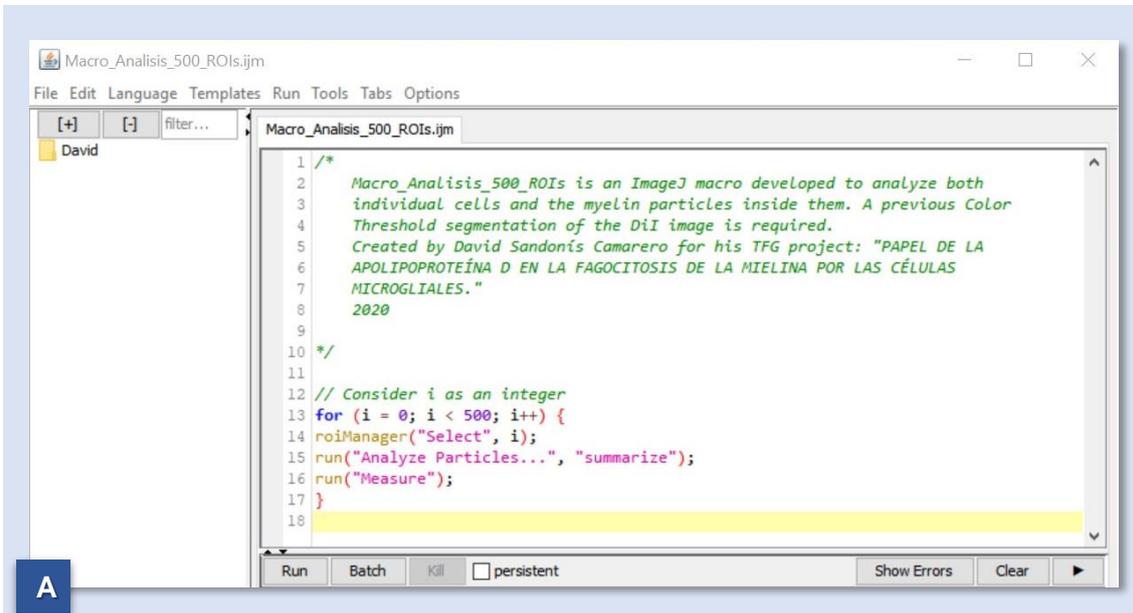
FIGURAS COMPLEMENTARIAS DE MATERIAL Y MÉTODOS	22
AGRADECIMIENTOS.....	25
PÓSTER	



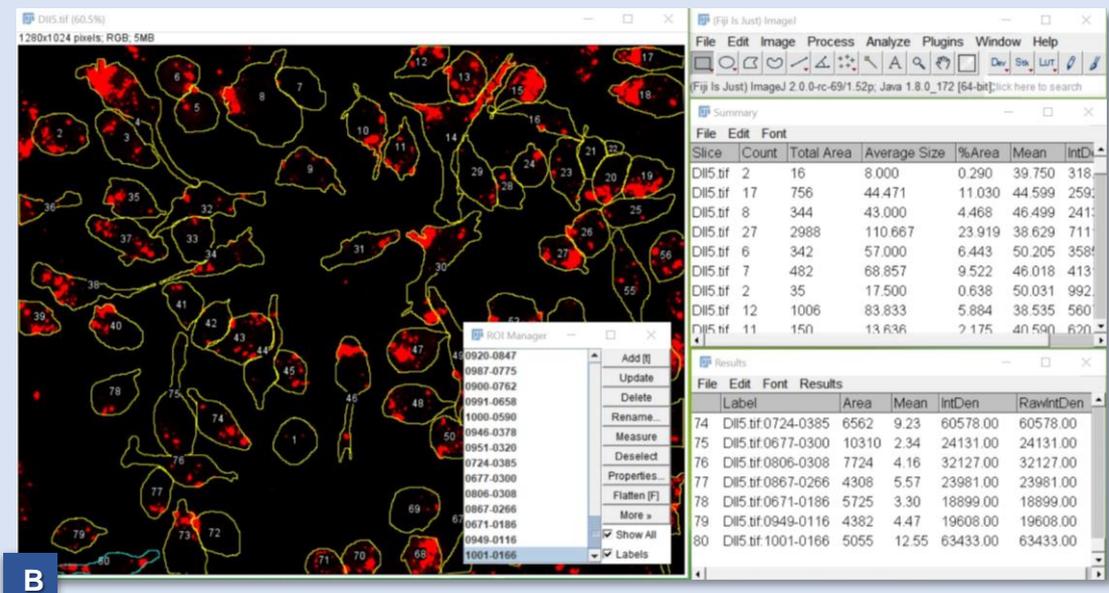
Anexos, Figura A2: Cultivo y experimentos con las células BV2.

A) Frasco de cultivo de 25 cm² con medio de cultivo 5% FBS. **B)** Lavado con PBS y levantamiento con GHCKS. **C)** Contaje en cámara de Neubauer. **D)** Siembra en los pocillos con medio 5% FBS. **E)** Incubación 24 h. **F)** Sustitución del medio por otro sin FBS. **G)** En aquellos experimentos con pre-tratamiento con 50 nM ApoD, adición de en los pocillos correspondientes. Incubación de 3 h. **H)** Descongelación de la mielina. **I)** Vórtex. **J)** Sonicación de la mielina durante 5 min. **K)** Adición de las mielinas, 25 µg/ml. **L)** Esquema de la placa de pocillos para los experimentos de curso temporal. **M)** Esquema de la placa de pocillos para los experimentos con adición de ApoD.

La estructura de ApoD fue obtenida de RCSB Protein Data Bank: PDB – 2HZR (48).



A



B

Anexos, Figura A3: Macro para el análisis de imagen.
A) Código de la macro creada para automatizar el análisis de las células individualizadas. **B)** Ejemplo de uso de la macro en una imagen DiI a la que se le ha aplicado la segmentación Color Threshold. Se muestran las ventanas de ROI Manager, Results (medidas relativas a la célula individual) y Summary (medidas relativas a las partículas dentro de cada ROI). En este caso, al haber 80 ROIs se generan 80 medidas de cada tipo.

AGRADECIMIENTOS

El autor de este trabajo agradece su contribución al mismo a las siguientes personas y entidades:

MD. Ganfornina y D. Sánchez por la supervisión, mentorización y corrección del trabajo.

M. Corraliza-Gómez por su colaboración y enseñanza de las técnicas empleadas.

J. Gutierrez (LTI, UVa) por la obtención de las imágenes de microscopía confocal que se muestran en el Póster.

J. Valero por proponer alternativas a la segmentación de imagen que finalmente se empleó.

N. García-Mateo por sus protocolos para la elaboración y marcaje de mielina.

Las ilustraciones del Póster y de los Anexos, Figuras A1 y A2 fueron creadas con la aplicación BioRender (*Created with BioRender.com*).

PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN LA FAGOCITOSIS DE LA MIELINA POR LAS CÉLULAS MICROGLIALES.

David Sandonís Camarero
Tutorizado por D. Sánchez y M.D. Ganfornina

INTRODUCCIÓN

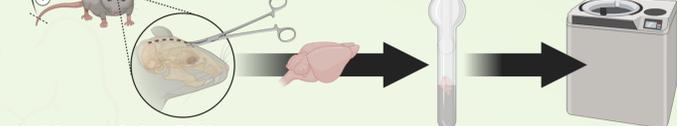
Los residuos de mielina que se generan tras una lesión desmielinizante en el Sistema Nervioso (SN) interfieren con el proceso de remielinización y reparación axonal, por lo que su aclaramiento es esencial para el restablecimiento de la homeostasis tisular. Este aclaramiento se lleva a cabo mediante la fagocitosis por parte de la microglía, células inmunitarias del SN central. Por otra parte, la lipocalina Apolipoproteína D (ApoD) tiene una función protectora ante diversas patologías neurodegenerativas, incluyendo las desmielinizantes, y se ha demostrado su implicación en la fagocitosis de residuos de mielina por macrófagos en el SN periférico. En este trabajo experimental, se han realizado ensayos de fagocitosis de mielina con la línea de microglía murina BV2, y se ha estudiado el efecto de la adición exógena de ApoD durante dicha fagocitosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

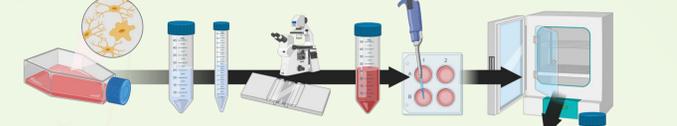
Genotipación PCR



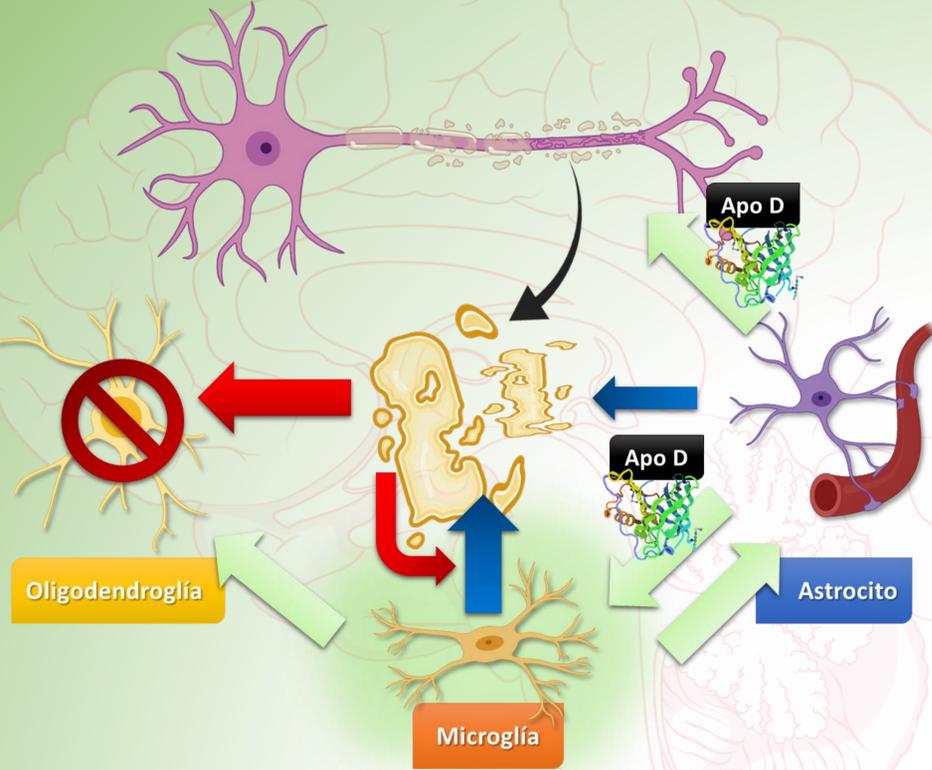
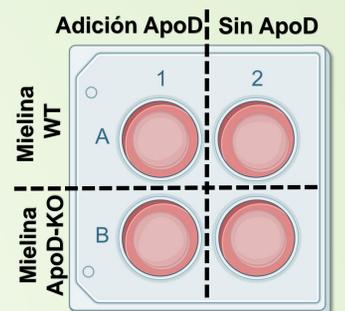
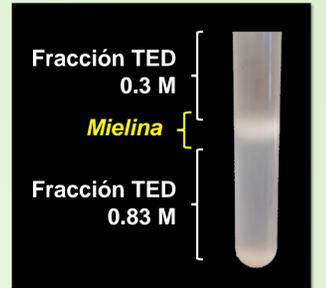
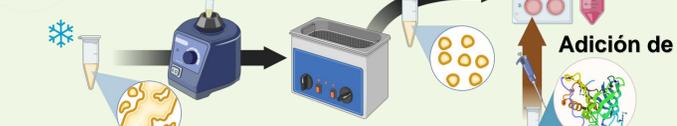
Obtención de mielina



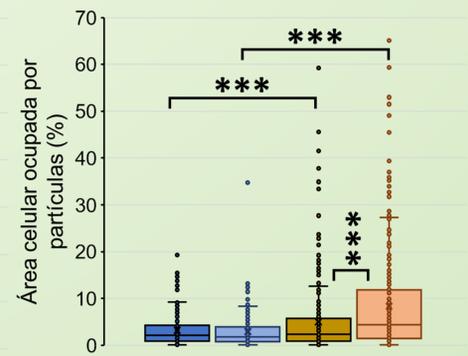
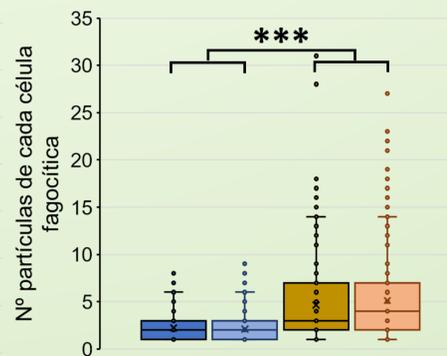
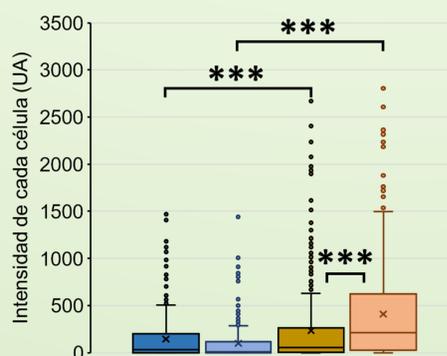
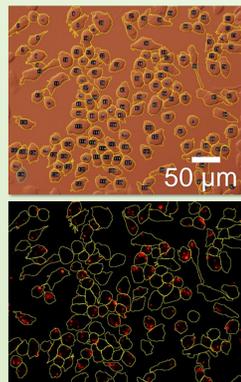
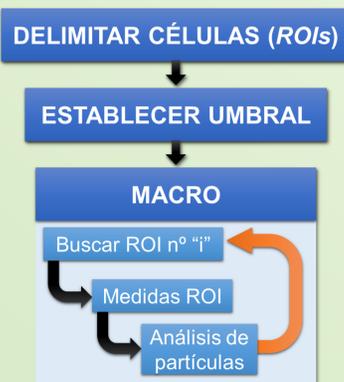
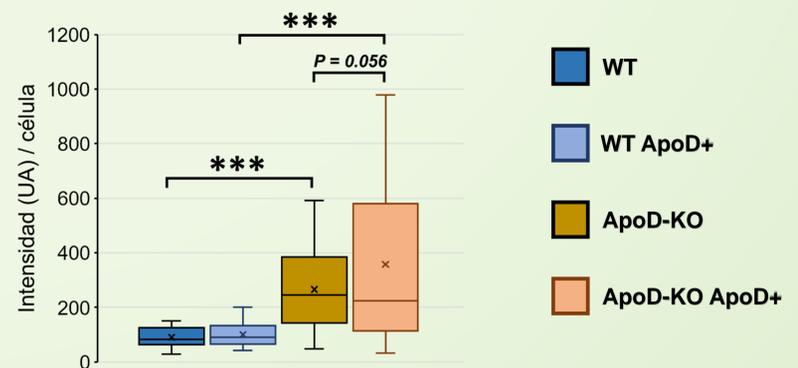
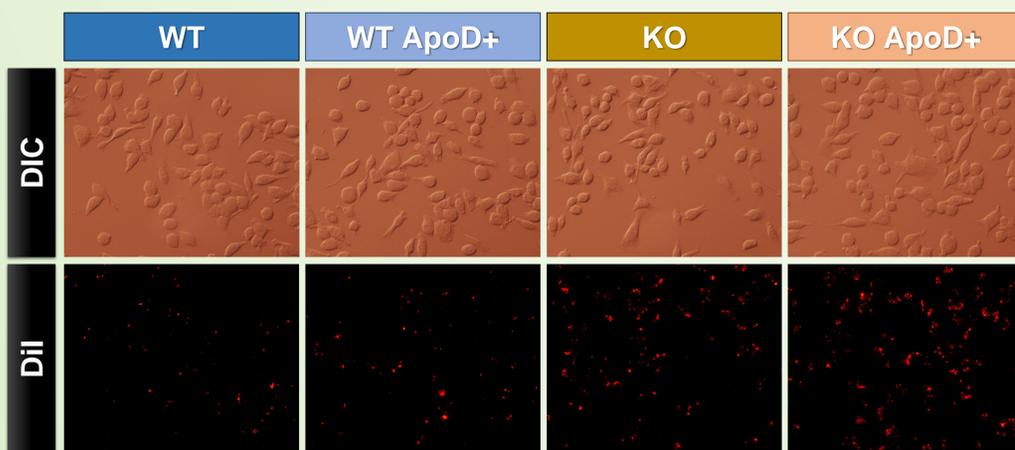
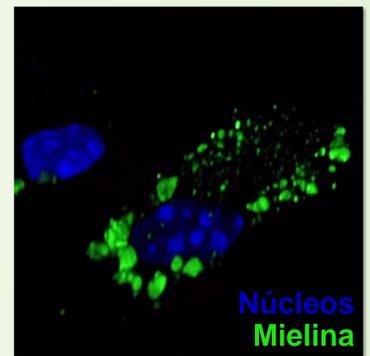
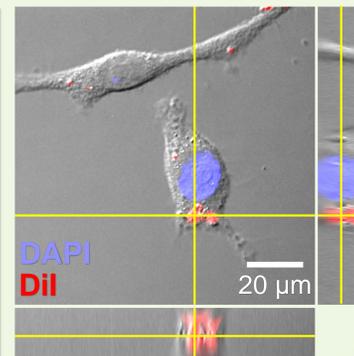
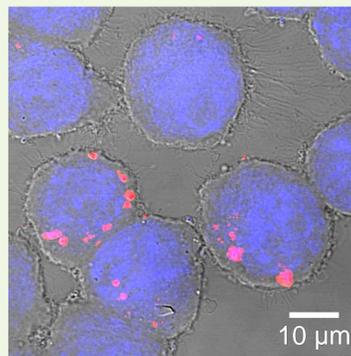
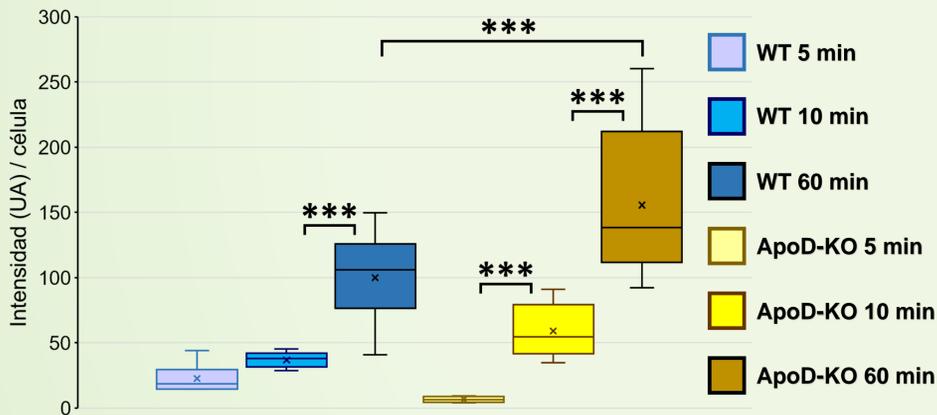
Cultivo celular BV2



Adición de mielina



RESULTADOS



CONCLUSIONES

1. La mielina ApoD-KO es fagocitada con mayor avidez por la microglía *in vitro* tras 1 h.
2. La microglía fagocita más partículas y éstas ocupan una mayor superficie celular cuando se trata de mielina ApoD-KO.
3. La pre-exposición a ApoD incrementa la fagocitosis y la superficie celular ocupada por partículas únicamente en los casos en los que la microglía BV2 se expuso a mielina ApoD-KO, pero no el número de partículas fagocitado por cada célula.
4. Es necesario estudiar el proceso de degradación de la mielina en el interior de la microglía.