



ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN NERVIOS PERIFÉRICOS HUMANOS

AUTOR

Reyes González Delgado

TUTORIZADO POR

Diego Sánchez Romero

Paloma Jiménez Arribas

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	MARCO TEÓRICO.....	2
1.1.1.	Apolipoproteína D: generalidades.....	2
1.1.2.	Estructura del SNP	2
1.1.3.	Distribución esperada de ApoD en el SNP	4
1.1.4.	Perspectivas y enfoque en la investigación sobre ApoD	5
1.2.	JUSTIFICACIÓN	7
3.	OBJETIVOS	7
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	7
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1	Estrategia de búsqueda bibliográfica:.....	7
4.2	Selección de sujetos.....	8
4.3	Metodología: Obtención de muestras.....	9
4.4	Metodología: Procesamiento de las muestras.....	9
4.4.1	Fijación e inclusión en parafina.....	9
4.4.2	Tallado.....	9
4.4.3	Desparafinación e hidratación del tejido	9
4.4.4	Desenmascaramiento de los antígenos.....	10
4.4.5	Tinción inmunohistoquímica	10
4.4.6	Tinción histológica	11
4.4.7	Procesamiento de imágenes	11
5.	RESULTADOS	11
5.1	Estudio histológico de nervios periféricos murinos y humanos	11
5.2	Inmunofluorescencia: nervio ciático de ratón	13
5.3	Expresión de ApoD en nervio sural humano	14
5.4	Control de especificidad de anticuerpos secundarios	17
6.	DISCUSIÓN	18
7.	CONCLUSIONES	20
8.	REFERENCIAS.....	21

Resumen: La Apolipoproteína D (ApoD) es una lipocalina perteneciente a una familia de proteínas ligadoras de pequeñas moléculas hidrofóbicas. Interviene en la regeneración Walleriana, tanto en la activación de la fagocitosis de residuos de mielina como en la posterior degradación de esta. Su expresión en el SNP ha sido estudiada en modelo animal, pero no se conocen estudios precedentes sobre su expresión en humano. Los resultados observados en este trabajo concuerdan con lo esperado según la bibliografía acerca de su expresión en SNP de modelo animal, aunque existen diferencias (la distribución de ApoD tanto en las envueltas de tejido conjuntivo como en el compartimento intracelular, y la cantidad de células de Schwann) que requieren de un mayor y más profundo estudio. Este trabajo es un primer estudio cualitativo de la expresión de ApoD en nervio periférico humano control que puede preceder a posteriores estudios sobre enfermedad neurodegenerativa humana.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. Apolipoproteína D: generalidades

La Apolipoproteína D (ApoD) es una proteína extracelular glicosilada perteneciente a la familia de las lipocalinas. Esta familia proteica se caracteriza por su labor transportadora y ligadora de pequeñas moléculas hidrofóbicas, incluidas algunas moléculas lipídicas de importante función biológica. La especificidad en la unión a distintos ligandos y el mecanismo molecular de las Lipocalinas condicionarán su tejido de expresión.

La apolipoproteína D humana se aisló por primera vez a partir de plasma unida a proteínas de alta densidad (HDL). Ella y sus homólogos de insectos, Lazarillo (Laz) y Neural Lazarillo (NLaz), comparten diversas funciones ancestrales aunque con diferencias significativas por ejemplo en la unión a esteroides (ApoD humana no se une fuertemente a colesterol, a diferencia de NLaz y Laz que sí ligan ergosterol)[1]. Es su papel en la homeostasis lipídica el que capacita a ApoD para su fundamental acción: el mantenimiento de membranas biológicas. El papel de ApoD está siendo ampliamente estudiado en diversos tejidos ya que se ha demostrado que es moduladora del estado reducción-oxidación de estructuras lipídicas interviniendo en procesos muy diversos[2]. La pérdida de función de ApoD en ratón aumenta los niveles de peroxidación de lípidos cerebrales y la sensibilidad al estrés oxidativo, con la consiguiente afectación en su locomoción y aprendizaje. La sobreexpresión de ApoD humana en el cerebro del ratón produce efectos opuestos[3].

El gen ApoD se expresa en muchos tejidos, con altos niveles de expresión en bazo, testículos y cerebro[4]. También se acumula en los puntos de regeneración de los nervios periféricos y en parénquima cerebral y líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia o esclerosis múltiple. La expresión de ApoD aumenta durante el envejecimiento cerebral de mamíferos, atribuyéndosele un papel neuroprotector en el envejecimiento y en situaciones de estrés metabólico.

1.1.2. Estructura del SNP

Las células nerviosas periféricas tienen sus núcleos en ganglios y médula espinal. Sus axones se extienden agrupados y rodeados por células de Schwann y cubiertas conjuntivas, formando así el nervio periférico. *La vaina de mielina*, de constitución espiral, destaca por su intensa electrodensidad. Por dentro de la vaina está el axón y

por fuera se colocan el núcleo y el resto del citoplasma de la célula de Schwann. Forman al estrecharse los nodos de Ranvier que pueden ser visibles a gran aumento. Las células de Schwann están rodeadas por un tejido conjuntivo conocido como *endoneuro*, que une las fibras nerviosas de los fascículos. Dentro del fascículo y en asociación con el tejido conjuntivo hay fibroblastos, macrófagos y mastocitos ocasionales[5].

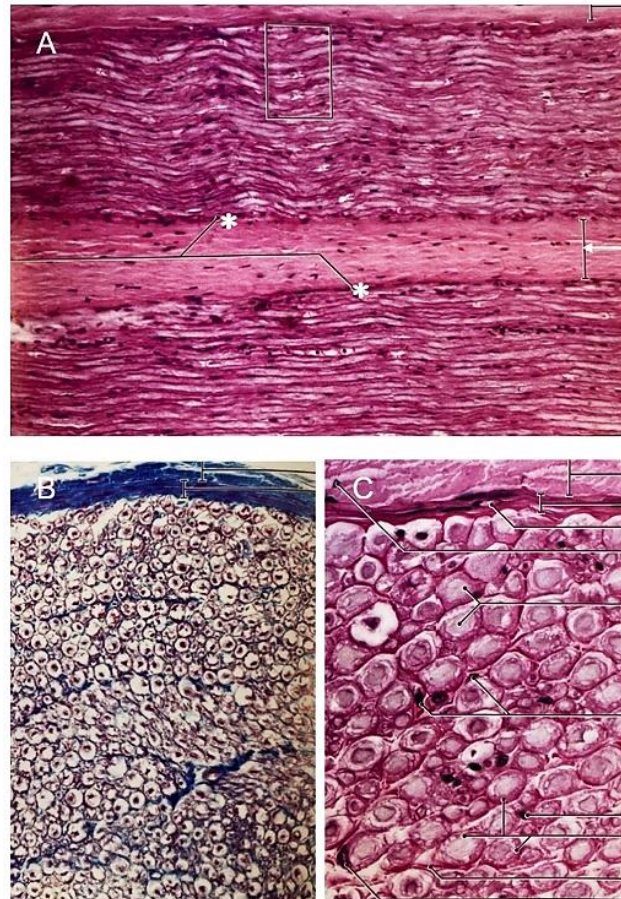


Figura 1. Histología del nervio periférico humano. **A.** Corte longitudinal teñido con Hematoxilina/Eosina (H-E), donde se observa una característica imagen ondulante debido a la capacidad contráctil de las células perineurales. Vemos los núcleos de las células de Schwann dispuestos en lo que sería el recorrido de la mielina, una capa de abundantes núcleos correspondiente con el perineuro (*), y el epineuro (flecha) entre los fascículos. **B.** Corte transversal con tinción tricrómica. **C.** Corte transversal teñido con H-E. Los axones aparecen como una estructura eosinofílica circular, rodeada de un espacio “vacío” antes ocupado por la mielina. Por fuera del axón, en ocasiones se ve el núcleo de una célula de Schwann. En los cortes transversales se pueden observar capilares bien definidos. *Modificado de [5].*

Alrededor de cada fascículo se encuentra el perineuro, tejido conjuntivo especializado formado por una porción epitelial y por una porción fibrosa externa de tejido conjuntivo denso. Constituye la barrera hematoneural y su epitelio es un derivado de la leptomeninge en continuidad con el neuroepitelio de la aracnoides. Las células del



epitelio perineural se disponen en varias capas de forma alineada y ordenada formando una lámina pseudoepitelial. La célula perineural especializada tiene una lámina basal en ambas superficies, contiene vesículas de pinocitosis y mitocondrias y en el citoplasma abundantes filamentos finos (miofilamentos) y densidades citoplasmáticas. Estos dos últimos son componentes característicos de la célula muscular lisa que explican su capacidad miocontráctil.

El *epineuro* es el tejido más externo del nervio que mantiene a los fascículos unidos e impide la sobre-distensión y el desgarro de las fibras nerviosas. Está formado por tejido conjuntivo denso y contiene fibras colágenas, algún fibroblasto, algún adipocito y fibras elásticas gruesas. Por él viajan los vasos sanguíneos que irrigan al nervio formando redes que atraviesan el perineuro hasta llegar al endoneuro. Alrededor de ellos aparecen con frecuencia mastocitos. El epineuro está en conexión con la duramadre del SNC y se torna más delgado a medida que avanza distalmente.

Los fibroblastos se pueden identificar gracias a sus núcleos alargados (aunque no tan planos como los de las células de Schwann, y más pequeños). El endoneuro y el epineuro contienen fibroblastos típicos que contienen vesículas de pinocitosis, mitocondrias y abundante cantidad de cisternas de retículo endoplásmico rugoso (lo que indica que produce colágeno).

1.1.3. Distribución esperada de ApoD en el SNP

Uno de los principales tejidos de expresión de ApoD es el sistema nervioso. En el sistema nervioso central, ApoD se expresa principalmente en **oligodendrocitos** y **astrocitos** [6].

En cuanto al sistema nervioso periférico, técnicas de fluorescencia han confirmado la localización de ApoD en **células de Schwann**, donde la Apolipoproteína D se localiza en vesículas de secreción y en la vaina exterior de las células, con un patrón de expresión dinámico que sugiere la posibilidad de cambio entre un estado inactivo y la activación ante determinadas situaciones funcionales[2].

En cultivos celulares realizados 7 días después de la lesión de nervio ciático de rata, se identificó mediante hibridación in situ la expresión de ApoD mayoritaria y casi exclusiva en **fibroblastos del endoneuro**[7], siendo la expresión mucho menos intensa en nervio ciático intacto tanto en **epineuro** como en **perineuro**. Se ha objetivado también la presencia de ApoD en **adipocitos** y **pericitos**[2].



Estos datos acerca de la expresión de ApoD en el sistema nervioso periférico han sido estudiados en modelo animal, pero no se conocen estudios sobre su expresión en humano.

1.1.4. Perspectivas y enfoque en la investigación sobre ApoD

- Consecuencias del proceso lesivo en el SNP

Ante un proceso lesivo, independientemente de su origen (traumático, degenerativo, inflamatorio, vascular, metabólico...), acontece en el nervio periférico una “degeneración-regeneración Walleriana (WDR)”, proceso en el que la porción del nervio distal a la lesión se desintegra[8]. A continuación, las células de Schwann se colocan formando largos cordones celulares rodeados de lámina basal que servirán de guía para el crecimiento de un axón en regeneración. Estas estructuras se denominan bandas de Büngner, y pueden considerarse una banda endoneural primitiva[9]. El cabo proximal empieza a regenerarse a lo largo de las bandas de Büngner para tratar de alcanzar su órgano diana, siendo crucial para la reconstrucción la preservación de continuidad de las envolturas de tejido conjuntivo.

Durante este proceso de degeneración Walleriana se produce una fagocitosis por parte de macrófagos y células de Schwann[10] hacia los detritus celulares y restos de mielina, y una estimulación de la producción de factores de crecimiento que contribuyan a crear un microambiente propicio para la posterior regeneración axonal y la remielinización.

En este proceso participan tanto macrófagos residentes como infiltrantes. En nervio ciático seccionado se ha observado que la acumulación de macrófagos es predominante en el epineuro en los primeros días post lesión, y que alcanza su pico en el día 14 post lesión, momento en el que se concentran en endoneuro[11].

Implicación de la Apolipoproteína D

Es un hecho demostrado que ApoD interviene en la regeneración Walleriana. El cómo y cuándo está en estudio. Garcia-Mateo y cols. han estudiado el papel de esta lipocalina en la fase temprana de la WDR (7 días después de lesión) confirmando que interviene tanto en la activación de la fagocitosis de residuos de mielina como en la posterior degradación de esta intracelularmente.

- El proceso de activación de la fagocitosis mediado por ApoD resulta más eficiente: citoquinas como TNFA y MCP1 presentan un pico de expresión post lesión en presencia de ApoD en contraste con la expresión sostenida en ausencia de la lipocalina. Una óptima regulación de expresión de señalizadores de activación fagocitaria como la galectina-3 es dependiente de ApoD. Es decir, en ausencia de ApoD la fagocitosis de la mielina requiere de una mayor y menos



específica actividad pro-inflamatoria, lo que conlleva un retraso de la misma. Esta acción fagocítica es llevada a cabo tanto por macrófagos infiltrantes como residentes, y por las propias células de Schwann tras expresar ciertas modificaciones fenotípicas.

- Una vez fagocitados los residuos de mielina, en ratones ApoD-KO, su degradación ha demostrado un inicio retardado y un proceso más lento con mayor acumulación tanto de macrófagos como de grandes fragmentos mielínicos en su interior[12].

Además, Apo D cumple un papel homeostático ante las alteraciones producidas por una lesión nerviosa que, independientemente del origen lesional, acarreará un estrés oxidativo con la consiguiente producción de hidroperóxidos y lipoperóxidos. Tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, Apo D controla el acúmulo de estos residuos procedentes de la degradación de ácidos grasos. Prueba de ello, se ha comprobado que los ratones ApoD KO presentan signos de neurodegeneración a los 3 meses de vida, presentando daño oxidativo y defectos en la homeostasis proteica en cortex e hipocampo.

- **Re-mielinización**

Tras la necesaria eliminación de mielina, comienza el proceso de re-mielinización. Las células de Schwann son susceptibles de sufrir cambios fenotípicos[13] que primero las capacitan para la fagocitosis específica de mielina y posteriormente para la remielinización. Uno de los pasos fundamentales para posibilitar una óptima función de la mielina es la compactación de sus capas. Es conocido que la proteína MBP interviene en la compactación intracelular, pero el proceso de compactación extracelular sigue siendo motivo de estudio. Para que se produzca es necesaria la eliminación del glicocálix, que por su carácter hidrofílico mantiene las membranas separadas e impide la interacción proteína-proteína.

Implicación de la Apolipoproteína D

Las sialidasas son las enzimas encargadas de la eliminación del glicocálix. Se encuentran tanto en lisosomas (NEU1) como en la membrana (NEU3), y su localización está relacionada con la expresión de ApoD. Se adjudica a ApoD la función de mantenimiento de la membrana lisosomal que les mantiene impermeables y con un pH óptimo, requisitos imprescindibles para la función de las sialidasas y el tráfico lisosoma-



membrana. En ausencia de ApoD, el glicocáliz es menos hidrofóbico y más rico en ácido siálico.

Al contrario que la eliminación de residuos mielínicos, que se produce en fases tempranas tras la lesión, el proceso de compactación acarrea consecuencias más tardías, en la fase de maduración de la mielina. Se ha demostrado que la ausencia de ApoD conlleva una compactación deficiente de la cara extracelular de la vaina de mielina, evidenciado al medir el diámetro del axón. Esto produce unas consecuencias funcionales, ya que se reduce significativamente la velocidad de conducción nerviosa, comprometiendo el aprendizaje de tareas motoras. Bioquímicamente también hay alteraciones: las proteínas Plp y PO que se encargan de mantener la compactación de las hojas extracelulares una vez producida, disminuyen su expresión[14].

1.2. JUSTIFICACIÓN:

Este trabajo se planteó con el objetivo de reproducir el estudio de expresión de la Apolipoproteína D realizado en ratones en tejido periférico nervioso humano sano, buscando comparar su expresión.

Se propone el estudio de la expresión de ApoD en nervio periférico humano en estado basal (sin enfermedad ni lesión nerviosa) como paso previo al estudio de su expresión en la enfermedad neurodegenerativa humana.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de ApoD en muestras de tejido nervioso periférico humano sano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

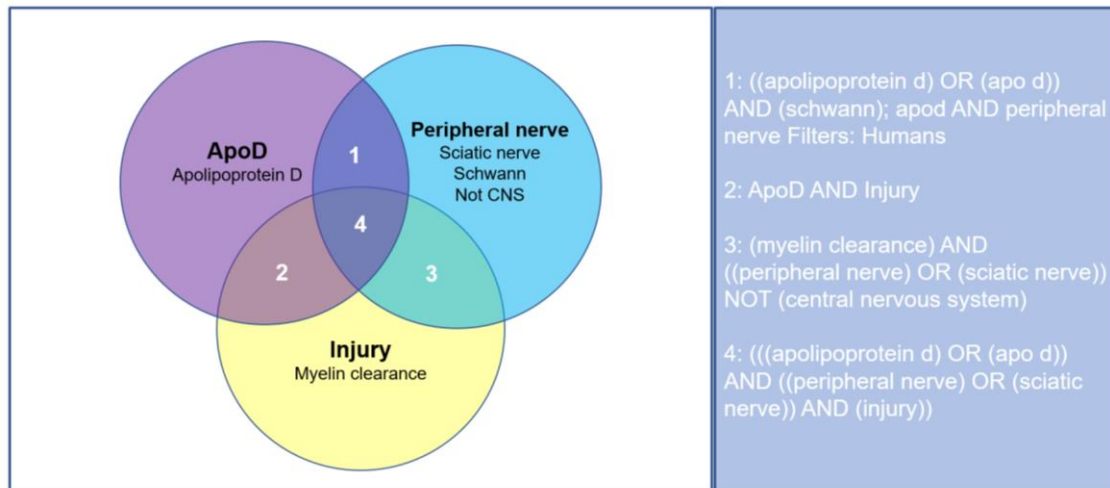
- Caracterizar los tipos celulares que expresan ApoD en el nervio periférico humano sano.
- Interpretar los resultados de expresión de ApoD en humano en función de la información existente en el ratón como modelo animal experimental.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrategia de búsqueda bibliográfica:

Para una primera búsqueda bibliográfica se establecieron tres campos principales sobre los que obtener información: la Apolipoproteína D (sus características, estructura

molecular, función e interés), la estructura del SNP, y el proceso de lesión y regeneración nerviosa. Se seleccionó un total de 40 artículos, de los cuales se descartaron 23 estableciendo como filtros: “Filters: Clinical Trial, Review, Systematic Review”, “Filters: Humans” y aquellos con un enfoque demasiado específico en patología del SNC. La búsqueda bibliográfica se fue cumplimentando a medida que fue necesario ampliar información acerca de puntos concretos.



3.2 Selección de sujetos

Los controles son pacientes a los que por sospecha de enfermedad neurodegenerativa se somete a cirugía con toma de biopsia de nervio sural, y en los que el resultado de la anatomía patológica descarta patología.

- *Criterios de inclusión:*

Pacientes en estudio de enfermedad neurodegenerativa sometidos a biopsia de nervio sural.

- *Criterios de exclusión:*

Procedimiento quirúrgico contraindicado por patología médica concomitante (Cáncer terminal, infección activa, edad avanzada). La biopsia de nervio periférico, además de ser un procedimiento invasivo, no siempre aporta información que no pudiera haberse obtenido mediante otras pruebas y procedimientos diagnósticos. Se emplea para corroborar la sospecha clínica cuando la historia del paciente, los hallazgos de la exploración física y la información de la electromiografía no han sido concluyentes. Se excluyen por lo tanto todos los pacientes a los que no se les realizó esta intervención por no estar indicada.

El nervio sural es un nervio sensitivo, por lo que no es el ideal en neuropatías motoras en las que el radial o el peroneo profundo son de elección.



3.3 Metodología: Obtención de muestras

Las muestras fueron recogidas por el servicio de Neurocirugía del HCUV tras las intervenciones, y almacenadas en el banco de muestras del servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital. Disponemos para este trabajo de fin de Grado de 4 muestras control en las que no existe evidencia anatomo-patológica de enfermedad neurodegenerativa. Una de ellas presenta alteraciones compatibles con enfermedad inflamatoria (vasculitis).

Este protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (ceic) Área de salud Este de Valladolid. Se obtuvo el consentimiento de los pacientes para formar parte de este estudio por vía telefónica.

3.4 Metodología: Procesamiento de las muestras

3.4.1 Fijación e inclusión en parafina

Los trozos de tejido se introducen en solución de formaldehído al 4%. Para obtener una óptima fijación, esta debe realizarse lo antes posible tras la extracción. Tras el proceso de deshidratación, en el que la muestra pasa desde agua por diluciones progresivamente más concentradas de etanol hasta llegar al 100%, el molde que contiene la muestra es rellenado con parafina líquida. Este proceso se realizó en el servicio de Anatomía Patológica del HCUV de manera automatizada.

3.4.2 Tallado

Los bloques de parafina fueron tallados en el servicio de Anatomía Patológica del HCUV. Las secciones se colocaron sobre agua calentada a unos 40 °C de forma que calor estirase las secciones sin llegar al punto de fusión de la parafina. Una vez que el agua se hubo evaporado y estuvieron extendidas las tiras sobre el portaobjetos se procedió a un secado en una estufa a 37 °C. Utilizamos cortes seriados de parafina de 2,5 µm de espesor.

3.4.3 Desparafinación e hidratación del tejido

Tras seleccionar las muestras a estudiar, colocamos los portas en una cestilla y los pasamos por una batería de cubetas para IHC. Se comienza con dos cubetas que contienen xileno para retirar la parafina del tejido (desparafinado) en la que las muestras permanecen cinco minutos por cubeta. Es importante durante todo el proceso evitar que las muestras se sequen. Que las muestras se sequen producirá una unión más inespecífica del anticuerpo y por lo tanto una mayor tinción del fondo. Un proceso incompleto de desparafinación conlleva muestras pobremente teñidas.



Posteriormente, se hidrata la muestra pasando por una batería de alcoholes de concentración decreciente hasta llegar a la cubeta final con agua destilada (EtOH 100% → EtOH 100% 2 → EtOH 96% → EtOH 70% → agua destilada (dH₂O)). Las muestras permanecen también cinco minutos por cubeta. Al terminar el recorrido, cambiamos las muestras a una cestilla apta para cocción, colocándolas de forma horizontal.

3.4.4 Desenmascaramiento de los antígenos

El objetivo de este paso es romper los puentes metileno creados durante la fijación que podrían enmascarar los sitios de unión a antígeno. Para ello elaboramos un “tampón de recuperación de antígenos” que contiene 2,94 g/L de citrato de sodio (C₆H₅O₇Na₃), y HCl 37% hasta obtener una disolución a pH 6,0. Llevamos la disolución a ebullición e introducimos en ella las muestras dentro de una cestilla metálica durante 10 minutos. Dejamos enfriar a temperatura ambiente la disolución durante 30 minutos y, una vez transcurrido este tiempo, transferimos las muestras a una cubera de histología (Koplin) con dH₂O.

3.4.5 Tinción inmunohistoquímica

Antes de realizar la tinción son necesarios dos pasos:

- Permeabilización de las muestras: reducir la tensión superficial para permitir la entrada de las siguientes soluciones. Utilizamos Tampón fosfato Salino pH7,4 (PBS) y como detergente Tritón X-100 (Tx100) al 0,25%.
- Bloqueo: cubrir las inmunoglobulinas endógenas del tejido con suero procedente de la especie en la que se produjeron los anticuerpos secundarios para evitar que estos se unan a epítomos inespecíficos. Utilizamos suero de cabra (GS; 1%) para el tejido humano y suero fetal bovino para el tejido de ratón. Con este paso también conseguimos minimizar la unión al receptor Fc de los anticuerpos primario y secundario.

Tras realizar dos lavados en PBS de las muestras, las cubrimos con PBS-Tx100 0,25% y solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Todas las incubaciones deben ser realizadas en una cámara húmeda para evitar que se seque el tejido. Cubrimos el porta con la cantidad necesaria de la dilución de anticuerpo primario (TABLA1) en PBS e incubamos a 4°C toda la noche.

Pasadas 24 horas realizamos en el Koplin tres lavados de 5 minutos con PBS y reintroducimos los portas a la cámara húmeda, añadiendo sobre cada uno la cantidad necesaria de la dilución adecuada del anticuerpo secundario en PBS Tx100 (0.25%). El anticuerpo secundario requiere de una incubación de dos horas a temperatura ambiente. El Ab 2º está unido a un fluoróforo, por lo que se detectará mediante fluorescencia. Los

núcleos están marcados con colorante fluorescente de ADN Hoechst en concentración 1:15000. Lavamos con PBS 3 veces 5 minutos cada vez y las muestras están listas para su visualización.

Nº	Ac primario	[]	Ac secundario	[]	Ac primario	[]	Ac secundario	[]
#6a	M-mAb- α -S100 (Sigma)	1:100	Goat- α -Mouse IgG-Alexa 488 (green) (Jackson)	1:1000	Policlonal-Rabbit- α -HumanApoD [1]	1:1000	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 594 (Jackson)	1:1000
#6b	Policlonal-Rabbit- α -S100 (zymed)	1:100	Goat- α Rabbit IgG Alexa 488 (Jackson)	1:1000				
#8	M-mAb- α -S100 (Sigma)	1:50	Goat- α -Mouse IgG-Alexa 594 (red) (Jackson)	1:1000	Policlonal-Rabbit- α -HumanApoD [1]	1:1000	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#4	M-mAb- α -S100 (Sigma)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal-Rabbit- α -HumanApoD [1]	1:1000	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#10	M-mAb- α -S100 (Sigma)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal-Rabbit- α -HumanApoD [1]	1:1000	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#7	M-Mouse- α -HApoD (2b9)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal Rabbit- α -S100 (zymed)	1:250	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#2	M-Mouse- α -HApoD (2b9)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal Rabbit- α -S100 (zymed)	1:250	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#9	M-Mouse- α -HApoD (2b9)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal Rabbit- α -S100 (zymed)	1:250	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
Mouse sciatic	Goat polyclonal anti-mouseApoD (Santa Cruz Biotechnology)	1:200	Donkey anti-Goat IgG.Alexa 594 (Jackson)		Policlonal Rabbit- α -S100 (zymed)	1:250	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#5a	M-Mouse- α -HApoD (2b9)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	-----		Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#5b	M-Mouse- α -HApoD (2b9)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal Rabbit- α -S100 (zymed)	1:250	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#1a	-----		Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	-----		Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#1b	M-Mouse- α -HApoD (2b9)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal Rabbit- α -S100 (zymed)	1:250	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#3a	-----		Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	-----		Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000
#3b	M-Mouse- α -HApoD (2b9)	1:50	Goat- α -Mouse IgG Alexa 594	1:1000	Policlonal Rabbit- α -S100 (zymed)	1:250	Goat- α -Rabbit IgG-Alexa 488	1:1000

Tabla 1. Concentración y fuente de los Anticuerpos utilizados.

3.4.6 Tinción histológica

Con el fin de observar la estructura histológica del nervio periférico se llevó a cabo la tinción con Hematoxilina-Eosina de algunas de las muestras de humano y de ratón.

3.4.7 Procesamiento de imágenes

Procesamiento de imágenes Las imágenes son tomadas a partir de un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i con una cámara digital Nikon DS-Fi3, visualizadas con NIS- Elements Viewer y procesadas con el editor de imagen Fiji (ImageJ).

4. RESULTADOS

4.1 Estudio histológico de nervios periféricos murinos y humanos

Para este estudio realicé una tinción histoquímica de Hematoxilina-Eosina en secciones de parafina para comprobar la estructura de las muestras estudiadas (FIGURA 2). Se compararon cortes de nervio ciático de ratón (paneles A y B). En el panel A se aprecian dos fascículos del nervio y el grosor de las cubiertas perineurales. Las fibras nerviosas adoptan su patrón característico, disponiéndose en paralelo al eje del nervio, y los núcleos aplanados de las células de Schwann se observan entre los axones.

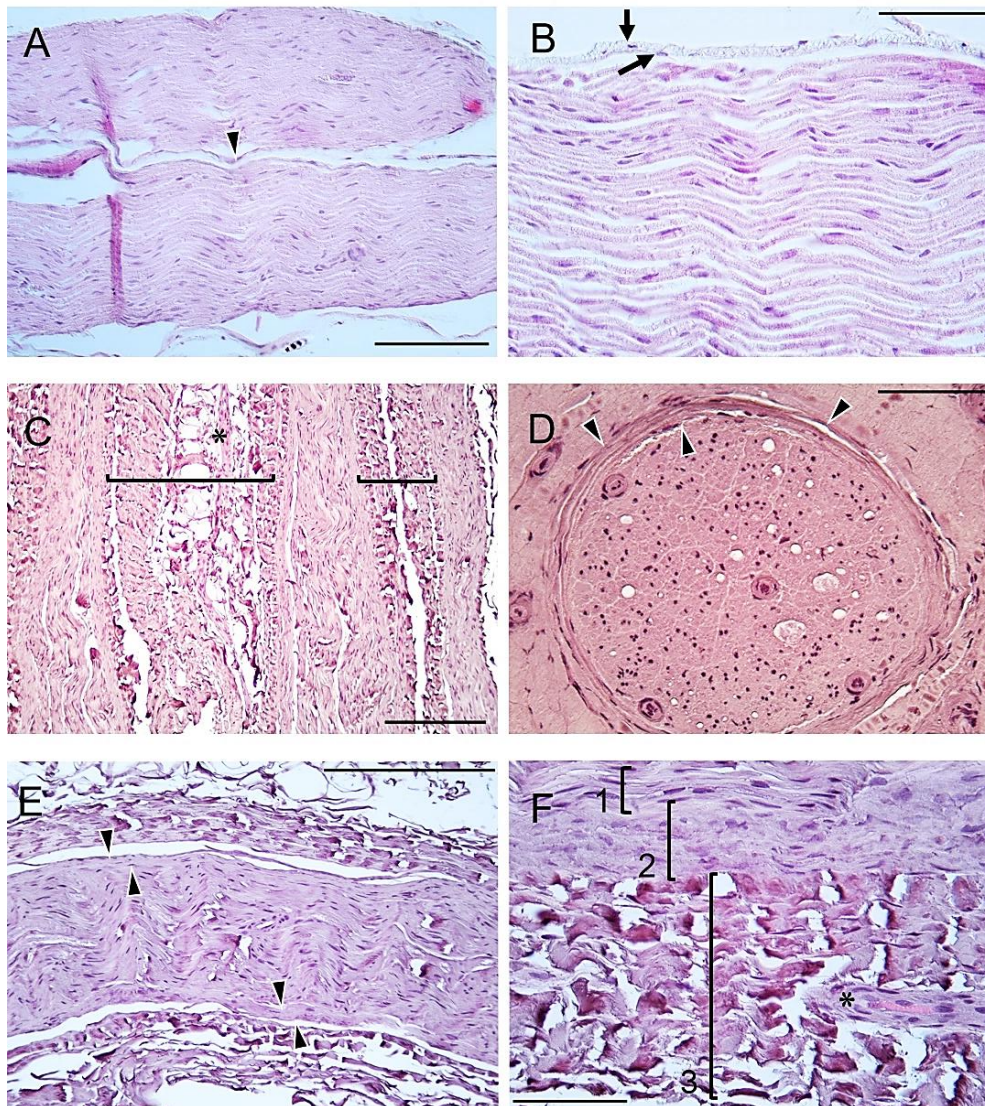


Figura 2. Tinción histoquímica de Hematoxilina-Eosina en nervio ciático de ratón (A, B) y nervio sural humano (C-F). **A.** Corte longitudinal. Las fibras nerviosas adoptan su característica forma ondulante. Los dos fascículos están separados por una fina capa de tejido conjuntivo (punta de flecha). **B.** Corte longitudinal. Se distinguen los alargados núcleos de células de Schwann dispuestos entre los axones, y los núcleos de fibroblastos en el perineuro (flechas). **C.** Corte longitudinal. Se distinguen tres fascículos separados entre sí por tejido conectivo (señalados con corchetes) por el que discurren vasos (*). **D.** Corte transversal. Se distingue un fascículo rodeado por el perineuro (punta de flecha) y por una gruesa capa de epineuro. **E.** Corte longitudinal. El epitelio perineural (punta de flecha) rodea a los axones, y por fuera se distingue abundante tejido conectivo. **F.** A más aumento se evidencia la diferencia entre los axones (1), el perineuro (2) y el tejido conectivo (3). Se distingue un vaso (*). Barras de calibrado: A 100 µm; B, D, E, F: 50 µm; C: 150 µm.



En las muestras de nervio sural humano se aprecian notables diferencias en cuanto al grosor de las cubiertas conjuntivas que rodean a los fascículos (ver panel C). No solo es más espesa la capa de tejido conjuntivo denso sino el número de capas celulares en el epitelio perineural (ver panel D). En los cortes longitudinales de nervio humano se evidencia una elevada cantidad de núcleos de células de Schwann (ver panel E). A más aumento se distinguen las capas anteriormente mencionadas: los axones en la zona central, el epitelio perineural adyacente a ellos y las fibras colágenas de tejido conjuntivo denso del epineuro en la periferia (ver panel F).

4.2 Inmunofluorescencia: nervio ciático de ratón

En las tinciones inmunohistoquímicas de fluorescencia realizadas en tejido de ratón usé los anticuerpos G α M-ApoD para localizar células que expresan ApoD y Rb α H-S100 [12] que reconoce la proteína S100 de ratón, un marcador de células de Schwann que en esta imagen se presentan con inmunofluorescencia verde en un corte longitudinal del nervio. En los paneles A, B y C (FIGURA 3) se observa la expresión de ApoD en un número limitado de células de Schwann, que se evidencia por la colocalización de ambos marcajes con una fluorescencia amarilla. Los axones discurren paralelamente, envueltos por la mielina de las células de Schwann. En la zona periférica, y recubriendo los fascículos, se encuentra el perineuro que no muestra marcaje de S100 o de ApoD. Esta capa es más fina en ratón que en humano. En la zona más externa se distinguen células de forma redondeada y núcleo desplazado del centro, morfología típica de los adipocitos que rodean el tejido nervioso, y que presentan marcaje para ApoD (ver panel D) [15].

En concordancia con la bibliografía existente en la que ApoD presenta en ratón una mayor expresión en endoneuro que en perineuro y epineuro [7], obtenemos imágenes sin clara expresión de ApoD en las cubiertas externas del nervio (ver panel D).

Los núcleos de células de Schwann, visibles en mis preparaciones por el marcaje con fluorescencia azul de Hoechst, se visualizan distribuidos aleatoriamente en todo el grosor de las muestras. El citoplasma de las células de Schwann rodea al axón, pero el núcleo aplanado se dispone en una zona concreta de la célula, por lo que en un corte longitudinal no visualizaremos todos los núcleos. El marcaje de ApoD se localiza en zonas restringidas de algunas células de Schwann, localizado con mayor intensidad alrededor al núcleo (ver panel F).

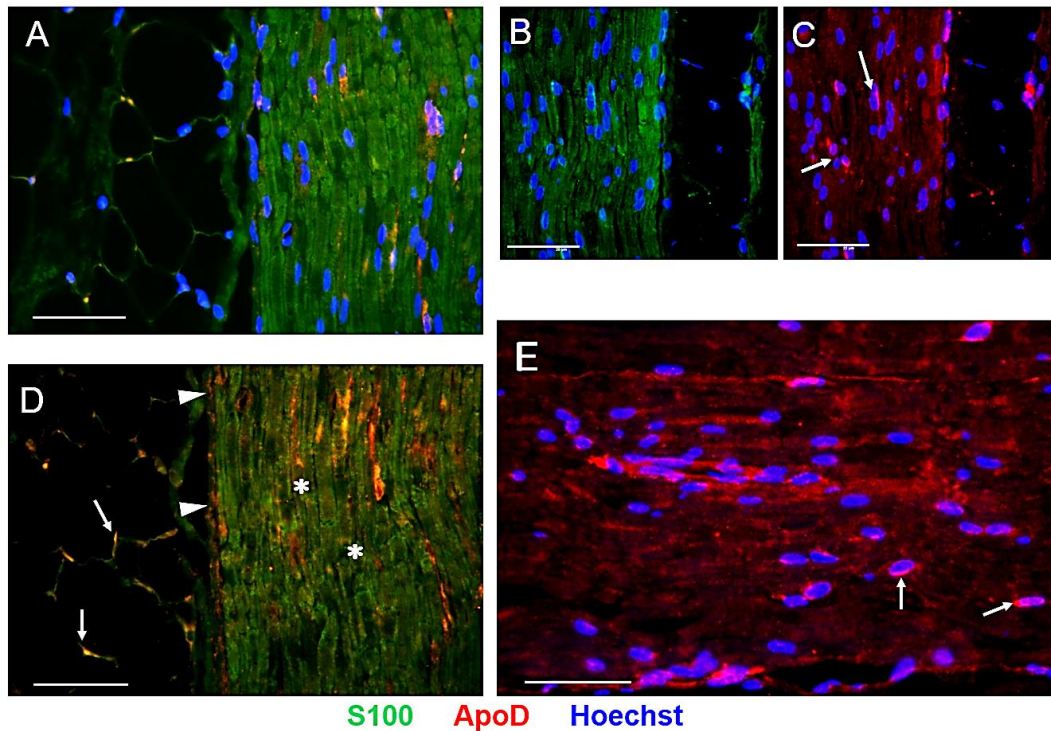


Figura 3. Inmunofluorescencia en nervio ciático de ratón con anticuerpos anti-S100 y anti-ApoD. **A.** En un corte longitudinal se visualizan los axones marcados en verde por S100 y una zona de tejido adiposo con escasa celularidad a la izquierda de la imagen. **B.** En la zona más periférica del tejido nervioso se sitúa el perineuro que agrupa cada fascículo. **C.** El marcaje de ApoD se dispone en zonas adyacentes a los núcleos de células de Schwann (flecha). **D.** La co-localización de S100 y ApoD en las células de Schwann se aprecia en color amarillo. Se pueden distinguir los nodos de Ranvier de los axones (*). Se aprecia marcaje de ApoD en el perineuro (punta de flecha) y en el tejido adiposo (flechas blancas). **E.** ApoD se concentra en las células de Schwann en zonas cercanas al núcleo (flechas). Barras de calibrado: 40 μm .

4.3 Expresión de ApoD en nervio sural humano

Se realizó según el procedimiento indicado en la sección “materiales y métodos” una tinción de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos $\text{M}\alpha\text{H-S100}$, $\text{Rb}\alpha\text{H-ApoD}$, y Hoechst como colorante de núcleos (FIGURA 4).

En los cortes transversales de nervio sural humano se distinguen las cubiertas conjuntivas del nervio, que presentan intensa fluorescencia verde correspondiente a ApoD (panel A). Se observan también algunos fibroblastos del perineuro encargados de la síntesis de colágeno que presentan marcaje para ApoD (panel B). Los axones se ven como espacios vacíos sin fluorescencia rodeados de la vaina de mielina y en algunas zonas de vesículas llenas de ApoD (panel C). ApoD es una proteína extracelular que se sintetiza en células de Schwann y fibroblastos en el sistema nervioso periférico. En cambio, la proteína S100 se localiza en el citoplasma y/o el núcleo. En los cortes transversales se aprecia mejor la distribución de ApoD en el compartimento intracelular

de la célula de Schwann. En estas imágenes, ApoD y S100 se expresan con un patrón mutuamente excluyente en el interior del citoplasma de las células de Schwann. En un corte longitudinal a gran aumento (panel D) podemos apreciar esta distribución intracelular de ApoD y su colocalización con S100: en esta célula de Schwann se observa cómo ApoD se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas.

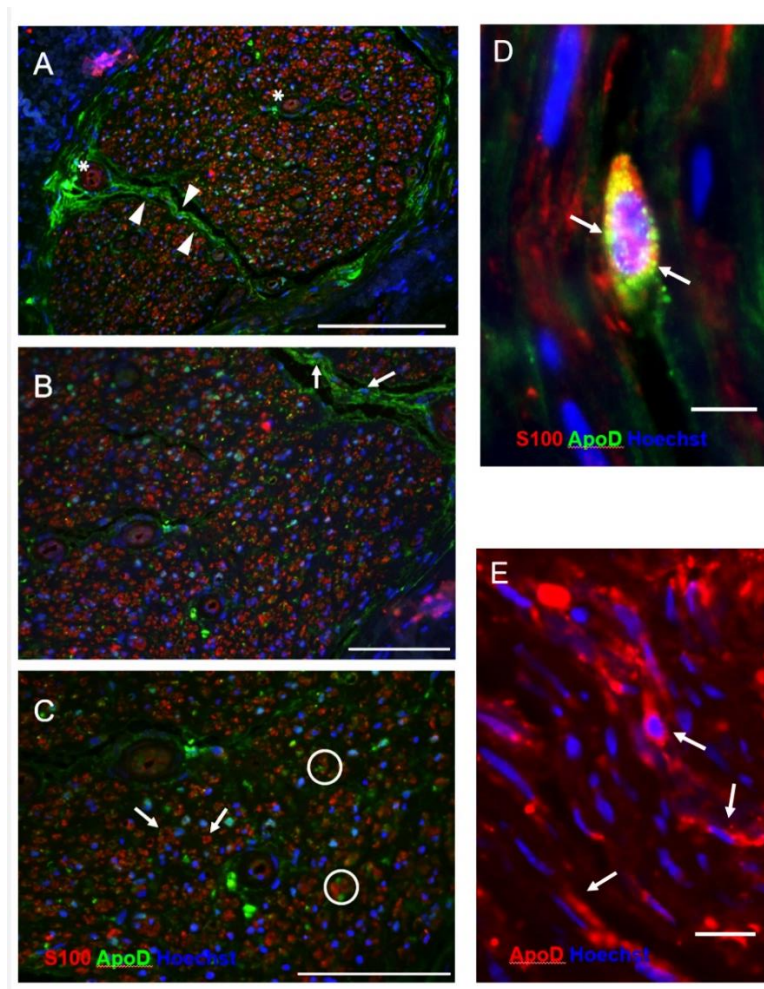


Figura 4. Inmunofluorescencia de nervio sural humano con anticuerpos anti-S100 y anti-ApoD. **A.** Corte transversal. El marcaje de ApoD se observa en la vaina perineural que separa los dos fascículos (puntas de flechas). Abundantes vasos discurren paralelos a los axones (*). También alrededor de ellos se encuentran células con fluorescencia intensa para ApoD. **B.** En el perineuro se observan fibroblastos con marcaje para ApoD (flechas). **C.** A mayor aumento se distingue marcaje de S100 rodeando los espacios vacíos correspondientes al axón (flechas). ApoD y S100 se co-localizan en algunas células de Schwann, pero de forma mutuamente excluyente dentro de la célula (círculo) en estas secciones transversales del axón. **D.** Corte longitudinal. Co-localización de S100 y ApoD en la célula central. Se distinguen vesículas intracelulares (flechas) con ApoD que co-localizan con el marcaje citoplasmático de S100 en la célula de Schwann. **E.** Corte longitudinal. ApoD se localiza en zonas adyacentes al núcleo de las células de Schwann (flechas). Barras de calibrado: A: 100 µm; B, C: 50 µm; D: 10 µm; E: 20 µm.

Las células de Schwann de nervio sural humano aparecen con su típica morfología de núcleo alargado y citoplasma extenso rodeando al axón. ApoD, al igual que en el nervio ciático de ratón, se concentra en zonas adyacentes a los núcleos. La diferencia en el número de células de Schwann con respecto a las muestras de ratón es notable. Los cortes de las muestras humanas son de 2,5 micras mientras la muestra de ratón tiene un grosor de 4 micras. Estudios que evalúan cómo distintos factores favorecen la regeneración axonal tras sección en modelos animales utilizan la celularidad y la abundancia de células de Schwann como indicadores de mayor regeneración[16].

Para confirmar el patrón de expresión de ApoD y su colocalización con el marcador S100, repetimos el procedimiento utilizando distintos anticuerpos: Rb α H-S100 y el monoclonal M α H-ApoD (FIGURA 5).

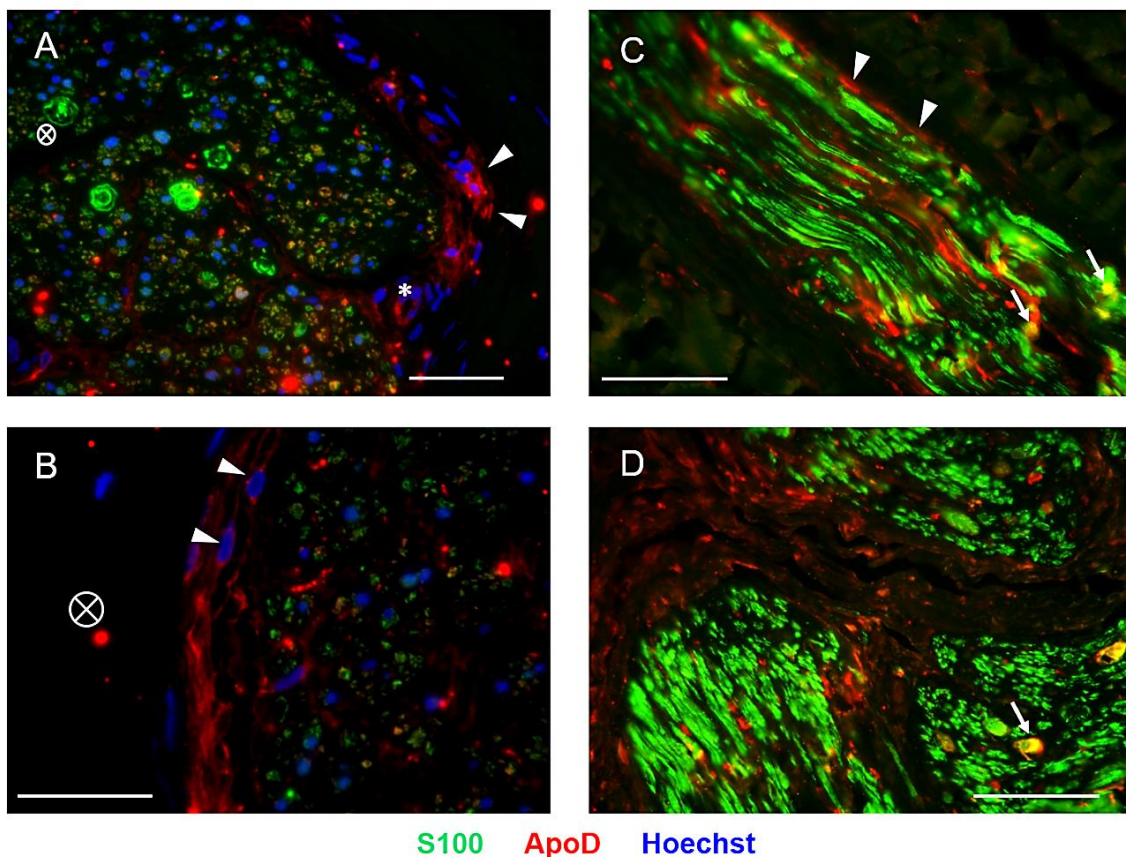


Figura 5. Inmunofluorescencia de nervio sural humano con anticuerpos anti-S100 y anti-ApoD. **A.** Corte transversal. Se distinguen los distintos fascículos agrupados por la cubierta perineural (punta de flecha) que presenta abundante marcaje para ApoD. Se observan también vasos (*). **B.** Corte transversal. Se distinguen células del epitelio perineural (punta de flecha). **C y D.** Cortes longitudinales. Los fascículos de axones aparecen rodeados de tejido conjuntivo laxo. Las flechas blancas señalan puntos de colocalización de ApoD y S100 en algunas células de Schwann. Los fibroblastos del perineuro presentan fluorescencia correspondiente a ApoD. El símbolo ⊗ en A y B señala artefactos técnicos de marcaje. Barras de calibrado en A, B: 25 μ m; C, D: 50 μ m.

El patrón de marcaje con estos nuevos anticuerpos es similar al descrito anteriormente. Un subconjunto de células de Schwann expresa ApoD, como se observa por la co-localización establecida por la fluorescencia amarilla (paneles A-D). Así mismo, tanto el epineuro como el endoneuro contienen fibroblastos formadores de tejido conjuntivo que expresan ApoD. El núcleo de dos células del epitelio perineural (panel B) presentan intensa fluorescencia de ApoD en su interior. En cortes transversales (paneles A y B) se pueden distinguir los fascículos agrupados y envueltos en perineuro, y todos ellos rodeados por una capa más gruesa correspondiente con el epineuro. Existe además una mayor concentración de marcaje de ApoD en las zonas adyacentes a los vasos sanguíneos (panel A).

Los paneles C y D de la figura 4 muestran cortes longitudinales de nervio sural en los que no se han marcado los núcleos con Hoechst. Se puede distinguir claramente la co-localización de ApoD en células de Schwann. En la periferia del fascículo hay una zona no fluorescente que se corresponde con el tejido conectivo denso que rodea el haz nervioso. En el panel D, se distingue entre los fascículos el perineuro con células que expresan ApoD.

4.4 Control de especificidad de anticuerpos secundarios

Con el objetivo de evaluar la especificidad de unión de los anticuerpos secundarios empleados en este trabajo, se llevó a cabo un control negativo con doble incubación de anticuerpos secundarios en una muestra de nervio sural (FIGURA 6). Se eligió una zona de tejido nervioso con abundante celularidad para el control del anticuerpo $G\alpha Rb$ -IgG-Alexa 488 (panel A) y una zona de tejido adiposo, que también presenta marcaje para ApoD para el anticuerpo $G\alpha M$ -IgG-Alexa-594 (paneles B y C), comprobando que no existe fluorescencia en ausencia de los anticuerpos primarios $Rb\alpha$ -S100 y $M\alpha$ -ApoD.

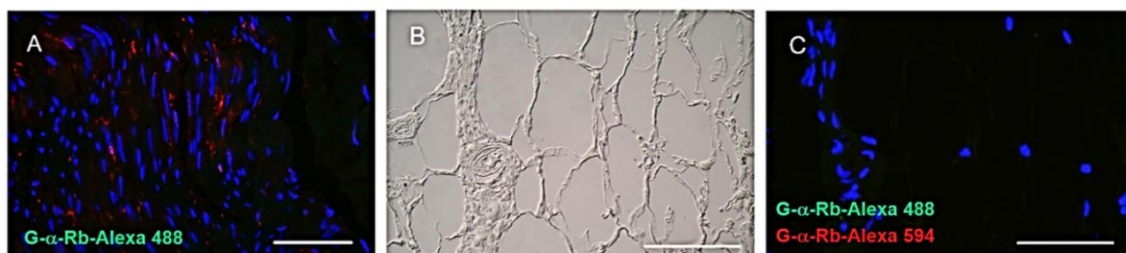


Figura 6. Inmunofluorescencia de control negativo para los anticuerpos secundarios usados en muestras de nervio sural humano. A. Control negativo para el anticuerpo secundario $G\alpha Rb$ IgG-Alexa 488. La fluorescencia roja corresponde a ApoD. **B.** Imagen de Nomarski de una zona de tejido adiposo. **C.** Control negativo para $G\alpha Rb$ IgG-Alexa 488 y $G\alpha M$ IgG-Alexa 594 en la misma muestra de tejido adiposo. Los núcleos de A y C se marcaron con Hoechst. Barras de calibrado en A, B, C: 40 μ m.



5. DISCUSIÓN

En este trabajo he estudiado el patrón de expresión de ApoD en nervio periférico humano en comparación con su expresión en un modelo animal (ratón), y en comparación con lo descrito en la literatura. Existen algunos resultados que merecen discusión:

1) Se ha observado que, en contraposición con las muestras de modelo animal, donde ApoD abunda en el endoneuro, el marcaje de ApoD en humanos predomina en perineuro y epineuro. No es esta la única diferencia: la intensidad de marcaje en el perineuro es notoriamente mayor que en muestras de ratón. La diferencia en grosor de estas envueltas conjuntivas no es suficiente para explicar esta tan llamativa diferencia de intensidad de fluorescencia para ApoD. La presencia de ApoD en estas regiones del nervio es atribuible a los fibroblastos que forman el perineuro y a los fibroblastos y adipocitos del epineuro, que son tipos celulares para los que se ha descrito la expresión de ApoD [2].

Se sabe que los fibroblastos de nervio periférico ejercen un papel en la diferenciación de las células de Schwann que ocurre durante el proceso de regeneración del nervio [17] y están en estudio las diferencias en el efecto promotor del crecimiento neuronal que pueden existir entre fibroblastos de nervios motores y sensitivos. Un estudio que realizó un ensayo de co-cultivo de fibroblastos y neuronas mostró que los fibroblastos sensoriales promueven el crecimiento de neuronas sensoriales a mayor escala que los motores [18]. Planteo para estudios futuros que la diferencia en el tipo de nervio periférico estudiado (el nervio sural humano es exclusivamente sensitivo, mientras que el nervio ciático de ratón es mixto) pueda explicar parte de los hallazgos acerca de la distinta expresión de la Apolipoproteína D en perineuro humano y de ratón.

2) Se observa también que existe una mayor intensidad de tinción en las zonas adyacentes a los vasos sanguíneos. En un estudio en el que se estudió mediante inmunocitoquímica la expresión de ApoD en el cerebro humano se observó una mayor inmunorreactividad en el citosol de las células perivasculares y los lisosomas de los pericitos en las paredes de los vasos sanguíneos. En este estudio se sugirió un potencial papel de las células gliales y ApoD en el transporte de esteroides y pequeñas moléculas hidrofóbicas hacia o desde los vasos sanguíneos en la corteza [19]. La expresión de ApoD en pericitos se ha confirmado en el cerebro de ratón [20]. Así mismo, se ha comprobado que en el SNC los astrocitos no dañados secretan vesículas extracelulares que contienen compuestos neuroprotectores, entre ellos el factor de crecimiento de fibroblastos-2, el factor de crecimiento del endotelio vascular, y ApoD [21]. Estas



vesículas extracelulares se forman intracelularmente en un proceso en el que participa el compartimento endo-lisosomal, en el que también se ha encontrado ApoD [22]. Por lo tanto, y por analogía con el proceso regenerativo en el SNC, resulta razonable la elevada expresión de Apolipoproteína D humana evidenciada en fibroblastos y células perivasculares del nervio periférico como parte de estas vesículas de secreción.

3) Una de las formas de identificar a la célula de Schwann como productora de ApoD en nuestros experimentos de inmunofluorescencia es que en estas existe co-localización de las proteínas S100 y ApoD, por lo que en los cortes longitudinales se observa una fluorescencia de color amarillo debida a la superposición de la fluorescencia de los dos anticuerpos secundarios. Tanto en las muestras de nervio periférico de ratón elegidas para este estudio, como en las referenciadas por la mayor parte de la literatura, se emplean cortes longitudinales de nervio periférico. Entre las muestras humanas cedidas por el HCUV para la realización de este trabajo disponemos de varias secciones (todas pertenecientes al mismo paciente) en las que se realizaron cortes transversales. Es en estas muestras transversales de humano donde mejor se observa el patrón excluyente de S100 y ApoD en el interior de la célula de Schwann. Esto puede deberse a la distinta distribución de estas proteínas dentro de la célula: S-100 es una proteína de bajo peso molecular fijadora de calcio que se expresa en células derivadas de la cresta neural (células de Schwann, melanocitos y células gliales), donde ocupa el citoplasma y/o el núcleo celular ([23]). Mientras tanto, ApoD no se encuentra libre en el citoplasma, sino que es una molécula extracelular que aparece en el interior de la célula de Schwann incluida en lisosomas y vesículas de secreción.

El papel de la proteína S100 en el nervio periférico humano está en estudio. Se sabe que esta familia de proteínas diméricas ligadoras de calcio participan en procesos de diferenciación, crecimiento celular, división celular, transcripción y señalización a través de proteínas de membrana[24], y formando complejos con otras proteínas de unión a calcio podrían tener un papel en la fusión, la organización y el tráfico de membranas[25].

Otra forma de distinguir a las células de Schwann es por su núcleo aplanado, que se distingue al marcarlo con el colorante Hoechst. En el nervio ciático humano impresiona la elevada densidad de núcleos de células de Schwann comparada con las muestras de ciático de ratón. Las imágenes obtenidas con el mismo aumento presentan mayor celularidad, y el grosor de las secciones es mayor en ratón. Existen estudios en los que para evaluar cómo distintos factores favorecen la regeneración axonal tras la sección de nervio en modelos animales utilizan la celularidad y la abundancia de células de Schwann como indicadores de mayor regeneración[16].



Este hallazgo puede deberse a una distinta proporción de fibras mielínicas y amielínicas entre nervio ciático y sural, y entre nervio periférico humano y de ratón. Además, pese a tener la célula de Schwann una morfología nuclear característica, puede que no todos los núcleos que se visualizan en el endoneuro correspondan con este tipo celular. Recordamos que los fibroblastos tienen también un núcleo de forma alargada. Otros tipos celulares que podemos encontrar en el endoneuro son macrófagos residentes ocasionales. Otros factores como el tipo de fibras nerviosas o la edad de los controles no han sido valorados, por lo que no podemos afirmar que estas diferencias sean debidas a la especie.

VARIABLES como la edad y el sexo son controladas en el caso de las muestras obtenidas a partir de un modelo animal, pero no en el de las muestras de pacientes humanos. Sabemos con certeza que los ratones estudiados son controles, pero en cuanto a las muestras humanas utilizadas, nos encontramos en una situación distinta. Pese a no presentar las muestras cambios propios de enfermedad neurodegenerativa (confirmado por el Servicio de Anatomía Patológica del HCUV), sabemos que los pacientes fueron estudiados por clínica sugerente de patología del sistema nervioso periférico. Por lo tanto, posibles variantes podrían deberse tanto a las características individuales de los controles como a una posible patología subyacente.

6. CONCLUSIONES

El objetivo inicial de este estudio era realizar una caracterización de la expresión de la Apolipoproteína D en biopsia de nervio sural de pacientes diagnosticados de enfermedad neurodegenerativa en comparación con sujetos sanos. Se pretendía evaluar cómo afecta el proceso de neurodegeneración a la expresión de ApoD en el sistema nervioso periférico, y por tanto a la capacidad de regeneración después de una lesión aguda o crónica de este. En mi Trabajo de Fin de Grado he estudiado mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas la expresión de ApoD en el grupo de sujetos control, pretendiendo así orientar futuros trabajos realizados en sujetos enfermos.

Los resultados observados en nervios humanos considerados sanos concuerdan con lo esperado según la bibliografía que estudia la expresión de esta lipocalina en el sistema nervioso periférico de ratón como modelo animal.

Aun así, existen diferencias entre ambas especies, como la celularidad y la distribución de ApoD tanto en las envueltas de tejido conjuntivo como en el compartimento intracelular, que requieren de un mayor y más profundo estudio. Así mismo, es necesario ampliar el estudio de expresión de ApoD en nervio periférico humano enfermo



para comprobar su papel en las patologías neurodegenerativas, acerca de las cuales se conoce que cursan con una elevada expresión de ApoD.

7. REFERENCIAS

1. Ruiz M, Sanchez D, Correnti C, Strong RK, Ganfornina MD. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J* 2013;280:3928-43.
2. Sanchez D, Ganfornina MD. The Lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. *Front Physiol* 2021;12:738991.
3. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* 2008;7:506-15.
4. Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, et al. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:185-98.
5. Ross MH, Pawlina W, Barnash TA. Atlas de histología descriptiva. Buenos Aires: Panamericana; 2012.
6. Navarro A, Méndez E, Diaz C, del Valle E, Martínez-Pinilla E, Ordóñez C, et al. Lifelong expression of apolipoprotein D in the human brainstem: correlation with reduced age-related neurodegeneration. *PLoS One* 2013;8:e77852.
7. Spreyer P, Schaal H, Kuhn G, Rothe T, Unterbeck A, Olek K, et al. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J* 1990;9:2479-84.
8. Park HT, Kim JK, Tricaud N. The conceptual introduction of the «demyelinating Schwann cell» in peripheral demyelinating neuropathies. *Glia* 2019;67:571-81.
9. Welsch U, Deller T, Sobotta J. Histología [de] Sobotta: con la colaboración de Thomas Deller. 3a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2014.
10. Hirata K, Kawabuchi M. Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microsc Res Tech* 2002;57:541-7.
11. Zigmond RE, Echevarria FD. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Prog Neurobiol* 2019;173:102-21.
12. 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.
13. Nocera G, Jacob C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. *Cell Mol Life Sci* 2020;77:3977-89.
14. 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;66:670-87.
15. Kosacka J, Schröder T, Bechmann I, Klötting N, Nowicki M, Mittag A, et al. PACAP up-regulates the expression of apolipoprotein D in 3T3-L1 adipocytes. DRG/3T3-L1 co-cultures study. *Neurosci Res* 2011;69:8-16.



16. Devesa P, Gelabert M, González-Mosquera T, Gallego R, Relova JL, Devesa J, et al. Growth hormone treatment enhances the functional recovery of sciatic nerves after transection and repair. *Muscle Nerve* 2012;45:385-92.
17. Li Y, Cheng Z, Yu F, Zhang Q, Yu S, Ding F, et al. Activin A Secreted From Peripheral Nerve Fibroblasts Promotes Proliferation and Migration of Schwann Cells. *Front Mol Neurosci* 2022;15:859349.
18. He Q, Cheng Z, Zhou Q, Tong F, Li Y, Zhou X, et al. Sensory and motor fibroblasts have different protein expression patterns and exert different growth promoting effects on sensory and motor neurons. *Exp Neurol* 2023;361:114314.
19. Hu CY, Ong WY, Sundaram RK, Chan C, Patel SC. Immunocytochemical localization of apolipoprotein D in oligodendrocyte precursor-like cells, perivascular cells, and pericytes in the human cerebral cortex. *J Neurocytol* 2001;30:209-18.
20. Ganfornina MD, Sánchez D, Pagano A, Tonachini L, Descalzi-Cancedda F, Martínez S. Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins. *Dev Dyn* 2005;232:191-9.
21. Upadhyaya R, Zingg W, Shetty S, Shetty AK. Astrocyte-derived extracellular vesicles: Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *J Control Release* 2020;323:225-39.
22. Pascua-Maestro R, González E, Lillo C, Ganfornina MD, Falcón-Pérez JM, Sanchez D. Extracellular Vesicles Secreted by Astroglial Cells Transport Apolipoprotein D to Neurons and Mediate Neuronal Survival Upon Oxidative Stress. *Front Cell Neurosci* 2018;12:526.
23. Donato R. S-100 proteins. *Cell Calcium* 1986;7:123-45.
24. Navas Navarro P. Diseño de un nuevo sensor de Ca²⁺ y su aplicación a los orgánulos intracelulares «ex vivo e in vivo» [Internet]. 2016 [citado 2023 may 24]; Available from: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/18635>
25. Miwa N, Uebi T, Kawamura S. S100-annexin complexes--biology of conditional association. *FEBS J* 2008;275:4945-55.
26. Lowe JS, Anderson PG. Stevens y Lowe. *Histología humana + StudentConsult*. Elsevier España; 2015.

Estudio de la expresión de la Apolipoproteína D en nervio periférico humano

Autor: Reyes González Delgado[1]

Tutores: Diego Sánchez Romero[2], Paloma Jiménez Arribas[3]

[1] Universidad de Valladolid [2] Instituto de Biología y Genética Molecular, Unidad de Excelencia, Universidad de Valladolid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valladolid, España [3] Departamento de Neurocirugía, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España

Universidad de Valladolid
Facultad de Medicina

INTRODUCCIÓN

Diversos cambios ocurren en el sistema nervioso durante un proceso de neurodegeneración, incluyendo cambios en la homeostasis basal y cambios en la respuesta a lesión. La Apolipoproteína D (ApoD) pertenece a una familia de proteínas que unen pequeñas moléculas hidrofóbicas. ApoD interviene en la regeneración Walleriana tanto en la activación de la fagocitosis de residuos de mielina como en la posterior degradación de esta intracelularmente. Su expresión en el sistema nervioso periférico ha sido estudiada en modelos animales, pero no se conocen estudios sobre su expresión en humano. Este trabajo es un primer estudio cualitativo de la expresión de ApoD en nervio periférico humano control, que puede preceder a posteriores estudios en enfermedades neurodegenerativas humanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras control fueron recogidas por el servicio de neurocirugía del HCUV y almacenadas en el banco de muestras del servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital. Se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-S100 y anti-ApoD humana. Para la tinción histológica se utilizó Hematoxilina-Eosina.



OBJETIVOS

- Estudiar la expresión de ApoD en muestras de **tejido nervioso periférico humano sano**
- **Interpretar** los resultados en función de la información existente en el ratón como modelo animal experimental.

RESULTADOS

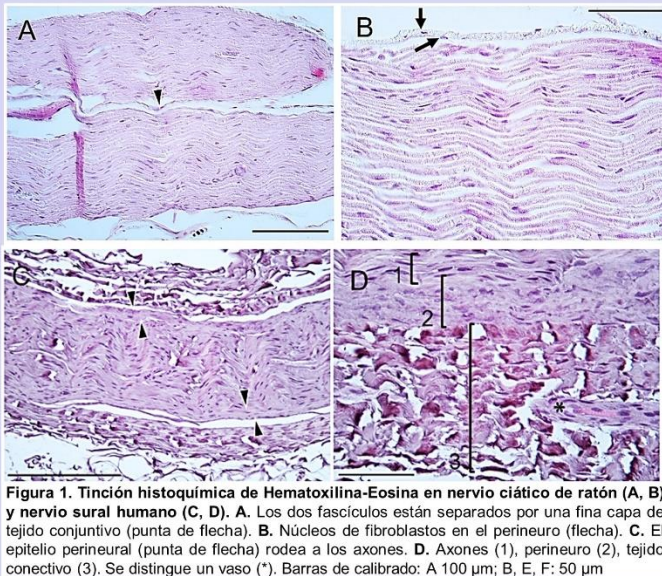


Figura 1. Tinción histoquímica de Hematoxilina-Eosina en nervio ciático de ratón (A, B) y nervio sural humano (C, D). A. Los dos fascículos están separados por una fina capa de tejido conjuntivo (punta de flecha). B. Núcleos de fibroblastos en el perineuro (flecha). C. El epitelio perineurial (punta de flecha) rodea a los axones. D. Axones (1), perineuro (2), tejido conectivo (3). Se distingue un vaso (*). Barras de calibrado: A 100 µm; B, E, F: 50 µm

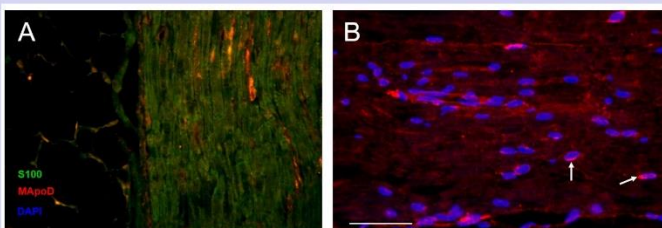


Figura 2. Inmunofluorescencia en nervio ciático de ratón con anticuerpos anti-S100 y anti-ApoD. A. La colocación de S100 y ApoD en las células de Schwann tiene como resultado una fluorescencia amarilla. B. ApoD se concentra en zonas cercanas al núcleo (flecha). Barras de calibrado: 40 µm.

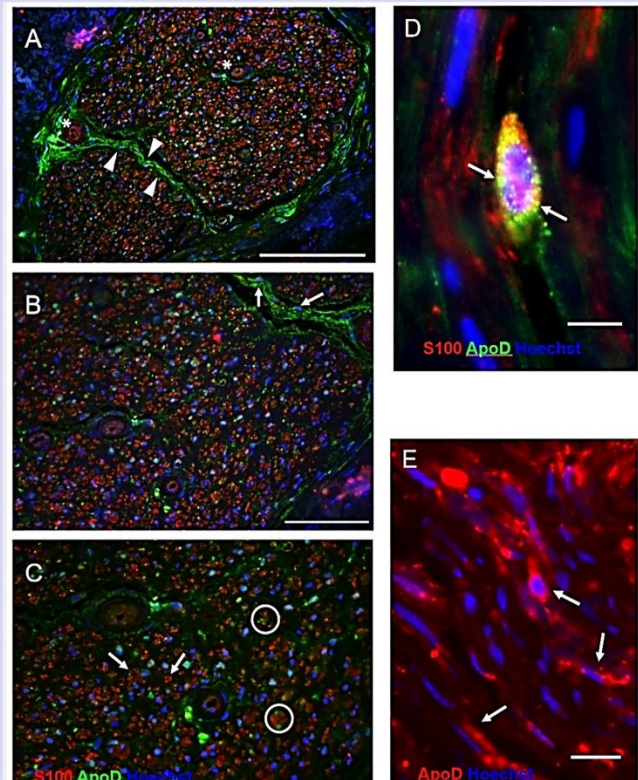


Figura 3. Inmunofluorescencia de nervio sural humano con anticuerpos anti-S100 y anti-ApoD. A. Corte transversal. Marcaje de ApoD en la vaina perineurial (punta de flecha) y cercano a los vasos(*). B. Fibroblastos con marcaje para ApoD (flecha). C. El marcaje de S100 rodea al axón (flecha). HApoD y S100 se co-localizan en células de Schwann de forma mutuamente excluyente (círculo). D. Corte longitudinal. Co-localización de S100 y ApoD y vesículas que cargan ApoD en la célula central. E. ApoD se concentra en zonas perinucleares (flecha). Barras de calibrado: A: 100 µm; B, C: 50 µm, D: 10 µm, E: 20 µm.

CONCLUSIONES

Los resultados observados en controles concuerdan con lo esperado acerca de la expresión de ApoD en SNP de modelo animal. Aun así, existen algunos puntos a destacar:

- La expresión de ApoD en las muestras humanas estudiadas es predominante en **perineuro y epineuro**, en contraposición con lo observado en ratón, donde se concentra en el endoneuro.
- La cantidad de **células de Schwann** es llamativamente mayor en las muestras humanas.
- Se observa un patrón de expresión intracelular mutuamente excluyente para **ApoD y S100**.
- Es necesario ampliar el estudio de expresión de ApoD en cuanto a su papel en la **enfermedad neurodegenerativa**.

