

Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

TRABAJO FIN DE GRADO

LA APOLIPOPROTEÍNA D RALENTIZA EL PROCESO
DE NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD
DE NIEMANN-PICK TIPO A

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: Cristian Fadrique Rojo

Tutores: M.D. Ganfornina, D. Sánchez

Índice

1. Introducción.....	Pág. 2
1.1. La enfermedad de Niemann-Pick tipo A.....	Pág. 2
1.1.1. Causas de la enfermedad.....	Pág. 2
1.1.2. Manifestaciones clínicas en humanos.....	Pág. 2
1.1.3. Modelo de la enfermedad en ratones.....	Pág. 3
1.2. Alteraciones moleculares en NPA.....	Pág. 3
1.2.1. Esfingomielina y esfingolípidos.....	Pág. 3
1.2.2. Dominios de membrana (balsas lipídicas).....	Pág. 3
1.2.3. Autofagia.....	Pág. 4
1.2.4. Estrés oxidativo.....	Pág. 5
1.3. Apolipoproteína D.....	Pág. 5
1.4. La glía.....	Pág. 6
2. Objetivos.....	Pág. 7
3. Material y métodos.....	Pág. 7
3.1. Obtención de ratones, genotipado. Sacrificio y obtención de muestras.....	Pág. 7
3.2. Pruebas de comportamiento.....	Pág. 9
3.3. Inmunoblot: determinación y cuantificación de calbindina y otras proteínas.....	Pág. 9
3.4. Análisis histológico: inmunofluorescencia e histoquímica.....	Pág. 10
3.4.1. Inmunofluorescencia en cortes de cerebelo.....	Pág. 10
3.4.2. Histología, tinción con hematoxilina-eosina.....	Pág. 10
3.5. Análisis estadístico.....	Pág. 11
4. Resultados.....	Pág. 11
5. Discusión.....	Pág. 16
5.1. La alteración en la homeostasis del calcio y el papel de calbindina.....	Pág. 16
5.2. ApoD y el perfil temporal de la NPA.....	Pág. 17
5.3. Hacia una terapia para la NPA.....	Pág. 17
6. Conclusiones.....	Pág. 18

Resumen

La enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA) es una enfermedad de depósito lisosomal de herencia autosómico-recesiva. En ella, la deficiencia de esfingomielinasa ácida provoca un gran acúmulo de esfingomielina en las membranas celulares. Esto conduce a una alteración de los dominios de membrana, viéndose comprometida la autofagia y los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo, terminando con la muerte celular y la neurodegeneración. Esta degeneración ocurre principalmente en las células de Purkinje del cerebelo, viéndose alterada la función motora. Se sabe que la Apolipoproteína D (ApoD) desempeña un importante papel a estos niveles. Se ha demostrado que es vital para el mantenimiento funcional del lisosoma, y que es capaz de modificar la composición de las membranas en presencia de estrés oxidativo experimental. Además, ejerce una función protectora frente al estrés oxidativo. Todos estos hechos nos han llevado al estudio del papel de ApoD en la NPA. Para ello hemos analizado la influencia de ApoD en la supervivencia de células de Purkinje, la gliosis y otras alteraciones moleculares. Hemos utilizado tres grupos de ratones: ratones control, ratones NPA y ratones NPA sin ApoD. Nuestros resultados muestran una mayor neurodegeneración y peores resultados en pruebas de función motora en aquellos ratones carentes de ApoD. La ausencia de ApoD acelera el proceso de neurodegeneración en NPA, apareciendo mayor astrogliosis y proporción de microglía activada y una mayor pérdida de células de Purkinje en el cerebelo.

1. Introducción

1.1 La enfermedad de Niemann-Pick tipo A.

La enfermedad de Niemann-Pick pertenece al grupo de las denominadas enfermedades de depósito lisosomal (LSD, *Lysosomal Storage Diseases*) y en ella existe un déficit de esfingomielinasa ácida (ASM), enzima encargada de hidrolizar la esfingomielina (SM) en ceramida y fosocolina libre. Así pues, ocurre una gran acumulación de SM en las neuronas y en otras células del sistema retículo-endotelial, produciéndose graves consecuencias sobre todo a nivel neurológico, pero también en otros órganos como el hígado, bazo y pulmones. En función de la cantidad de enzima residual funcionante se habla de enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA) y tipo B. En la primera prácticamente no existe actividad enzimática (menos de un 5%), mientras que en la segunda existe más actividad de la ASM (mayor del 5%), de forma que las manifestaciones clínicas en esta variante son más leves.

1.1.1. Causas de la enfermedad.

La NPA es una enfermedad genética rara (incidencia 0,5-1/100.000), de herencia autosómica recesiva y cuyo gen implicado es *SMPD1*, localizado en el cromosoma 11, y que codifica la ASM. Se han descrito numerosas mutaciones del gen (1), desde mutaciones puntuales (2) a pequeñas deleciones y alteraciones en el *splicing*. La incidencia de la NPA es mayor en la comunidad judía Ashkenazi, donde se han descrito tres mutaciones a las que se atribuye más del 90% de los casos. En ellas se produce una pérdida de función de ASM con una actividad inferior al 2% y la consiguiente acumulación de SM.

1.1.2. Manifestaciones clínicas en humanos.

La NPA es una enfermedad devastadora, cuyas manifestaciones clínicas comienzan a mostrarse alrededor del año de vida, produciéndose un deterioro progresivo que finalmente conlleva la muerte del paciente antes del tercer año de vida. Encontramos alteraciones a diferentes niveles en aquellos lugares donde se acumula la SM. Por un lado, existirá una marcada **hepatoesplenomegalia** (el primer síntoma que se suele detectar en estos enfermos). Puede detectarse a los tres meses de vida, y es progresiva. La acumulación de SM en macrófagos pulmonares ocasiona una **enfermedad pulmonar intersticial**, pudiendo llevar a una insuficiencia respiratoria, que junto con las infecciones respiratorias frecuentes pueden llevar a la muerte del paciente. A nivel oftalmológico, cuando avanza la enfermedad pueden verse alteraciones en el fondo de ojo, como la clásica **mancha rojo-cereza** por la acumulación de SM en las células ganglionares retinianas, formando un halo blanquecino alrededor de la fovea, que permanece roja. No obstante, las manifestaciones más relevantes son las **neurológicas**; la exploración puede ser normal en un primer momento, con una ligera hipotonía que será progresiva, pero finalmente desaparecerán los reflejos tendinosos profundos. En cuanto al desarrollo psicomotor puede ser normal hasta el año de vida, a partir del cual se produce un deterioro progresivo en todas las capacidades cognitivas (3).

1.1.3. Modelo de la enfermedad en ratones.

Debido a su baja incidencia y al curso mortal y devastador de la enfermedad, la dificultad para conseguir muestras de pacientes, la falta de un tratamiento eficaz y al ser una enfermedad monogénica, a final de los años 90 se creó un modelo de la enfermedad en ratones (4) para que sirviera de punto de partida para su investigación, estudio y poder abrir nuevas vías terapéuticas. Dos laboratorios independientes contribuyeron de forma simultánea a este logro. Al eliminar el gen de la ASM en estos ratones (ratones “*knock-out*” o “KO”: ASM-KO), éstos reproducen la sintomatología neurológica y visceral de la enfermedad, y lleva a su muerte a una edad de 7-8 meses.

Una investigación sobre este modelo de enfermedad reveló que en ratones ASM-KO ocurre una **degeneración temprana y progresiva en las células de Purkinje del cerebelo**, que se traduce en una falta de coordinación motora. Sin embargo, aún se desconoce la causa de la vulnerabilidad de estas neuronas en concreto. **Esta degeneración afecta de forma más temprana a los foliolo anteriores del cerebelo (1-5) y según progresa la enfermedad se afectan también los posteriores (6-10)** (5).

La existencia de este modelo de la enfermedad en ratones ha permitido desentrañar parte de las alteraciones que ocurren a nivel molecular y celular, acercándonos cada vez más al conocimiento de la enfermedad.

1.2. Alteraciones moleculares en NPA.

La alteración principal que ocurre en la NPA es la acumulación de SM debida a la falta de ASM, lo cual conlleva una serie de disfunciones celulares a distintos niveles: desde la alteración de la composición de las membranas celulares, el tráfico intracelular y la autofagia hasta la existencia de un marcado estrés oxidativo. Todo ello determinará la muerte celular de las neuronas afectadas y, por tanto, la neurodegeneración.

1.2.1 Esfingomielina y esfingolípidos.

La SM desempeña un papel fundamental como **componente estructural** de las membranas celulares, al igual que el resto de los esfingolípidos. El componente fundamental de todos los esfingolípidos es la esfingosina, a la cual se une un ácido graso formando ceramida, y cuando se añade un grupo fosfocolina tenemos la SM. Debido a su estructura y a la diferente longitud de las dos cadenas de ácidos grasos que la componen, la SM modula la curvatura de la membrana y su fluidez. Las interacciones entre moléculas de SM son más abundantes y estables y permiten que entre ellas se intercalen moléculas de colesterol, originándose así unos dominios de membrana también conocidos como **lipid rafts o balsas lipídicas**.

1.2.2. Dominios de membrana (balsas lipídicas).

Las balsas lipídicas se definieron originalmente como estructuras dinámicas formadas por colesterol y esfingolípidos en donde hay proteínas específicas que interactúan con la membrana y que presentan un papel relevante en diferentes procesos celulares como la transmisión de señales y el

tráfico vesicular (6). Debemos entender estas balsas (y los lípidos) como estructuras dinámicas y con una función señalizadora importante, y no como meros componentes estructurales de la membrana.

A baja temperatura estos dominios son insolubles a detergentes no iónicos como el Tritón X-100, lo que permite su aislamiento bioquímico en gradientes de densidad, cualidad por la cual también se les denomina membranas resistentes a detergentes (DRMs).

Dentro del contexto de la NPA, la acumulación masiva de SM en la membrana provocará una desestructuración de estos balsas lipídicas, viéndose alterada la señalización celular y el tráfico vesicular, afectándose por tanto diferentes procesos celulares. De esta forma, en este trabajo se considera esta **alteración estructural y funcional de las balsas lipídicas como un paso decisivo en la patogenia molecular de la enfermedad** que se produce por la acumulación de SM.

1.2.3. Autofagia.

La autofagia es un proceso celular que controla el reciclado de orgánulos y proteínas, mediante la degradación de estos en el lisosoma, manteniendo por tanto la homeostasis celular. Así, entendemos el lisosoma como el máximo responsable de la autofagia por ser el último paso de la misma, y el ser lugar de acción de numerosas enzimas responsables de la degradación. Se conocen tres tipos de autofagia:

- **Microautofagia:** la membrana lisosomal engloba mediante la formación de pequeñas invaginaciones al material citosólico, siendo éste internalizado al lumen del lisosoma, donde será degradado.
- **Macroautofagia:** en este caso el material a degradar se envuelve completamente con una doble membrana, formándose un autofagosoma, que posteriormente se fusionará con el lisosoma. Se trata de un proceso altamente regulado y bastante complejo. Es importante tener en cuenta que **la composición lipídica de la membrana y de los rafts es un factor decisivo en la fusión autofagosoma-lisosoma.**
- **Autofagia mediada por chaperonas:** en este caso, las proteínas a digerir penetran al lisosoma por el transportador de membrana LAMP2.

La autofagia es un mecanismo celular muy eficaz de protección ante el estrés oxidativo. Si por alguna razón este proceso no funciona correctamente, se acumularán progresivamente productos no degradados en el interior celular, que conducirán a la muerte de la célula.

En la NPA, la acumulación de SM produce una alteración estructural y funcional de la membrana y de los *rafts* lipídicos, hecho que es capaz de explicar la **disfunción de la autofagia que ocurre en la enfermedad** (7). Al encontrarse alterada la autofagia, las células son más vulnerables al estrés oxidativo, y es bien conocido que en esta situación las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden inducir un fenómeno conocido como **permeabilización de la membrana lisosomal (LMP)**(8). Cuando ocurre la LMP los componentes del lumen lisosomal (enzimas) salen al citosol, acidificándose el citoplasma y perdiéndose la función del lisosoma. Concretamente salen al citosol proteasas, como las catepsinas, y esto conlleva su pérdida de función.

1.2.4. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la formación de ROS y RNS (especies reactivas de nitrógeno) y los mecanismos que se encargan de eliminarlos o de reparar los daños causados por estos. Los ROS y RNS en concentraciones moderadas actúan como segundos mensajeros y desempeñan un papel importante en la señalización. Sin embargo, en altas concentraciones oxidan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y por tanto tienen efectos deletéreos. La oxidación y peroxidación de los lípidos de membrana producirán cambios en la misma que pueden afectar a la señalización celular y a los sistemas de degradación y autofagia.

En la NPA se ha demostrado que las neuronas sufren un estado de estrés oxidativo (niveles elevados de ROS, lipofuscina y lípidos peroxidados) y un estudio ha revelado que este **estrés oxidativo se debe a un aumento del calcio citoplasmático por la disfunción de una ATPasa bomba de calcio (PMCA, Plasma Membrane Calcium ATPase). Esta disfunción es a su vez causada por la acumulación de SM, y una menor presencia de PMCA en balsas lipídicas (9).** Hay que recordar que el estrés oxidativo afecta a la función lisosomal, viéndose alterada la autofagia y empeorando la capacidad de las células para responder al estrés oxidativo.

1.3. Apolipoproteína D.

La apolipoproteína D (ApoD) es una proteína perteneciente a la familia de las lipocalinas, secretada fundamentalmente por las células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) y cuya expresión aumenta en dos situaciones: el envejecimiento y la neurodegeneración. Glial Lazarillo (GLaz) y Neural Lazarillo (NLaz) son homólogas de ApoD en *Drosophila*. **ApoD aumenta su expresión en condiciones de estrés oxidativo**, lo que explica que se encuentre elevada en numerosas condiciones patológicas del sistema nervioso. **ApoD ejerce una función protectora frente al estrés oxidativo, tanto para las células que la secretan como para las de su entorno.** Diferentes modelos con rata, ratón, líneas celulares y *Drosophila* han estudiado las funciones de esta proteína tanto en situaciones de ganancia como de pérdida de función. Por ejemplo, ratones KO para ApoD (ApoD-KO) manifiestan un aumento de lípidos peroxidados en el cerebro, menor resistencia al Paraquat (estrés oxidativo experimental) y alteraciones en pruebas de comportamiento (10). En cambio, modelos de ganancia de función en *Drosophila* manifiestan un aumento de longevidad, resistencia al estrés oxidativo y una menor cantidad de lípidos peroxidados (11).

Además, se ha demostrado una clara relación de ApoD (y sus homólogos) con los lípidos, y por tanto, con las membranas biológicas y el control de su composición y calidad, si bien el mecanismo concreto de este control aún no se conoce. **ApoD se encuentra en los rafts lipídicos, su falta no modifica sustancialmente el patrón global proteico de los rafts pero sí su composición lipídica y su estructura, fundamentalmente en condiciones de estrés oxidativo (12).**

También se conoce que ApoD es secretada y posteriormente endocitada y dirigida a los lisosomas para ejercer algunas de sus funciones. Se ha demostrado que **ApoD es capaz de estabilizar la membrana lisosomal y mejorar la función del sistema de autofagia protegiendo a los lisosomas**, orgánulos muy vulnerables al estrés oxidativo (13).

También **se ha demostrado este efecto beneficioso de ApoD en células de pacientes de NPA**, estabilizando el lisosoma de los fibroblastos NPA (14). Además, es capaz de revertir algunos de los efectos secundarios al aumento de SM, si bien el aumento incontrolado de SM dificulta la entrada de ApoD en el lisosoma. Es posible que algunos de estos efectos se deban a la capacidad de ApoD para unir SM (15).

En resumen, ApoD es capaz de ejercer efectos beneficiosos a distintos niveles, protegiendo ante el **estrés oxidativo**, mejorando y estabilizando a los lisosomas, y por tanto la **autofagia**, y además estabilizando los **lípidos de membrana** y modificando su composición en condiciones de estrés oxidativo. Dado que en la NPA se producen alteraciones a estos niveles, no parece descabellado concluir que el estudio de ApoD en la NPA puede ser decisivo en el futuro, ofreciendo expectativas de tratamiento, siempre teniendo en cuenta que la causa directa de la enfermedad es la mutación del gen de la ASM y su deficiencia, y por tanto las células seguirán acumulando SM en sus membranas (Fig. 1).

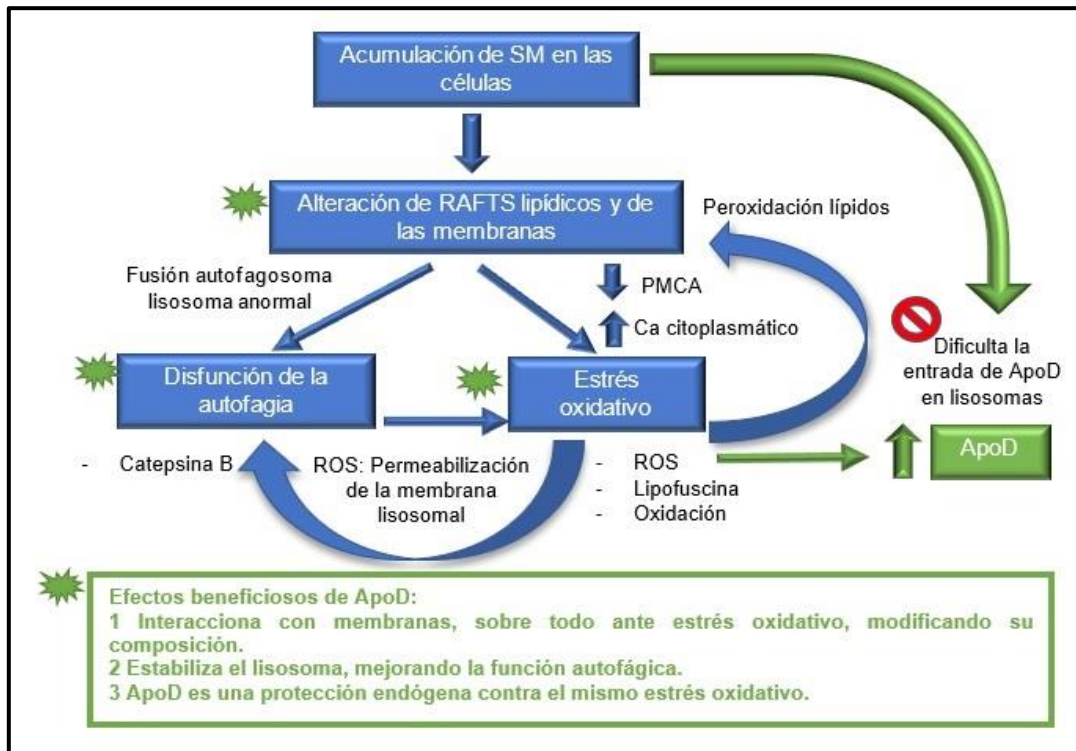


Figura 1. Modelo de la patogénesis de la enfermedad, centrado en la alteración de los rafts lipídicos. Alteraciones moleculares en la NPA, y lugares potenciales de acción de ApoD.

1.4. La glía

Los astrocitos son células gliales especializadas que ejercen numerosas funciones en el sistema nervioso central (SNC). Los astrocitos responden a cualquier daño en el SNC a través de un proceso denominado **astroglisis reactiva**, que constituye la marca patológica de las lesiones estructurales en el SNC. La astroglisis no es un proceso “todo o nada”, sino que es un proceso gradual (16). Estos cambios van desde alteraciones reversibles en la expresión de diferentes genes y la hipertrofia celular con la preservación de las células y la estructura tisular, a la formación de auténticas cicatrices y desestructuración del tejido y su pérdida de función. Los astrocitos responden

ante diferentes estímulos, como el daño o muerte celular, la isquemia, la hiperactividad neuronal, infecciones, el estrés oxidativo, procesos neurodegenerativos, enfermedades metabólicas, reactividad microglial, etc.

La microglía constituye el “macrófago” del sistema nervioso. Deriva de los monocitos sanguíneos que migran durante el periodo fetal al sistema nervioso, donde permanece tras la formación de la barrera hematoencefálica. De forma básica se puede dividir morfológicamente en **microglía ramificada y ameboide** (forma activa). La activación de la microglía en el SNC puede entenderse como neuroinflamación (17).

2. Objetivos

En este trabajo se quiere estudiar el papel neuroprotector de ApoD en el contexto de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A, y profundizar en los mecanismos moleculares y patogénicos de la enfermedad, para lo cual se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Estudiar la enfermedad a través del análisis de ratones modelo de la enfermedad (ASM-KO) y comprobar si existen diferencias en ratones donde también sea eliminada la expresión de ApoD (ratones doble-KO: ASM-KO, ApoD-KO).
 - Estudios del comportamiento, fundamentalmente coordinación motora.
 - Estudios sobre tejidos, estudios bioquímicos y moleculares.
2. Establecer un modelo de la patogénesis de la enfermedad a nivel molecular.

3. Material y métodos.

3.1. Obtención de ratones, genotipado. Sacrificio y obtención de muestras.

Para comenzar el estudio se partió de dos diferentes poblaciones de ratones, por un lado, aquellos homocigotos para la mutación nula de ASM (ASM-KO)(4), es decir ratones modelo de NPA, y por otro, ratones homocigotos para la mutación nula de ApoD (ApoD-KO). Tras el cruce de estos ratones, se obtuvieron dobles heterocigotos: ASM (+/-) ApoD (+/-). El siguiente paso consistió en el cruce de estos dobles heterocigotos como se recoge en la Tabla 1.

	<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>
<i>AB</i>	AABB	AABb	AaBB	AaBb
<i>Ab</i>	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
<i>aB</i>	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
<i>Ab</i>	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

A = alelo ApoD +

a = alelo ApoD -

B = alelo ASM +

b = alelo ASM -

AABB = doble Wildtype (WW)

AAbb = ratón ASM-KO (WK)

aabb = ratón doble-KO (KK)

Tabla 1. Genotipos que resultan del cruce de dobles heterocigotos y genotipos seleccionados para el estudio.

De esta forma se lograron obtener los tres tipos de genotipos necesarios para el estudio: **ratones WildType o “silvestres” [WW], ratones ASM-KO (modelo NPA) [WK], y ratones doble-KO (ASM-KO y ApoD-KO) [KK].** Se extrajo DNA de la cola de los animales y se realizó su genotipado

mediante PCR de forma independiente para ambos genes, y aquellos ratones WW, WK y KK fueron seleccionados para el estudio (Fig. 2A).

Se sabe que la esperanza de vida de los ratones ASM-KO (WK) es de 7-8 meses y para el estudio se utilizaron ratones de 12 semanas de edad ya que se esperaba que los sujetos doble-KO (KK) mostraran una peor evolución. Aproximadamente a las 12 semanas de edad (12.37 ± 0.8), se realizó el estudio del comportamiento (Fig. 2B).

Los animales fueron sacrificados mediante anestesia en cámara de CO₂ seguida de dislocación cervical. A continuación se extrajo el encéfalo, que fue transportado a un molde dónde se realizaron tres cortes sagitales (Fig. 2C), originando cuatro secciones (dos mediales, B y C; y dos laterales A y D). La sección medial B, se fijó para su posterior inclusión en parafina con el objetivo de realizar sobre ella estudios histológicos e inmunohistoquímicos para cuantificar las células de Purkinje (las células que más se afectan en la NPA) y marcadores gliales de respuesta a daño tisular. La sección medial C fue dividida en dos porciones: cerebelo y resto de sección. El cerebelo de la sección C, se dividió a su vez en foliolos anteriores (1-5) y posteriores (6-10) con el objetivo de determinar calbindina (como medidor de la vitalidad de las células de Purkinje) mediante Western-blot y comprobar si en ratones doble-KO (KK) de 12 semanas ya existe afectación de los foliolos posteriores (ya que éstos se afectan de forma más tardía). Finalmente, el resto de la sección C junto con las secciones laterales A y D fueron almacenadas a -80°C (con el fin de evitar la peroxidación de los lípidos) para realizar una determinación de SM en estudios posteriores (ANEXO A.II).

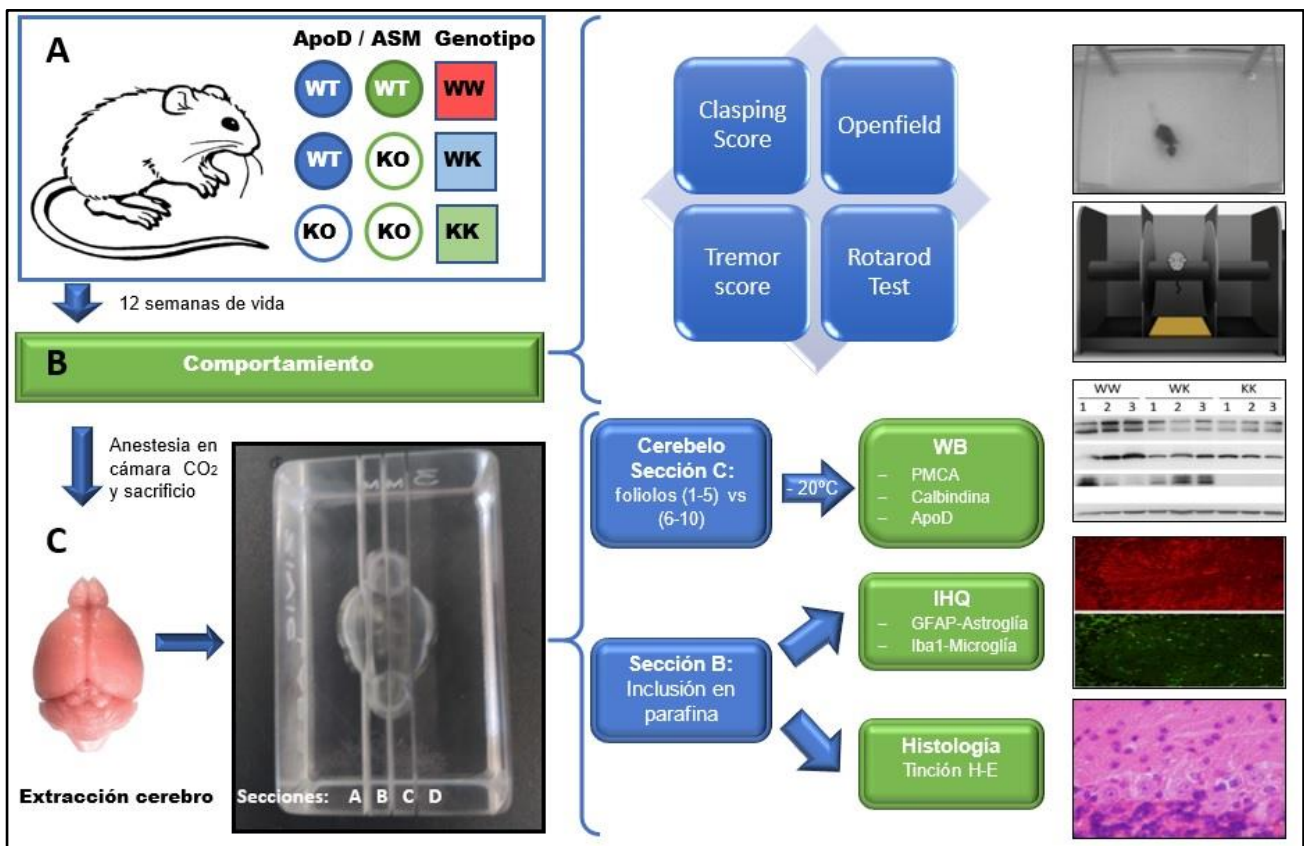


Figura 2. Esquema del proceso realizado en el estudio con ratones, y las diferentes técnicas y mediciones llevadas a cabo: test de comportamiento, estudios bioquímicos (western-blot o Immunoblot para la cuantificación de diferentes proteínas) y análisis histológico por microscopía (histoquímica e inmunohistoquímica).

3.2 Pruebas de comportamiento.

Las pruebas de comportamiento se realizaron en el laboratorio, comenzando a las 8.00 de la mañana. Se realizaron cuatro pruebas diferentes: “*Open Field*” (OF) o Campo Abierto, coordinación motora (Rotarod Test: RR) y la evaluación de: *Tremor* (temblor) y *Clasping*.

La primera prueba realizada fue el *Open Field*, en el cual los ratones fueron grabados durante 5 minutos, anotándose diferentes parámetros sobre su movimiento libre en una superficie de 28x28 cm (ANEXO B.I).

En el Rotarod, cada ratón fue entrenado en dos sesiones de 2 minutos de duración cada una, separadas por un intervalo de 5 minutos, a una velocidad fija de 4 rpm, anotando a lo largo de la sesión el tiempo en segundos que el animal tarda en caer (pudiéndose caer más de una vez durante la sesión). A los 15 minutos de haber finalizado el segundo entrenamiento se realizó el test propiamente dicho, por triplicado, con una velocidad inicial de 4 rpm seguida de aceleración.

Las puntuaciones, tanto de *Tremor* y *Clasping* son observacionales. La primera consiste en observar el temblor del ratón y asignarle un valor de 0 (no temblor) a 4 (muy alto) en función del temblor observado. El *clasping* consiste en levantar al animal por la cola en 3 periodos de 30 segundos, separados entre sí otros 30 segundos y observar la postura del animal valorando si realiza *clasping* (cuando el animal une las patas traseras entre sí, entendido como un reflejo patológico cuya significación biológica es la lesión de los ganglios basales). En función de si lo hace o no y durante cuánto tiempo, se obtiene una puntuación.

Todos los resultados fueron registrados en la Hoja de Comportamiento correspondiente para cada sujeto de estudio (ANEXO A.III).

3.3 Inmunoblot: determinación y cuantificación de calbindina y otras proteínas.

En primer lugar, se homogeneizaron las muestras (homogeneizador *OMNI*) de los foliolos anteriores (1-5) y posteriores (6-10) para posteriormente realizar un Inmunoblot (o Western-blot, WB) para cuantificar diferentes proteínas en las muestras obtenidas (calbindina, PMCA, ApoD).

En resumen, el proceso fue el siguiente:

1. Determinación de la concentración de proteínas en las muestras homogeneizadas, mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (*BCA Protein Assay kit*).
2. Electroforesis: las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%.
3. Electrotransferencia a membranas de PVDF seguido de bloqueo en leche al 5% e incubación con anticuerpo primario (diluido en medio de bloqueo) toda la noche a 4°C.
4. Inmunodetección: se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS y posteriormente la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a HRP (peroxidasa de rábano). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos fueron visualizadas mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL en una cámara digital *VERSADOC*.

5. Cuantificación: los valores de densitometría de las bandas se cuantificaron utilizando el software *Quantity One* (Bio-Rad) y se normalizaron con respecto a los valores obtenidos para el control de carga (actina).

3.4 Análisis histológico: inmunofluorescencia e histoquímica.

3.4.1. Inmunofluorescencia en cortes de cerebelo.

Las secciones de los cerebros se desparafinaron y rehidrataron en xileno durante 5 minutos, seguido de concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%; 5 minutos en cada solución). Posteriormente se realizó el desmascaramiento de antígenos, hirviendo las muestras en “tampón de recuperación de antígenos” (1L de agua, 2,94 g de citrato sódico y 13 gotas de HCL al 37%) durante 10 minutos. El siguiente paso consistió en la incubación con el anticuerpo primario (Iba1, para marcar microglía; GFAP, para marcar astrogliá) en solución de bloqueo (leche 5%) durante toda la noche. Posteriormente, tras tres lavados de 5 minutos con PBS, las muestras se incubaron con anticuerpo secundario (ver anticuerpos en ANEXO A.I) seguido de tres lavados finales. Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia *NIKON Eclipse 90i, con cámara CCD, modelo DS-Ri1*. Se obtuvieron imágenes localizadas entre los foliolos cerebelosos 8 y 9, en las mismas condiciones de tiempo y exposición. Para el análisis de las imágenes se utilizó el software FIJI. En el caso de astrogliá (GFAP), se cuantificó la intensidad de fluorescencia por unidad de área (μm^2). En el análisis de microglía (Iba1) se cuantificó el número de células observadas, según su morfología: ramificada o ameboide (entendiendo la microglía ameboide como una consecuencia de la activación de la microglía)(17).

3.4.2. Histología, tinción con hematoxilina-eosina.

Las muestras (ya desparafinadas e hidratadas previamente) se sumergieron durante 2,5 minutos en hematoxilina, seguido de 30 segundos de lavado en agua. Se introdujeron en solución de diferenciación (alcohol ácido al 0,25%) dos veces durante unos segundos, seguido de 60 segundos en la solución “*Scott’s Tap Water Substitute*”. Las muestras se introdujeron 45 segundos en eosina (previamente acidificada con ácido acético; 0,5 mL de ácido acético por cada 100 mL de eosina). Una vez realizada la tinción, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol (etanol 96% y 100%) y xilol durante 2 minutos en cada solución. Finalmente se procedió al montaje de las muestras.

Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio *NIKON Eclipse 50i*. Se obtuvieron imágenes del cerebelo con aumento de 4X. Para el análisis histológico del cerebelo, se procedió a la cuantificación de células de Purkinje existentes en cada foliolo (siguiendo la nomenclatura que se muestra en la Figura 3). Para que la cuantificación con esta tinción resultara más sencilla, se cuantificaron aquellas células de Purkinje que mostraban una clara eosinofilia, y así realizar una estimación aproximada de las mismas (18). Además, se midió en micras la longitud de cada foliolo. Para la cuantificación de células y la medición de los foliolos se utilizó el software FIJI. Para el análisis de los datos, el número de células de Purkinje en el cerebelo y en cada foliolo fue expresada una densidad celular en la capa de células de Purkinje (número de células/100 micras).

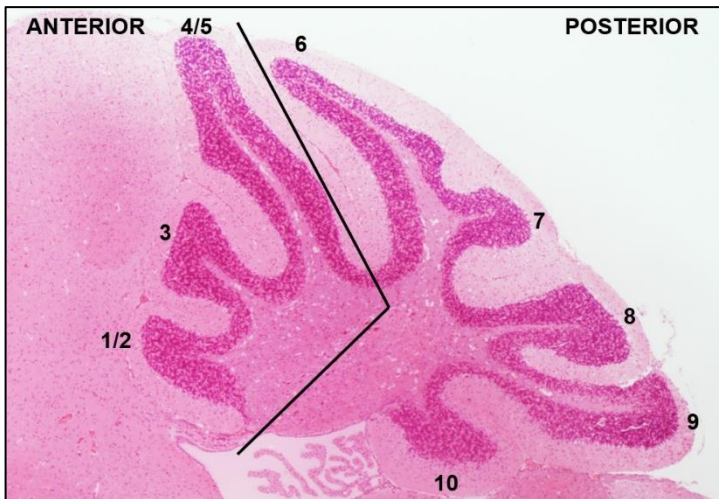


Figura 3. Nomenclatura utilizada para distinguir los diferentes foliolos cerebelosos.

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos de comportamiento se utilizó el software *STATGRAPHICS 18* (ANEXO B.I). Para los tests estadísticos realizados en otras determinaciones, se utilizó el software *SigmaPlot 11.0*. Se definió un p-valor <0.05 como umbral para cambios significativos. Los test estadísticos utilizados en cada experimento se

especifican en sus respectivas figuras.

4. Resultados.

4.1 La ausencia de ApoD en ratones NPA se traduce en peores resultados en las pruebas de comportamiento.

El procedimiento utilizado para el análisis estadístico de los datos se muestra con detalle en el ANEXO B.I. El resumen de dicho procedimiento se explica en la siguiente figura.

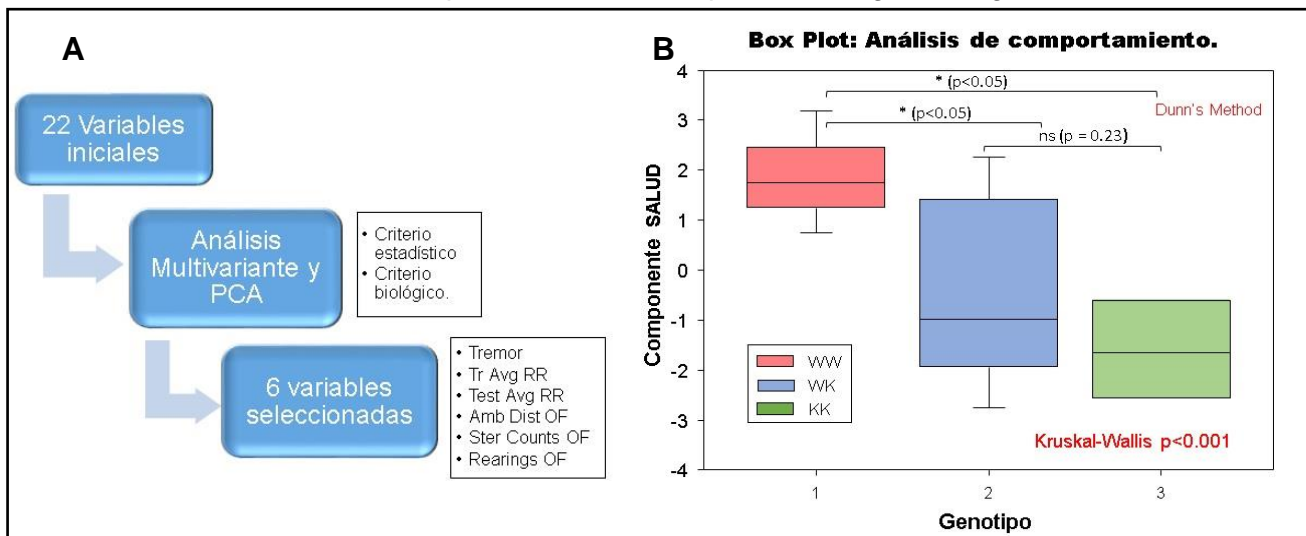


Figura 4. A) Esquema del proceso de análisis de datos. **B)** Diagrama de Cajas y bigotes del Componente SALUD (Primer componente obtenido tras la realización de un PCA con las 6 variables finales, el cual explica el 62,94% de la variabilidad de la muestra).

Como se observa en la Figura 4B, los ratones sanos (WW) muestran mejores resultados en las pruebas de comportamiento si los comparamos con los ratones NPA (WK) y los ratones NPA sin ApoD (KK). Además, los ratones NPA presentan una gran variabilidad en los resultados de las pruebas de comportamiento (hecho que demuestra la gran variabilidad clínica de la enfermedad). Finalmente, la ausencia de ApoD en ratones NPA (KK) hace que esta variabilidad sea menor, y que los ratones de este grupo tiendan a presentar peores resultados en las pruebas de comportamiento.

4.2 La lesión de los ganglios basales no es un hecho determinante en la NPA.

El *claspings* es un reflejo patológico cuyo significado es la lesión de los ganglios basales (19). Tras el análisis global de los resultados de las pruebas de comportamiento, la variable *Claspings* no muestra asociación alguna con respecto a la variable Genotipo (Correlación de Pearson 0.06, tal y como se muestra en la Tabla B.I-2 – ANEXO B.I).

4.3 La ausencia de ApoD en ratones NPA no implica un déficit de aprendizaje, pero sí de la coordinación motora.

Los ratones sanos (WW) permanecían más tiempo sobre la barra del RotaRod durante los entrenamientos en comparación con los ratones NPA (WK y KK). Los ratones WK y KK no mostraron diferencias significativas en cuanto a las sesiones de entrenamiento, lo que nos hace pensar que los ratones NPA, en ausencia de ApoD (KK), son capaces de aprender un nuevo programa motor de la misma forma que sus compañeros NPA (WK) (Fig. 5A).

Al analizar los resultados del Test RotaRod (con aceleración), se encontró una diferencia significativa entre los ratones sanos (WW) y los ratones NPA carentes de ApoD. Sin embargo, aunque los ratones NPA (WK) mostraron unos peores resultados en comparación con los ratones sanos (WW), estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Fig. 5B). A la vista de los resultados, podemos pensar que la enfermedad ha avanzado más en los ratones NPA en ausencia de ApoD, siendo ApoD un factor neuroprotector determinante en términos de coordinación motora en ratones NPA.

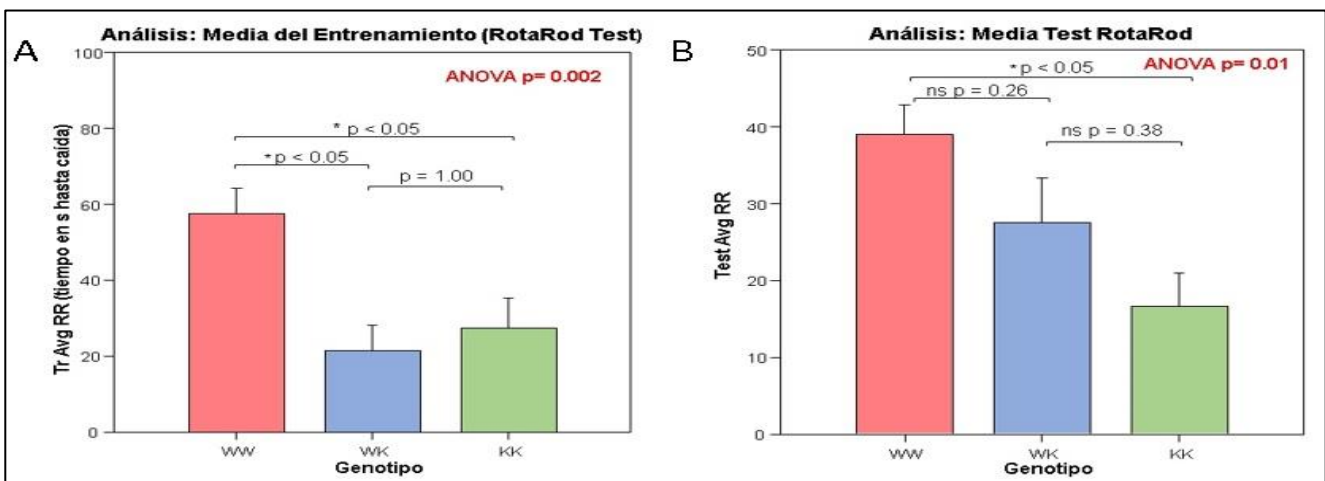


Figura 5. **A)** Representación por genotipo de la variable Media del Entrenamiento (RotaRod) **B)** Representación por genotipo de la variable Media del Test RotaRod. En los diagramas de barras se representa la media y el error típico. Los test estadísticos realizados (ANOVA) indicaron diferencias significativas. La comparación entre grupos se realizó mediante el procedimiento de Bonferroni.

4.4 Los ratones NPA (WK y KK) presentan niveles bajos de PMCA en cerebelo.

Tal y como puede observarse en la Figura 6A, la NPA se caracteriza por un descenso de los niveles de PMCA en el cerebelo(9), y este se observa en los ratones WK y KK. Este descenso es estadísticamente significativo en comparación con el grupo control (WW) ($p < 0.001$). Este hecho ocurre indistintamente tanto en folíolos anteriores (1-5) como posteriores (6-10). El descenso de los

niveles de PMCA, y por tanto su disfunción, se traduce en un aumento del calcio intracelular, que a su vez produce un **aumento del estrés oxidativo**.

4.5. Existe sobreexpresión de Calbindina en foliolo posteriores del cerebelo en ratones NPA en ausencia de ApoD (KK).

La Calbindina es un marcador de vitalidad de las células de Purkinje(20). Al analizar la cantidad de Calbindina en los diferentes genotipos (Fig. 6B y Fig. B.II-1F) observamos un **descenso de Calbindina en foliolo anteriores en ratones NPA (WK, KK)** con respecto al grupo control (WW), si bien este resultado no es estadísticamente significativo, muestra una tendencia, sin existir diferencias entre los grupos de ratones NPA. Este hecho habla a favor de una probable afectación de foliolo anteriores del cerebelo (que a la edad de 12 semanas deberían estar ya afectados en ratones NPA, WK).

Es un hecho interesante lo que ocurre cuando cuantificamos Calbindina en los foliolo posteriores, donde encontramos un aumento significativo de los niveles de la proteína en el cerebelo de ratones NPA que carecen de ApoD (KK) con respecto al grupo control, y un ligero aumento de la misma en los ratones NPA (no significativo). Esto podría reflejar la **muerte inminente de las células de Purkinje** de los foliolo posteriores de ratones NPA que no tienen ApoD, ya que estos niveles de Calbindina aumentarían como consecuencia de un fallo de la homeostasis del calcio intracelular (en un desesperado intento de compensación), reflejando un nivel crítico de estrés oxidativo(21). Por tanto, parece que la afectación de los foliolo posteriores podría ser más temprana cuando los ratones no pueden beneficiarse de los efectos neuroprotectores de ApoD.

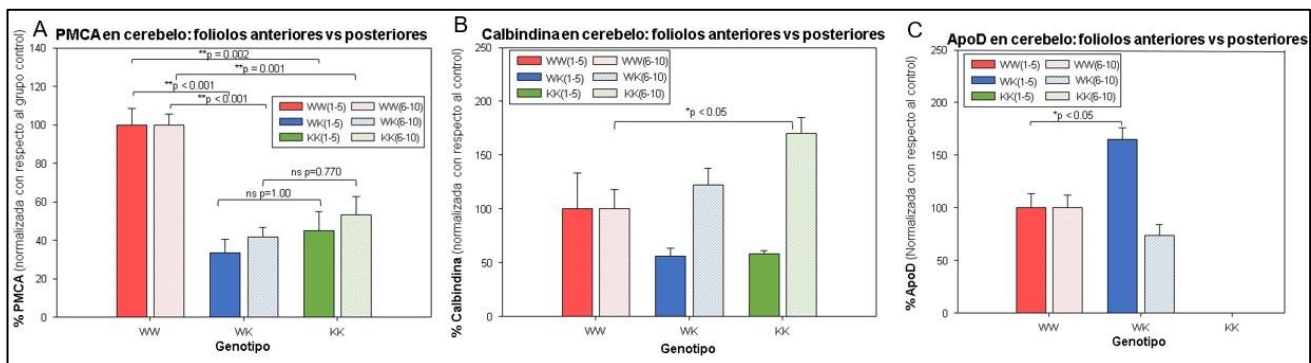


Figura 6 Resultados del Inmunoblot. **A)** Representación de niveles de PMCA con respecto al control (WW) en los diferentes genotipos. **B)** Representación de niveles de Calbindina con respecto al control (WW) en los diferentes genotipos. **C)** Representación de niveles de ApoD con respecto al control (WW) en los diferentes genotipos. Las gráficas de barras representan la media y el error típico, y el análisis estadístico se realizó con un tamaño muestral de n=5 por cada genotipo. El test estadístico utilizado fue ANOVA, y para la comparación entre grupos se utilizó el procedimiento de Bonferroni.

4.6 ApoD se sobreexpresa en foliolo anteriores de ratones NPA y no en posteriores.

Otra de las cuantificaciones de proteínas realizadas en el Inmunoblot fue ApoD. Al analizar la cantidad de ApoD presente en las muestras de cerebelo encontramos un aumento significativo ($p < 0.05$) de ApoD en los foliolo anteriores de ratones NPA (Fig. 6C y Fig. B.II-1C). Este hecho refleja el **estrés oxidativo que está sucediendo en el cerebelo**, puesto que ApoD se sobreexpresa en estas condiciones. En cambio, no encontramos este aumento en los foliolo posteriores de

ratones NPA (WK), suponiendo, por tanto, que la enfermedad aún no ha avanzado lo suficiente como para afectar a este parámetro de forma significativa. Tal como se espera, ApoD es indetectable en los ratones KK.

4.7. Se observa una mayor astrogliosis en las muestras de ratones NPA.

La astrogliosis consiste en la respuesta de los astrocitos ante numerosos estímulos (siendo el estrés oxidativo uno de los más importantes), y en general toda aquella situación que ocasione una lesión en el sistema nervioso. La astrogliosis desempeña un papel protector en un primer momento, pero si el estímulo se mantiene en el tiempo la astrogliosis es cada vez mayor, los astrocitos proliferan e impiden que el tejido dañado pueda recuperarse, convirtiéndose en una auténtica "cicatriz". Se trata de un arma de doble filo (16).

GFAP (*glial fibrillary acid protein*) es un marcador de astrocitos reactivos. El análisis de los experimentos de inmunofluorescencia muestra una elevada astrogliosis en ratones NPA (WK y KK), [Fig. 7A-C; G] siendo ligeramente mayor en aquellos sujetos carentes de ApoD, con respecto al grupo control WW.

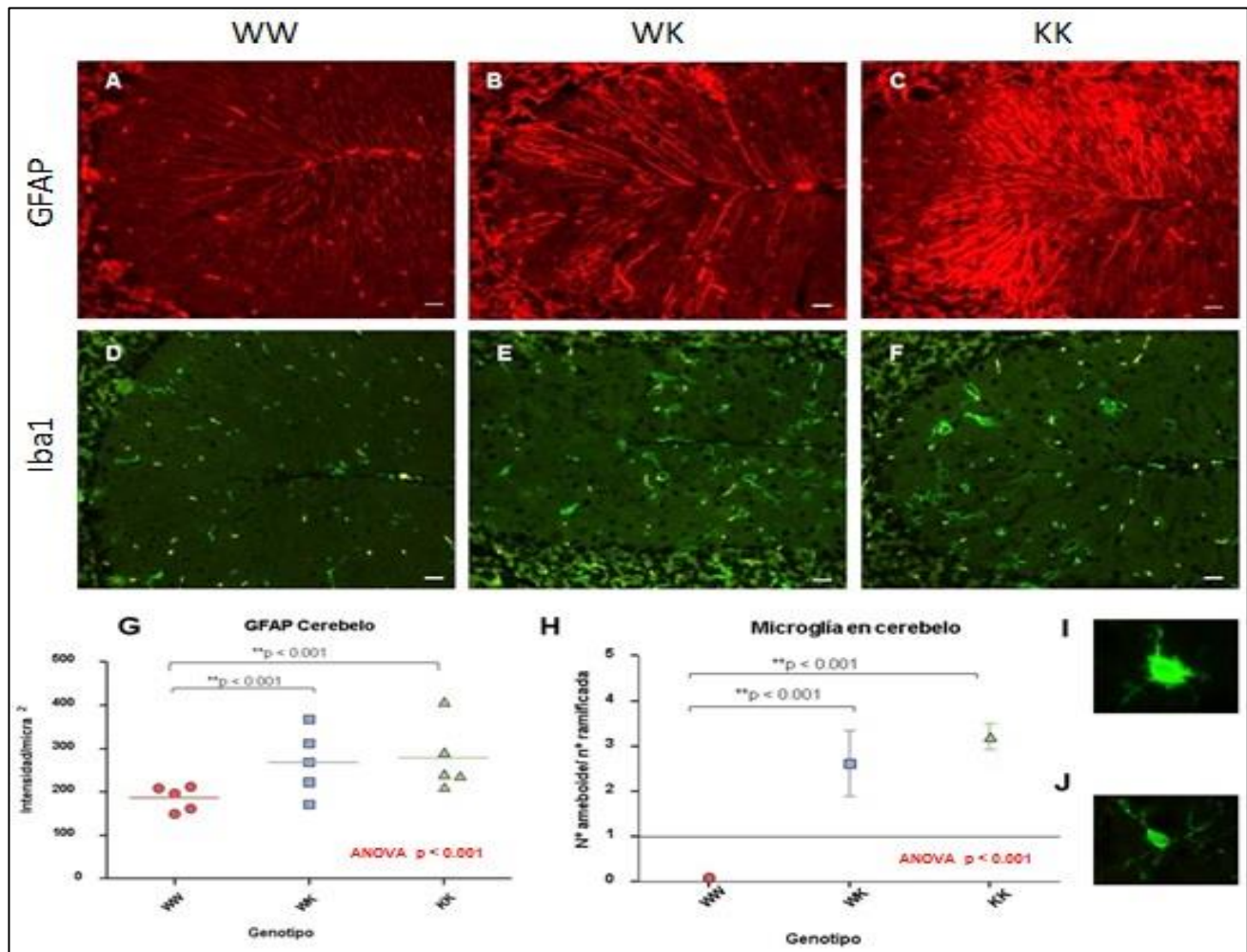


Figura 7. A-F) Imágenes de inmunofluorescencia en cerebelo de ratón, localizadas entre el foliolo 8 y 9 con diferentes marcadores (GFAP para astrogliosis e Iba1 para microglía). **G)** Intensidad de GFAP por μm^2 . Existe una mayor intensidad de GFAP en ratones NPA (WK y KK) con respecto al grupo control WW, siendo esta diferencia significativa ($n=5$ por cada genotipo). La barra horizontal corresponde a la media. **H)** Microglía en cerebelo: Cociente entre microglía ameboides/ramificada. En ratones NPA se observa un mayor número de microglía activada (ameboides) con respecto al grupo control, siendo estadísticamente significativo. **I)** Detalle de microglía ameboides. **J)** Detalle de microglía ramificada. El test estadístico utilizado fue ANOVA y para la comparación entre grupos se utilizó el procedimiento de Bonferroni.

4.8. En ratones NPA la microglía es predominantemente ameboide.

La microglía es considerada el “macrófago” del sistema nervioso, debido a sus funciones, principalmente su acción fagocítica. En condiciones normales, la microglía presenta una morfología ramificada (con somas más pequeños y prolongaciones visibles, Fig. 7J). Cuando la pasa a un fenotipo proinflamatorio por diferentes estímulos (entre ellos los astrocitos) adquiere una morfología característica, la microglía ameboide (Fig. 7I), en la que se aprecia un soma más grande. Hemos usado *Iba1*, un marcador inmunohistoquímico de microglía para identificar estas morfologías. En ratones control, observamos una mayor proporción de microglía con morfología ramificada (Fig. 7D) mientras que **en ratones NPA se observa un claro predominio de microglía ameboide** (22) (Fig. 7E-F; H), que podría estar en relación con la inflamación y neurodegeneración que está aconteciendo en el cerebelo de estos ratones (23).

4.9. La ausencia de ApoD en ratones NPA conlleva una mayor degeneración y pérdida de células de Purkinje, especialmente en los foliolo posteriores.

Los ratones control mostraron unos mayores niveles de densidad de células de Purkinje sanas en cerebelo con respecto a los ratones NPA. Además, los ratones NPA carentes de ApoD (KK) mostraron una menor densidad celular que los ratones NPA con ApoD (WK) (Fig. 8). Este hecho se ve especialmente reflejado en los foliolo posteriores del cerebelo (foliolo 10), donde el descenso del número de células de Purkinje es aún mayor en ratones KK que WK (Fig. 8F). Esto podría significar que la enfermedad avanza a un ritmo más acelerado en ausencia de ApoD.

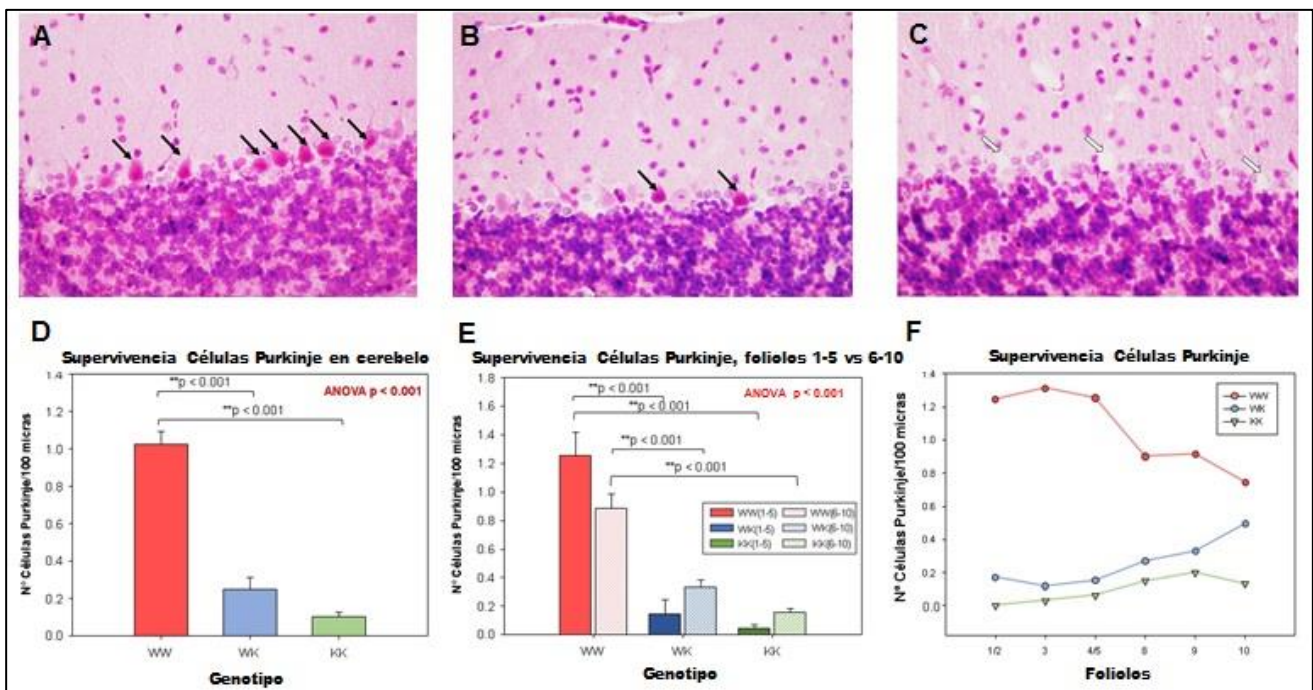


Figura 8. Imágenes de tinción con hematoxilina-eosina (A-C). **A)** Ratón WW. Se visualizan células de Purkinje eosinófilas (flecha negra). **B)** Ratón WK. Se visualiza una menor cantidad de células de Purkinje eosinófilas. **C)** Ratón KK. Apenas se observan células de Purkinje e incluso pueden observarse espacios vacíos en la capa de células de Purkinje (flecha blanca). **D)** Análisis de densidad global de células de Purkinje en el cerebelo de los ratones. **E)** Análisis de densidad de células de Purkinje entre foliolo anterior y posterior. **F)** Análisis de densidad de células de Purkinje por foliolo. Las gráficas D y E muestran la media y el error típico. El test estadístico realizado fue ANOVA y para la comparación de grupos se utilizó el procedimiento de Bonferroni.

4.10. La afectación histológica explica las diferencias observadas en las pruebas de comportamiento.

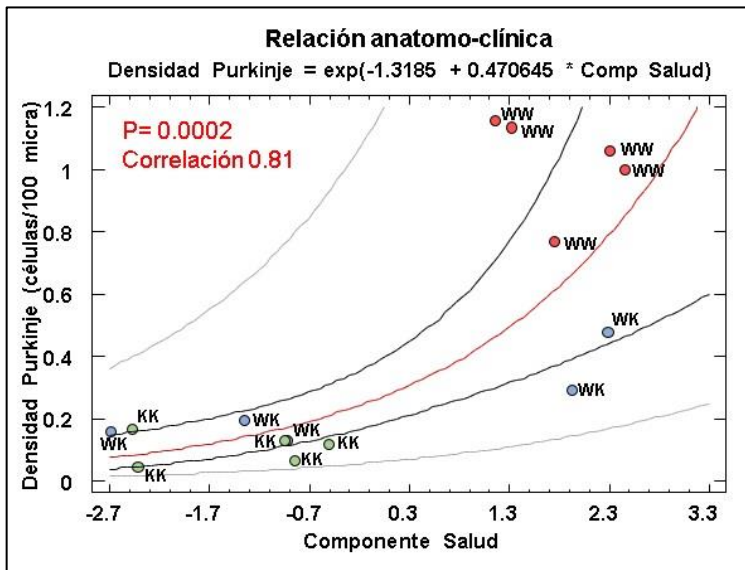


Figura 9. Regresión Simple entre Densidad de células de Purkinje y Componente Salud de los test de comportamiento. Existe una relación exponencial entre ambas variables, siendo ésta estadísticamente significativa $p=0.0002$

Existe una fuerte correlación entre la densidad de células de Purkinje vivas en el cerebelo de los ratones y sus resultados en las pruebas de comportamiento (Componente Salud). Existe una relación exponencial entre ambas variables tal y como puede observarse en la Figura 9.

Podemos afirmar que existe una relación anatomo-clínica entre las variables estudiadas. Así pues, aquellos sujetos con mayor densidad de células de Purkinje sanas obtuvieron mejores resultados en las pruebas de comportamiento.

5. Discusión.

5.1. La alteración en la homeostasis del calcio y el papel de calbindina.

Como hemos podido observar, en los ratones NPA existe una disminución de los niveles de PMCA, una ATPasa de membrana encargada de movilizar el calcio intracitoplasmático hacia el espacio extracelular. Esta disminución de PMCA se explica por la propia patogenia de la NPA. Debido al acúmulo progresivo de SM en las membranas plasmáticas se produce la desestructuración y pérdida de función de los dominios de membrana donde se encuentra PMCA. La disfunción de la bomba de calcio produce un aumento del calcio intracelular, lo que a su vez se traduce en la existencia de estrés oxidativo que finalmente producirá la muerte celular. Aunque no está directamente relacionado con la homeostasis del calcio, también cabe destacar que la acumulación de SM provoca la permeabilización de la membrana lisosomal y la consiguiente salida al citosol de enzimas lisosomales.

Por otro lado, es interesante analizar el papel de la calbindina en este proceso. En un primer momento, se realizó la cuantificación de esta proteína con el objetivo de utilizarla como marcador específico de vitalidad celular de las células de Purkinje. Nuestros experimentos de Inmunoblot mostraron que los ratones NPA presentaban unos menores niveles de calbindina en los foliolos anteriores, implicando de forma indirecta la muerte de células de Purkinje en estos ratones. Sorprendentemente, al analizar lo que ocurre en los foliolos posteriores, encontramos un gran aumento de los niveles de calbindina en ratones NPA, aún más marcado en ratones sin ApoD. Una de las funciones principales de la calbindina, como su propio nombre indica, consiste en intervenir

en la homeostasis del calcio. Se ha demostrado también que ante cualquier estímulo que ocasione un aumento en los niveles de calcio, existe sobreexpresión de calbindina (21). La sobreexpresión de calbindina en los foliolos posteriores de ratones NPA carentes de ApoD podría estar en relación con la muerte inminente de los mismos. Se ha comprobado con el análisis histológico de los cerebelos de los ratones, que la afectación de los foliolos posteriores ocurre en mayor medida en los ratones KK. Esto estaría en relación con esta sobreexpresión de calbindina, formando parte de un último mecanismo de compensación ante la inminente muerte de las células. Por tanto, los foliolos anteriores y posteriores se encuentran en un diferente momento temporal en cuanto a la NPA.

Así pues, se postula a la calbindina como un actor de doble papel. Por un lado, una célula de Purkinje viva expresa calbindina y puede utilizarse como un marcador celular específico de las células de Purkinje. Por otro lado, podría tener un efecto compensador ante elevados niveles de calcio intracelular, como un último mecanismo de protección frente al estrés oxidativo. Además, se ha comprobado en otros estudios que ratones KO para calbindina muestran peores resultados de coordinación motora (20).

5.2. El perfil temporal de la NPA

El sacrificio de los ratones a la edad de 12 semanas no es un hecho arbitrario. Tal y como se había demostrado, a la edad de 12 semanas los ratones NPA mostraban una gran degeneración en los foliolos anteriores, no siendo así en los posteriores (5). El proceso de neurodegeneración en el cerebelo en la NPA sigue un curso temporal. La afectación de los foliolos anteriores es precoz y acontece de forma previa a la afectación de los foliolos posteriores. Cuando observamos lo que ocurre en los ratones NPA que no tienen ApoD, a la edad de 12 semanas, comprobamos que existe una mayor afectación, con especial incidencia en los foliolos más posteriores, en comparación con aquellos ratones NPA que sí tienen ApoD. Puesto que el curso temporal del proceso de degeneración del cerebelo en la NPA era conocido, esta afectación más intensa en ratones NPA carentes de ApoD se relacionaría con un mayor ritmo de progresión de la enfermedad, hecho que también se ve reflejado en una mayor alteración en las pruebas de coordinación motora. Por tanto, la NPA progresa de forma más rápida en aquellos ratones que no tienen ApoD.

5.3. Hacia una terapia para la NPA

La NPA es una patología grave que conduce a la muerte prematura a los 3 años de edad y no existe ningún tratamiento eficaz hasta el día de hoy. Existen diferentes razones que explican que sea difícil desarrollar estrategias terapéuticas. En primer lugar, se trata de una enfermedad cuya incidencia es muy baja, lo que complica la disponibilidad de muestras para su investigación y además es una enfermedad que se manifiesta y progresa muy rápidamente. Aunque los pacientes nacen aparentemente sanos, los primeros síntomas no aparecen hasta los 3-6 meses de vida, cuando la acumulación de SM ya es significativa. Las posibles terapias encaminadas a disminuir el daño derivado de la acumulación de SM, para ser eficaces deberían iniciarse en los primeros meses de vida. Por otro lado, el cerebro es un órgano clave, y la barrera hematoencefálica ha de tenerse en cuenta en cuanto al desarrollo de diferentes opciones o estrategias terapéuticas (24).

Unos niveles mínimos de ASM residual son suficientes para evitar la afectación neurológica como se ha demostrado en pacientes de NPB y en ratones con mutaciones similares y con unos niveles de ASM de más del 8% (24). Por tanto, una recuperación de la actividad de ASM podría ser una gran opción. En este sentido se han llevado a cabo varias aproximaciones enfocadas a aumentar de forma exógena los niveles de ASM, como la terapia de reemplazo enzimático mediante infusión intravenosa de ASM recombinante (25) o la terapia génica con el gen de la ASM (26), logrando efectos positivos a nivel periférico pero sin evitar la progresión neurológica de la enfermedad. La inyección estereotáxica en cerebro de adenovirus que expresan ASM disminuyó de forma local los niveles de SM (27), pero ocasionaba una gran respuesta inflamatoria, además de ser una estrategia invasiva y de difícil aplicación a los pacientes.

Por otro lado, también se han desarrollado estrategias con un abordaje farmacológico. La dexametasona, un glucocorticoide sintético, ha demostrado resultados beneficiosos en diferentes LSD donde existe inflamación, además es un activador de la esfingomielinasa neutral (NSM). Además es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque debe ser administrado a altas concentraciones, resultando inconveniente el tratamiento a largo plazo a estas concentraciones (28). En otra línea de estudio, el tratamiento oral con SAHA aumentaba los niveles de PMCA, previniendo el estrés oxidativo y mejorando la capacidad de memoria y motora en ratones NPA (9). Debido a la conocida alteración sobre la autofagia y la función lisosomal en la NPA, ensayos con *Hsp70* (*Heat Shock Protein 70*) han obtenido buenos resultados estabilizando la membrana lisosomal, mejorando la actividad de la enzima y reduciendo los niveles de SM en fibroblastos de pacientes NPA (29). Con una estrategia similar, se ha demostrado un efecto beneficioso de ApoD sobre la función lisosomal en fibroblastos NPA (13). En el presente trabajo también se ha demostrado el efecto beneficioso de ApoD frente a las alteraciones de la NPA tanto a nivel molecular como a nivel de organismo. Un reciente estudio ha demostrado que ApoD es secretada por astrogliá y vehiculada por vesículas extracelulares a las neuronas, protegiéndolas del estrés oxidativo (30). De esta forma, podría empezar a dibujarse una futura estrategia terapéutica basada en la administración exógena de ApoD.

6. Conclusiones

1. Las células de Purkinje son más vulnerables a la degeneración en la NPA y su muerte sigue un proceso temporal. Su afectación se traduce en una alteración de la coordinación motora.
2. La ausencia de ApoD en ratones NPA conlleva peores resultados en las pruebas de coordinación motora.
3. La disminución de calbindina en foliolo anteriores reflejaría la muerte celular acontecida en los mismos. En contraposición, el aumento de calbindina en foliolo posteriores, más marcado aún en ausencia de ApoD, reflejaría la muerte inminente de los mismos.
4. En la NPA encontramos una mayor astrogliosis y proporción de microglía activada en cerebelo, que podría estar relacionado con la neurodegeneración acontecida en el mismo.
5. La ausencia de ApoD acelera el proceso de neurodegeneración en el cerebelo.

6. En ratones NPA carentes de ApoD existe mayor pérdida de células de Purkinje que ratones NPA con ApoD, mayor astrogliosis y proporción de microglía activada lo que explica sus peores resultados en las pruebas de coordinación motora.
7. ApoD ejerce una función protectora ante las alteraciones moleculares de la NPA.

Bibliografía

1. Zampieri S, Filocamo M, Pianta A, Lualdi S, Gort L, Coll MJ, et al. SMPD1 Mutation Update: Database and Comprehensive Analysis of Published and Novel Variants. *Hum Mutat.* febrero de 2016;37(2):139-47.
2. Galehdari H, Tangestani R, Ghasemian S. New Single Nucleotide Deletion In the SMPD1 Gene Causes Niemann Pick Disease Type A in a Child from Southwest Iran: A Case Report. *Iran J Pediatr.* abril de 2013;23(2):233-6.
3. Wasserstein MP, Schuchman EH. Acid Sphingomyelinase Deficiency. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 12 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1370/>
4. Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, et al. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet.* julio de 1995;10(3):288-93.
5. Macauley SL, Sidman RL, Schuchman EH, Taksir T, Stewart GR. Neuropathology of the acid sphingomyelinase knockout mouse model of Niemann-Pick A disease including structure-function studies associated with cerebellar Purkinje cell degeneration. *Exp Neurol.* diciembre de 2008;214(2):181-92.
6. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 5 de junio de 1997;387(6633):569-72.
7. Gabandé-Rodríguez E, Boya P, Labrador V, Dotti CG, Ledesma MD. High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A. *Cell Death Differ.* junio de 2014;21(6):864-75.
8. Wang F, Gómez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic Cph Den.* 20 de agosto de 2018;
9. Pérez-Cañamás A, Benvegnù S, Rueda CB, Rábano A, Satrústegui J, Ledesma MD. Sphingomyelin-induced inhibition of the plasma membrane calcium ATPase causes neurodegeneration in type A Niemann-Pick disease. *Mol Psychiatry.* 2017;22(5):711-23.
10. 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.
11. Muffat J, Walker DW, Benzer S. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 de mayo de 2008;105(19):7088-93.
12. Manuela del Caño Espinel. Relación de Apoliproteína D y sus homólogos en *Drosophila* con las membranas biológicas. Estudio de su función en diferentes procesos celulares y de su localización y efectos sobre las balsas lipídicas. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid; 2014.
13. Pascua-Maestro R, Diez-Hermano S, Lillo C, Ganfornina MD, Sanchez D. Protecting cells by protecting their vulnerable lysosomes: Identification of a new mechanism for preserving lysosomal functional integrity upon oxidative stress. *PLoS Genet.* 2017;13(2):e1006603.
14. R. Pascua-Maestro, M. Corraliza-Gómez, C. Fadrique Rojo, M.D. Ledesma, D. Sánchez, M.D. Ganfornina. Apolipoprotein-D mediated preservation of lysosomal function promotes cell survival and delays motor control impairment in Niemann-Pick type A disease. Abstract aceptado para presentación en Congreso: 18th National Meeting of the Spanish Society of Neuroscience (SENC 2019).

15. 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.
16. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. enero de 2010;119(1):7-35.
17. Davis EJ, Foster TD, Thomas WE. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull*. 1994;34(1):73-8.
18. Bernocchi G, Scherini E. [Studies on eosinophilic Purkinje cells. Effects of protein maternal malnutrition of their occurrence during cerebellar histogenesis in the rat (author's transl)]. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1980;50(2):159-61.
19. Lalonde R, Strazielle C. Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. *Brain Res Rev*. 24 de junio de 2011;67(1-2):252-9.
20. Barski JJ, Hartmann J, Rose CR, Hoebeek F, Mörl K, Noll-Hussong M, et al. Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 de abril de 2003;23(8):3469-77.
21. Dhar P, Kaushal P, Kumar P. Antioxidant supplementation upregulates calbindin expression in cerebellar Purkinje cells of rat pups subjected to post natal exposure to sodium arsenite. *Brain Res*. 01 de 2018;1690:23-30.
22. Gabandé-Rodríguez E, Pérez-Cañamás A, Soto-Huelin B, Mitroi DN, Sánchez-Redondo S, Martínez-Sáez E, et al. Lipid-induced lysosomal damage after demyelination corrupts microglia protective function in lysosomal storage disorders. *EMBO J*. 15 de enero de 2019;38(2).
23. Gyengesi E, Rangel A, Ullah F, Liang H, Niedermayer G, Asgarov R, et al. Chronic Microglial Activation in the GFAP-IL6 Mouse Contributes to Age-Dependent Cerebellar Volume Loss and Impairment in Motor Function. *Front Neurosci*. 2019;13:303.
24. Jones I, He X, Katouzian F, Darroch PI, Schuchman EH. Characterization of common SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease and generation of mutation-specific mouse models. *Mol Genet Metab*. noviembre de 2008;95(3):152-62.
25. Miranda SR, He X, Simonaro CM, Gatt S, Dagan A, Desnick RJ, et al. Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into niemann-pick disease mice leads to visceral, but not neurological, correction of the pathophysiology. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. octubre de 2000;14(13):1988-95.
26. Miranda SR, Erlich S, Friedrich VL, Gatt S, Schuchman EH. Hematopoietic stem cell gene therapy leads to marked visceral organ improvements and a delayed onset of neurological abnormalities in the acid sphingomyelinase deficient mouse model of Niemann-Pick disease. *Gene Ther*. octubre de 2000;7(20):1768-76.
27. Dodge JC, Clarke J, Treleaven CM, Taksir TV, Griffiths DA, Yang W, et al. Intracerebroventricular infusion of acid sphingomyelinase corrects CNS manifestations in a mouse model of Niemann-Pick A disease. *Exp Neurol*. febrero de 2009;215(2):349-57.
28. Arroyo AI, Camoletto PG, Morando L, Sassoe-Pognetto M, Giustetto M, Van Veldhoven PP, et al. Pharmacological reversion of sphingomyelin-induced dendritic spine anomalies in a Niemann Pick disease type A mouse model. *EMBO Mol Med*. 2014;6(3):398-413.
29. Kirkegaard T, Roth AG, Petersen NHT, Mahalka AK, Olsen OD, Moilanen I, et al. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature*. 28 de enero de 2010;463(7280):549-53.
30. 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.