

# Avieyamientu, Alzheimer y Apo D

Por **Jorge Tolivia, Eva del Valle, Eva Martínez-Pinilla y Ana Navarro**

Departamentu de Morfoloxía y Bioloxía Celular

Área de Bioloxía Celular

Universidá d'Uviéu



Microscopiu Nikon Eclipse E400

## ENTAMU

L'Apo D humana ye una pequeña glicoproteína detectada per primer vegada nel plasma y aislada darréu de les lipoproteínas d'alta densidá (HDL) del plasma sanguíneo humano, nel añu 1973 per parte de McConathy y Alaupovic (1973). Amás de formar parte de les lipoproteínas del plasma, l'Apo D apaec espresada nos más de los texíos y secreciones corporales de multitud de mamíferos (Rassart et al., 2000), xugando un papel fundamental na fisioloxía celular, asina como en diverses patoloxíes, sobre manera'l cáncer (Díez-Itza et al., 1994; López-Boado et al., 1994).

### 1.- Carauterístiques estructurales y moleculares de l'Apo D

El xen de l'Apo D allúgase nel brazu curtiu del cromosoma 3 (3q26.2) humanu (Drayna et al., 1987). Esti xen contién 5 exones y una rexon promotora (Lambert et al., 1993), que presenta una bayura d'elementos reguladores y de respuesta a diferentes moléculas (Lambert et al., 1993; Rassart et al., 2000).

El resultáu de la espresión del xen de l'Apo D ye una proteína altamente glicosilada con un pesu molecular que va ente los 19 y 32 KDa dependiendo precisamente del estáu de glicosilación d'esta. De fechu, afírmase que'l 18% del pesu total d'esta apolipoproteína son carbohidratos (Drayna et al., 1987) y, dependiendo del texíu au se sintetiza, el patrón de glicosilación de l'Apo D humana camuda.

L'Apo D afayóse tamién n'otros mamíferos (rata, mur, coneyu, cobaya etc). L'Apo D de la rata ye mui asemeyada a la humana, non solo nel so pesu molecular, sinón tamién nel so puntu isoeléctricu, patrón de glicosilación y secuencia aminoacídica. Asocede igual cola Apo

D de mur, que comparte cola humana un 71% d'asemeyanza (Cofer y Ross, 1996), mientras que nel casu del coneyu y de la cobaya revelen un 80% y 78% d'asemeyanza, respetivamente, cola Apo D humana (Provost et al., 1990; 1995). Amás, esta apolipoproteína nun ye esclusiva de los mamíferos, yá que tamién s'atopó n'otros organismos, dalgunos mui alloñaos evolutivamente falando.

Nes aves, tien un pesu molecular próximu a los 29 KDa, y localízase vanceyada a la fracción lipoproteica del plasma. N'inseutos como *Drosophila melanogaster*, identificóse la lipocalina ortóloga a l'Apo D de mamíferos, la proteína Lazariello (Sánchez et al., 2000a; 2000b). N'*Escherichia coli* carauterizóse una lipocalina bacteriana, denominada Blc con un 31 % d'asemeyanza con l'Apo D humana (Bishop, 2000).

### 2.- Lligandos de l'Apo D

L'Apo D, al igual que la de la mayoría de les lipocalines, presenta un llugar de xuntura a lligandos hidrofóbicos. Hasta'l momentu foi a identificase y describir dalgunos d'ellos, con mayor o menor afinidá, como'l Colesterol, la Bilirrubina y estremaos Esteroides (proxestáxenos, andróxenos y estróxenos, nesti orde), l'ácidu araquidónico (AA), l'ácidu 3-metil 2-hexanoico, etc.

### 3.- Regulación de la espresión de l'Apo D

La espresión de l'Apo D ta modulada por estremaos factores, a distintos niveles, lo que xunto cola gran cantidá d'elementos de respuesta presentes nel so promotor, faen de la regulación d'esta proteína un mecanismu mui complexu. La rexon promotora de l'Apo D presenta elementos de respuesta a estróxenos (ERE), proxesterona (PRE), glucocorticoides (GRE), hormones tiroideas (TRE), elementos de respuesta de fase

***La espresión de l'Apo D ta modulada por estremaos factores, a distintos niveles, lo que xunto cola gran cantidá d'elementos de respuesta presentes nel so promotor, faen de la regulación d'esta proteína un mecanismu mui complexu***

aguda (APRE), elementos específicos de la grasa (FSE), elementos de respuesta a estrés (STRE), elementos de respuesta al sueru (SER) y un elementu represor dependiente d'esteroles (SDR) (Lambert et al., 1993).

Les hormones sexuales masculines y femenines son importantes reguladores de la espresión d'esta apolipoproteína darréu que, como yá vimos, el promotor presenta ERE y PRE. Asina, en delles castres de llinies celulares de carcinoma mamarriu y prostáticu, viose que l'adición d'andróxenos produz un incrementu na espresión d'Apo D, xunto con un baxada significativa na proliferación del cultivu (Simard et al., 1991; Zhang et al., 1998). Pela cueta, los estróxenos mengüen la espresión d'Apo D, al igual qu'exercen un efeutu estimulante sobre la proliferación celular (Simard et al., 1991). Poro, paez haber daqué rellación ente la espresión de la proteína y la proliferación celular (Lopez-Boado et al., 1994).

Les interleucines tamién van a ser pa regular la espresión d'Apo D en determinades situaciones. Viose que la interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) aumenta la espresión d'Apo D, al empar que mengua la proliferación celular, mentanto que la interleucina 6 (IL-6) provoca una baxada tanto de la secreción de l'apolipoproteína como de la proliferación celular (Blais et al., 1994).

Dalgunos estudios tamién suxeren que la espresión de l'Apo D ta modulada per aciu del ácidu retinoico. De fechu, l'adición d'ácidu retinoico a cultivos de llinies celulares de cáncer de mama, induz la espresión d'Apo D d'una manera dosis-dependiente, de la que produz un descensu de la proliferación d'estes célules y la so diferenciación (López-Boado et al., 1994). D'igual mente, el 25-hidroxicolesterol, molécula rellacionada col colesterol, exerce sobre cultivos primarios d'astrocitos efeutos mui asemeyaos (Patel et al., 1995).

**Nos humanos, les glándules adrenales, los reñones y el sistema nerviosu son los llugares de mayor síntesis d'Apo D, siguíos de páncrees, bazu, pulmones, placenta, endometriu, ovarios y testículos. Nel intestín y el fégadu, llugares de mayor espresión del restu d'apolipoproteínas, los valores d'ARNm d'Apo D son perbaxos**

En cultivos primarios de fibroblastos observóse, per aciu de téuniques d'hibridación «in situ», un incrementu del ARNm de l'Apo D cuando estes célules entren en procesos de senescencia o parada de la so proliferación (Provost et al., 1991a). Comprobóse que les rexones del promotor responsables d'esti fenómenu yeren un par de SER, amás d'una rexón rica en purines y pirimidines.

Tamién se demostró un incrementu de la síntesis y espresión de l'Apo D en determinaes situaciones d'altu estrés oxidativu, bien seya inducíu de mou artificial al traviés de l'adición d'estresantes o en patoloxíes que presenten como factor determinante un eleváu estrés celular. D'esti mou, viose un incrementu de la síntesis d'Apo D tres la mancadura del nerviu periféricu de rata (Boyles et al., 1990a; Spreyer et al., 1990).

#### 4.- Allugamientu y espresión de l'Apo D

Per aciu de la utilización de téuniques inmunohistoquímiques, d'hibridación *in situ* o d'inmunotransferencia, detectóse la presencia de l'Apo D en diversos muérganos, texíos y fluyíos, tanto de mamíferos como de non mamíferos, si bien hai diferencies interespecífiques en cuantes a la distribución tisular d'ella (Boyles et al., 1990a,b; Provost et al., 1990; Smith et al., 1990; Seguin et al., 1995).

Nos humanos, les glándules adrenales, los reñones y el sistema nerviosu (SN) son los llugares

de mayor síntesis d'Apo D, siguíos de páncrees, bazu, pulmones, placenta, endometriu, ovarios y testículos. Nel intestín y el fégadu, llugares de mayor espresión del restu d'apolipoproteínas, los valores d'ARNm d'Apo D son perbaxos (Rassart et al., 2000). Amás d'espresase en distintos muérganos, tamién se detectó en numerosos fluyíos y secreciones corporales como'l plasma, el llíquidu cefalorraquídeo, el fluyíu lacrimonal, la perilinfa y los fluyíos del oyíu internu y la secreción axilar apocrina. D'igual miente, ye l'apolipoproteína mayoritaria de la orina, asina como'l componente principal del fluyíu quístico en muyeres con mastopatía fibroquística (Rassart y col., 2000).

#### 5.- Funciones de l'Apo D

Como vimos yá, l'Apo D espresase en multitú de muérganos, texíos y fluyíos corporales, siendo p'axuntar estremaos lligandos, que pueden camudar acordies coles condiciones del muérganu o texíu onde s'atope, polo que se considera una proteína multiligandu-multifunción. L'Apo D nesti sentíu, xugaría un papel importante na fisioloxía y nes rutes de regulación celular, per aciu de la capacidá de tresporte y de formar dímeros y trímeros tanto homólogos como heterólogos con otres moléculas.

Nel plasma l'Apo D forma parte principalmente de les HDL, magar que tamién se pueden atopar traces nes lipoproteínas de baxa den-

sidad (LDL) y nes de mui baxa densidá (VLDL) (Camato et al., 1989). Pola so pertenencia a estes lipoproteínas y n'asociación cola LCAT y la CEPT, intervendría nel tresporte del escesu de colesterol dende los texíos periféricos hasta'l fégadu, pal so catabolismu. La so afinidá por ciertos esteroides fixo que se-yos diere un papel como tresportador esteroideu, nos testículos y les glándules adrenales, asina como de proxerona nes glándules mamaries. Amás, suxirióse la participación de la isoforma ASOB2, detectada na secreción axilar apocrina, nel tresporte de señales goloroses emplegaes na comunicación al traviés de feromonas (Rassart et al., 2000).

#### 5.1. Función de l'Apo D a nivel de sistema nerviosu

Como se dixo primero, l'Apo D espresase de mou importante nel SN de los más de los mamíferos, tanto nel SNC como nel SNP, onde la sintetecen dalgunos tipos de célules y otres la captan, acordies colos sos requerimientos, pudiendo tar rellacionada col tresporte lipídicu y los procesos de rexeneración y remielinización.

##### 5.1.1. L'Apo D nel sistema nerviosu central

L'Apo D allúgase en distintos tipos celulares de mamíferos como los astrocitos, oligodendrocitos, célules precursoras d'oligodendrocitos, dalgunes neuronas, asina como célules piales y perivasculares (Provost y cols, 1990, 1991b; Smith et al., 1990; Patel et al., 1995; Seguin et al., 1995; Navarro et al., 1998). L'Apo D, nes estes célules, taría implicada nel tresporte de lípidos y hormonas esteroidees, al igual que nos procesos d'esterificación del colesterol (Patel et al., 1995; Rassart et al., 2000).

##### 5.1.2. L'Apo D nel sistema nerviosu periféricu

Los estudios sobre l'Apo D nel SNP son escasos. Sábase que l'Apo D secrétenla de manera normal los fibroblastos y célules de Schwann del SNP, contribuyendo al caltenimientu, homeostasis y movimientu lipídicu nos nervios periféricos (Boyles et al., 1990a; Rassart et al., 2000). Dalgunos autores describieron incrementos d'esta síntesis na rexeneración y remielinización que sigue a la mancadura de los nervios periféricos. Esti fenómenu tamién asocede na rexeneración de los nervios ciáticos d'otros mamíferos, como'l monu o'l coneju (Boyles et al., 1990a; Spreyer et al., 1990). Según tolos estudios fechos hasta agora, l'Apo D actuaría na captación, tresporte y reutilización tanto de los lípidos liberaos tres el dañu, como del colesterol y los sos ésteres por mor de la estabilización del enzima LCAT, contribuyendo a la biosíntesis de les vainas de mielina nel procesu de rexeneración y remielinización de los axones dañaos (Boyles et al., 1990a; Spreyer et al., 1990).

L'estudiu del papel de l'Apo D nel SNP va más allá, demostrándose non solo la importancia d'esta apolipoproteína nos procesos de rexeneración de los nervios periféricos, sinón tamién na formación del SN a lo llargo del desendolcu embrionariu. Demostróse asina que la proteína Lazariello, lipocalina ortóloga a l'Apo D de mamíferos, ye imprescindible pa la formación y orientación acionada de los axones nel desendolcu embrionariu de los ortópteros (Sánchez et al., 2000a).

### 6.- Apo D y Neuropatoloxías

La enfermedá d'Alzheimer esporádica (EA) ye la más común de les demencies y ta carauterizada clínicamente por una perda fatal, irreversible y progresiva de la memoria y les capacidaes cognitives. Dende un puntu de vista anatomo-patolóxicu carauterízase amás de por una perda progresiva de neurones, neurites y sinapsis, pola presencia de plaques seniles nel parénquima nerviosu (Beta amiloide extracelular) y lluviellos neurofibrilares nes neurones (compuestos por proteína Tau hiperfosforilada). Buscáronse asociaciones ente entrambos marcadores, magar que l'aniciu de los dos procesos posiblemente asoceda de forma independiente na EA. La hiperfosforilación de Tau comienza nel córtex entorrinal y d'ende va espardece al sistema límbicu y posteriormente a otres rexones de la neocorteya con un patrón de dispersión que Braak y Braak (1995) carauterizaron eshaustivamente. La demencia clínica correllaciónase meyor col estadiaxe de Braak que col depóscitu d'amiloide.

El principal componente de les plaques seniles ye'l péptidu Beta amiloide ( $\beta$ A). L'amiloide ye un términu xenéricu emplegáu pa facer referencia a dalgunes proteínes con diferentes secuencies aminoacídices y de les que la so estructura secundaria ye una fuya  $\beta$  plegada na que los polipéptidos tán orientaos perpendicularmente a la exa mayor de la fibrina. La insolubilidad del amiloide y la so relativa resistencia a la proteólisis failu un depóscitu común de les malures producies por acumulación de péptidos mal plegaos. Nel casu de la EA, el  $\beta$ A ye un péptidu hidrofóbicu y non glicosiláu de 40-42 aminoácidos que se xenera per una vía amiloidoxénica del procesamientu proteolíticu d'una proteína precursora amiloide (APP). Les mutaciones nesta proteína APP y los sos enzimes proteolíticos causen sobreproduc-

ción de  $\beta$ A insoluble nel cerebru y demenciú tipo EA. Los estudios demuestren tamién que'l péptidu  $\beta$ A ye tóxicu pa les neurones, lo que llevó al desendolcu de la «hipótesis amiloidoxénica» de la EA. Acordies con esti modelu, la deposición del  $\beta$ A apaez por mor d'un desequilibriu na producción y llimpieza d'esti que sedrá direutamente responsable del dañu causáu por radicales llibres nes membranes de la neurona, lo que produz la subsecuente neurodexeneración nel cerebru del paciente d'EA. Según esta hipótesis l'acumulación del  $\beta$ A precedería a la hiperfosforilación de Tau y la formación de los lluviellos intracelulares (Hardy y Allsop, 1991).

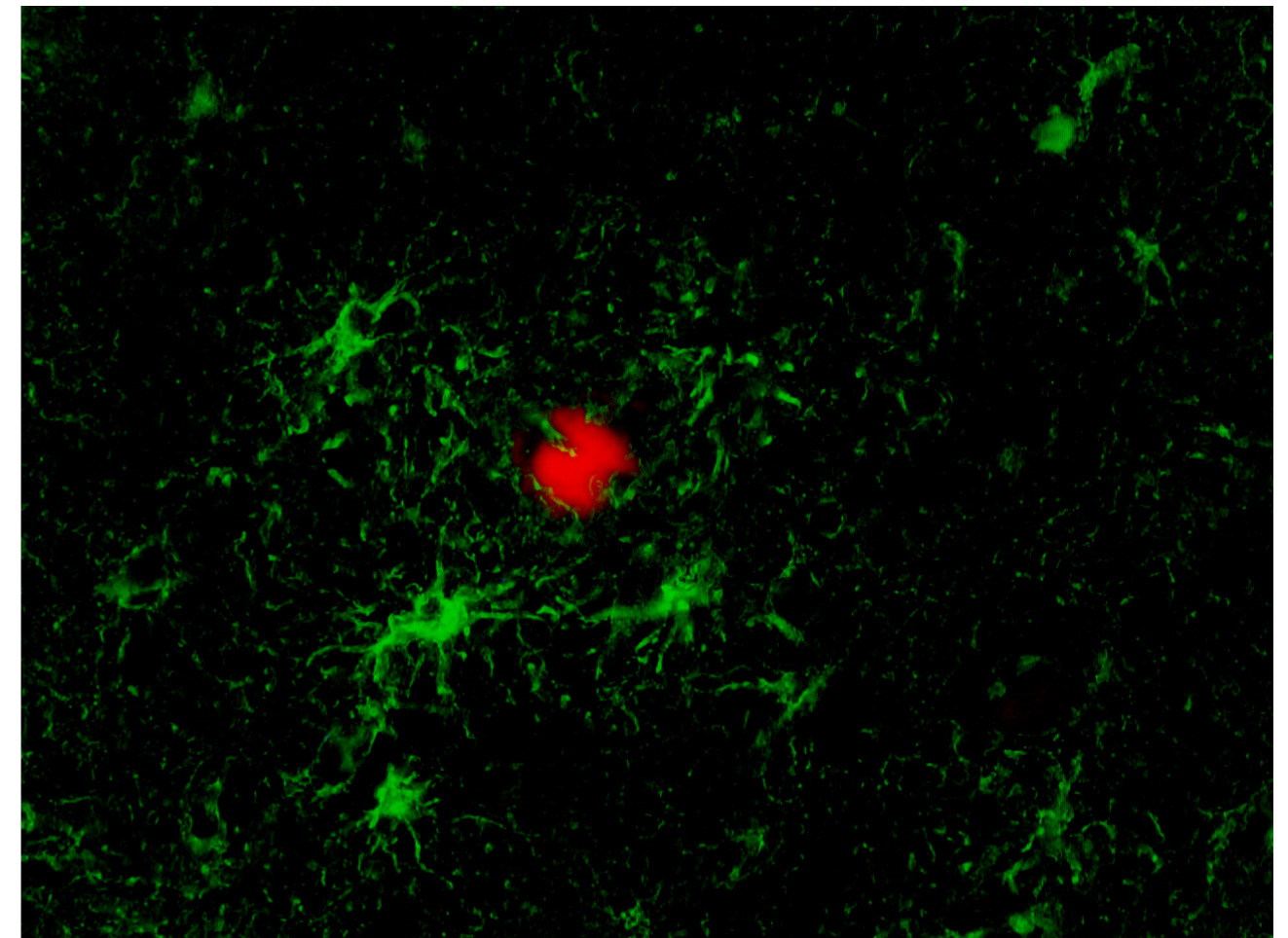
Les fibrines de  $\beta$ A na EA suelen tar nes paredes de los vasos, corticales y leptomenínxeos, y nel mediu estracelular formando les plaques seniles. Estes plaques contienen amás neurites distrófiques, glía reactiva y munches otres moléculas venceyaes, como proteoglicanos, apolipoproteínes, moléculas inflamatorias y vitronectina. Dalgunes d'estes moléculas pueden acelerar la formación de fibrines de  $\beta$ A mientras qu'otres pueden inhibir el procesu. Les plaques seniles (PS) pueden presentase de dos formes, plaques difuses (PSD) y plaques madures (PSM).

La patoloxía de la proteína Tau reconozse como'l factor clave de la progresión de la EA y otres enfermedaes neurodexeneratives. Los agregaos de Tau tamién s'agrupen en filamentos mui xuntos, pero a diferencia de les plaques, acúmlense intracelularmente nes neurones enfermes, onde se conocen como lluviellos neurofibrilares (ONF). El términu filamentu helicoidal paréau, o FHP, úsase davezu pa describir los filamentos de tau individuales que tán nos ONF. Camiéntase qu'estos agregaos son tóxicos pa les neurones, yá seya produciendo defeutos de señalización neurotóxicos o al torgar la función

*La enfermedá d'Alzheimer esporádica (EA) ye la más común de les demencies y ta carauterizada clínicamente por una perda fatal, irreversible y progresiva de la memoria y les capacidaes cognitives. Dende un puntu de vista anatomo-patolóxicu carauterízase amás de por una perda progresiva de neurones, neurites y sinapsis, pola presencia de plaques seniles nel parénquima nerviosu y lluviellos neurofibrilares nes neurones*

ABAXO

Centru amiloideu (coloráu) d'una placa senil arrodiada d'astrocitos (verde), acordies cola téunica de Navarro et al (2013a).

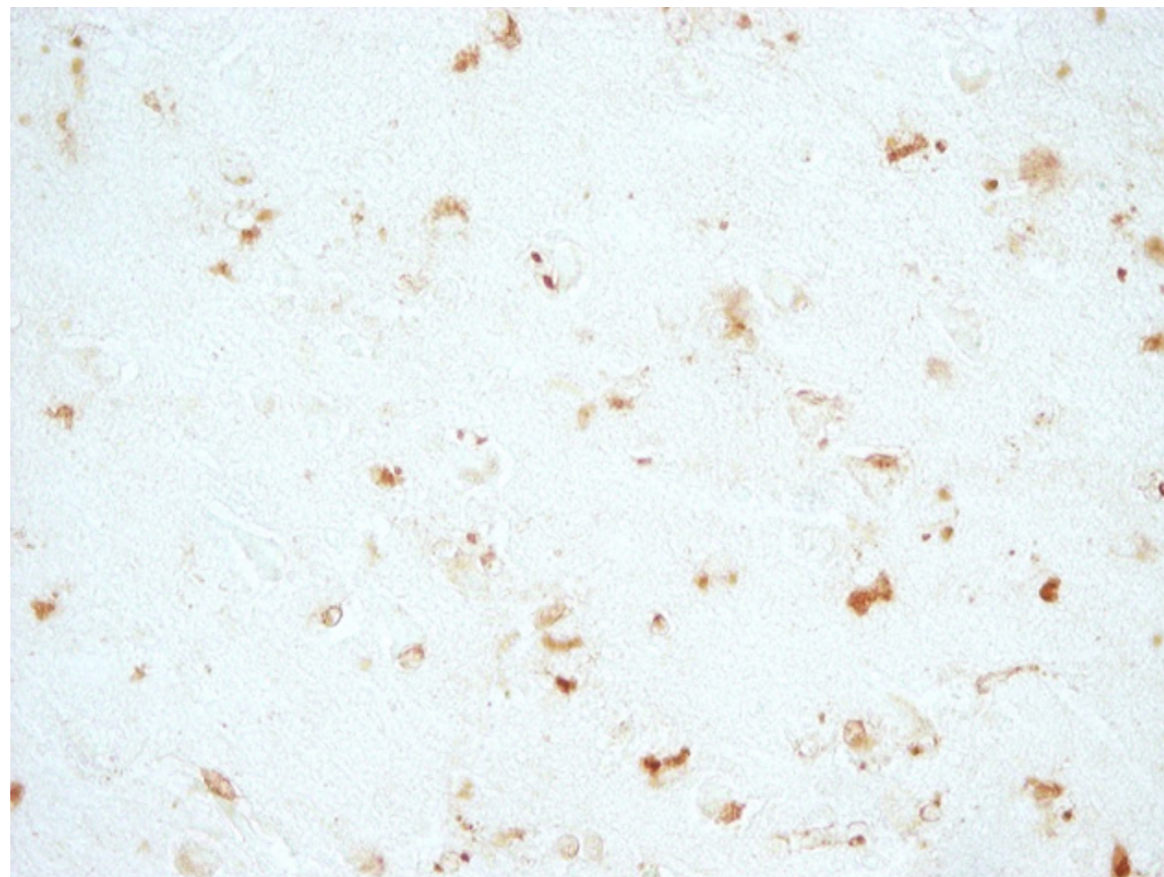


de la célula por desorganización del citoesqueleto. Los factores que contribuyen a la acumulación de agregados de Tau incluyen la hiperactividad de la vía de señalización de la GSK3, el aumento de la tasa de mal plegamiento de proteínas, la generación de oligómeros amiloides, la hipofunción de los sistemas de reparación, tales como los chaperones o el sistema ubiquitina-proteasoma, o fallos en los mecanismos de defensa antioxidante.

Si bien las causas posteriores de esta neuropatología tan poco se conocen, evidencias recientes involucran en el desarrollo patológico de la enfermedad a algunos procesos tales como el estrés oxidativo (EO), la inflamación y la alteración del metabolismo lipídico.

El gen APOE se ha convertido en los últimos años como un importante factor de riesgo, dado que diferentes alelos de la Apolipoproteína E (Apo E) influyen de manera importante en la incidencia de la EA. La presencia del alelo APOE  $\epsilon$ 4 en los pacientes incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad y adelanta la edad de inicio. La Apo E forma parte de los depósitos amiloides, junto con otras moléculas asociadas. Entre ellas rescatamos también otras apolipoproteínas como la Apo D y la Apo J. La presencia de estas apolipoproteínas junto con las fibras de amiloide originaron diferentes explicaciones sobre si estas intervienen en la fibrilación o en la limpieza del  $\beta$ A o si, por otro lado, juegan un papel crítico en la regulación lipídica a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Carter, 2007).

La Apo J, también conocida como clusterina, es una apolipoproteína abundantemente expresada en el SNC. La expresión de Apo J aumenta en la EA y se describió su presencia en neuronas, astrocitos y placas seniles. Aunque no está claro, postuló que regularía la formación de fibrillas de  $\beta$ A y facilitaría el transporte de este a través de la barrera hematoencefálica. La función de la Apo J se ha relacionado con la acumulación de  $\beta$ A y con la regulación lipídica.

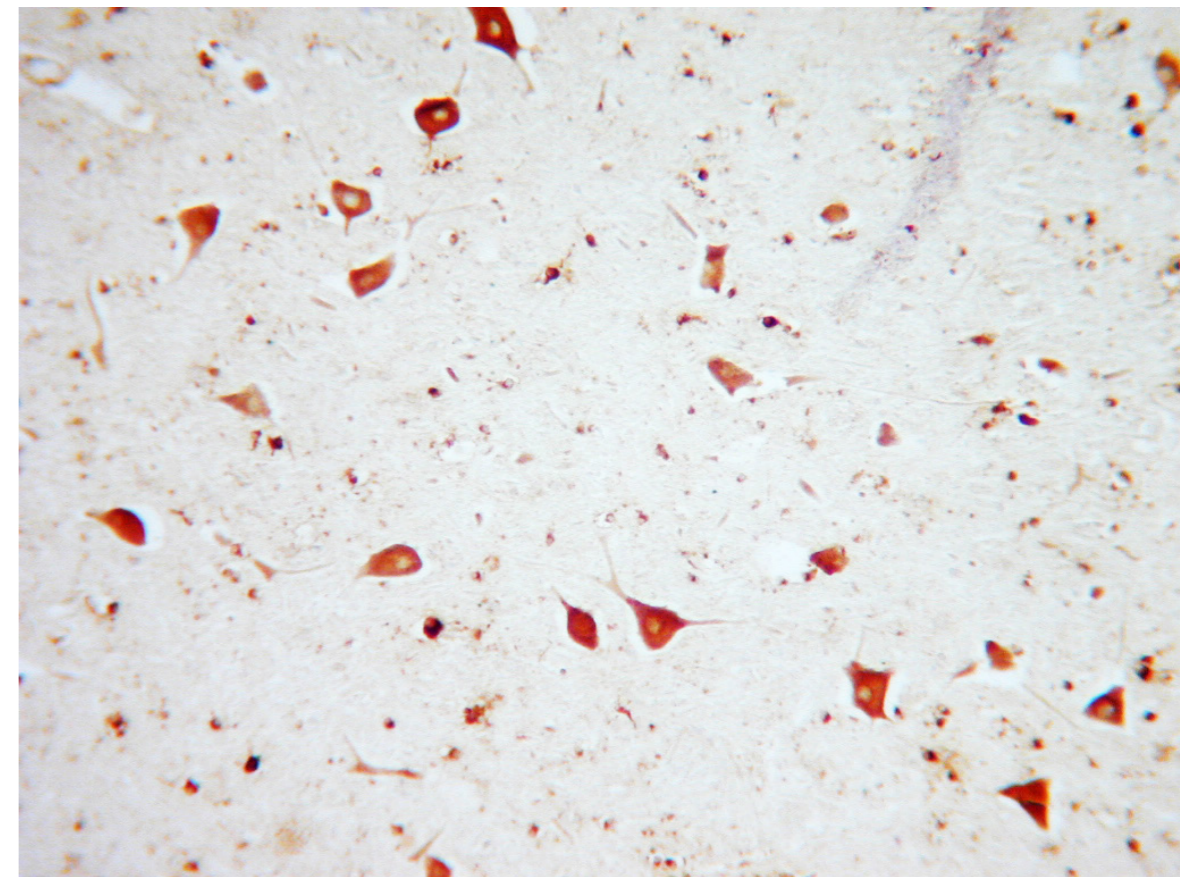


**ARRIBA IZQUIERDA**

Nesta micrografía obsérvase la expresión d'Apo D (marrón) nel córtex cerebral d'un home de 70 años.

**DERECHA**

Nesta micrografía vese la expresión d'Apo D (marrón) nel nucleu Facial d'un home de 40 años. Destaca la cantidá d'esta proteína presente a una edá tan temprana.



sequestran proteínas y oligómeros mal plegados para encontrar un papel protector como proteína chaperona extracelular. Los estudios de asociación de genoma completo demostraron que las variaciones en el gen clusterina (CLU) pueden influir en el riesgo de desarrollar la EA.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En estudios de cerebro humano adulto se descubrió una alta inmunoreactividad para Apo D en elementos neurogliales, sobre todo en células gliales de la sustancia blanca. Tanto el cuerpo como las prolongaciones de estas células muestran un intenso depósito de Apo D. En contraste, en algunas de las células gliales de la sustancia gris aparecen con marcada intensidad para Apo D. Estos hallazgos concuerdan con estudios realizados

en otras especies (Boyles y cols, 1990b; Ong et al., 1997; Provost et al., 1990; Spreyer et al., 1990). Por el contrario, las neuronas Apo D positivas solo se encontraron de forma general en algunas de las regiones cerebrales estudiadas, siendo poco frecuentes en otras (Navarro et al., 1998). Junto con esta aparente expresión diferencial de Apo D en distintas regiones encefálicas estudiadas, también se observaron diferencias importantes al respecto de esta expresión en relación con la edad.

**1.- Allugamientu de l'Apo D rexón y celular dependiente**

La presencia de Apo D es prácticamente constante a nivel de la sustancia blanca de todas las regiones del SNC estudiadas. Este allugamiento se centra fundamentalmente en los oligodendrocitos

d'esta sustancia. Pelo contrario, l'allugamientu a nivel de la sustancia gris presenta variaciones mui considerables nes estremaes zones del SNC (Navarro et al., 1998, 2004, 2010; Juárez, 2003; Valle del, 2002). En rrellación con esto observamos cómo na sustancia gris de los centros superiores la espresión taba ausente o yera mínima y nesti casu reducida fundamentalmente a los oligodendrocitos y dalgún elementu perivascular (Navarro et al., 1998, 2010; Juárez, 2003; Valle del, 2002). Esti patrón repetíase a nivel del cerebelu, por más que nesti casu, y a nivel de la capa ganglionar observábase la presencia de dalguna neurona de Purkinje positiva p'Apo D (Navarro et al., 1998; Valle del et al., 2001). Cuando nos fixamos en centros nerviosos más primitivos, filoxenéticamente falando, pudo observase que la inmunopositividá yera más acentuada en toles zones del parénquima nerviosu y amás aumentaba notablemente la presencia d'Apo D a nivel neuronal. Esta espresión neuronal yera prácticamente total a nivel de les agrupaciones neuronales de la médula y la mayor parte de los núcleos de la protuberancia y del bulbu raquideu (Juárez, 2003; Méndez, 2009). Sicasí, de forma llamadera, apaecien neses rexones del SNC, onde la espresión neuronal d'Apo D yera mui intensa, determinaes agrupaciones de neuronas con una

aparente incapacidá d'espresión y/o captación dende'l so entornu, inclusive magar que los elementos gliales más próximos tamién yeren inmunopositivos (Juárez, 2003; Méndez, 2009). Una d'estes rexones ye la Sustancia Negra Mesencefálica, con unes neuronas que son inmunonegatives p'Apo D (Ordóñez et al., 2006).

Per aciu de téuniques de doble marcaxe p'Apo D y GFAP pudimos comprobar la existencia d'un claru comportamientu diferencial d'espresión de l'Apo D per parte de los oligodendrocitos y les célules astrogliales. Na sustancia gris del córtex cerebral humanu allugábase la espresión d'Apo D a nivel mayoritariu de los oligos, pero tamién apaecien, de forma escasa y dispersa dalgunos elementos astrogliales marcaos. Estos astrocitos que presentaben doble marcaxe, asítiense preferencialmente en rrellación colos vasos sanguíneos y amuesen les carauterístiques estructurales d'astrocitos protoplasmáticos. Pela cueta, la sustancia blanca presentaba un intensu marcaxe pa GFAP pero nun s'observa en nengún casu una colocalización con Apo D y les carauterístiques d'estes célules englobales dientro de los astrocitos fibrosos de la nomenclatura clásica. Esti marcaxe apaecía, sicasí, de forma intensa n'otres célules, GFAP negatives y que pola so morfología correspon-

dien a oligodendrocitos (Navarro y et al. 2004).

L'estudiu fechu a nivel de cerebelu dio resultados mui asemeyaos. El marcaxe pa GFAP marcó célules asemeyaes poles sos carauterístiques a les descrites na sustancia blanca cortical, nes tres capes cerebeloses, pero mayoritariamente estes célules nun yeren positives p'Apo D, namás dalguna de les allugaes na capa granular amosó un llixeru marcaxe positivu p'Apo D. Asina mesmo la estirpe glial conocida como Glía de Bergman, tamién amuesa una clara inmunonegatividá p'Apo D. Como asocedía na sustancia blanca del córtex la inmunopositividá p'Apo D allúgase de forma prácticamente exclusiva nos oligodendrocitos (Navarro et al., 2004).

## 2.- Espresión de l'Apo D

### 2.1.- Espresión diferencial d'Apo D dependiente de la edá (Córtex Cerebral)

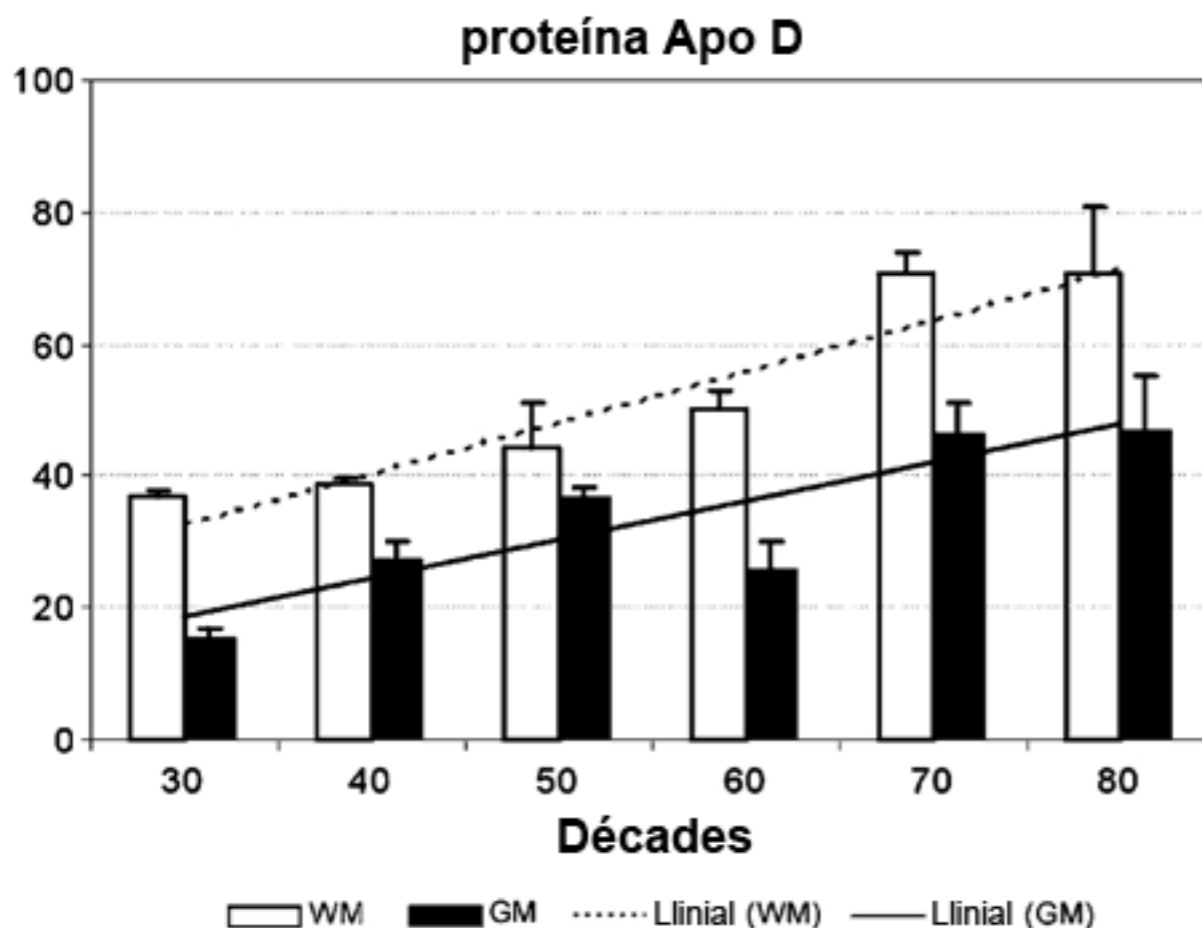
L'estudiu de la presencia d'Apo D a lo llargo de les distintes décadas, pon de manifiestu un claru incrementu na señal d'Apo D rrellacionada cola edá del individuu. Nos individuos mozos la señal presente na sustancia gris ye dispersa y feble. Esta señal allúgase principalmente nos elementos gliales, en dalgunes célules menínxees y perivasculares. Na sustancia blanca la señal ye más intensa y asítiase fundamentalmente nos oligodendrocitos (Navarro et al., 1998, 2010; Juárez, 2003; Valle del, 2002). Nel avieyamientu increméntase notablemente la señal asina como'l númberu de célules marcaes na sustancia blanca. Na sustancia gris va intensificándose progresivamente la señal, tanto n'intensidá como en tipos celulares marcaos, apaeciendo, xunto colos oligos, célules astrogliales tamién inmunopositivos (Navarro et al., 2010; Juárez, 2003; Valle del, 2002).

Nos individuos mozos nun apaecen neuronas marcaes, sacante esporádicamente y con un marcaxe sonce (Navarro et al., 1998). Col pasu del tiempu entamen a apaecer elementos neuronales marcaos. Esti marcaxe enánchase cola edá, asina como'l númberu de neuronas el númberu de neuronas corticales Apo D positives. El marcaxe comienza nes neuronas piramidales estendiéndose llueu a les granulares. Estes neuronas positives nun manifiesten alteraciones estructurales, sinón que, al contrario, presenten toles carauterístiques d'una neurona dafechamente funcional (nucleu eucromatínicu de gran tamañu, nucleolu mui aparente, abundantes gránulos de Nissl) (Navarro et al., 2010; Juárez, 2003; Valle del, 2002).

Los individuos mozos tamién presenten inmunorreactividá a nivel de los vasos sanguíneos, tanto piales como subpiales, al igual qu'a nivel cortical y subcortical. La intensidá de marcaxe de los vasos intensifícase tamién cola edá fundamentalmente nos piales y namás llixeramente nos corticales. L'inmunomarcaxe apaec de forma continua na parede de los vasos de pequeñu calibre y de forma discontinua nos de mayor calibre. Dalgunos elementos celulares perivasculares, pericitos y fibroblastos, amuesen marcaxe p'Apo D, pero esto nun s'observa nes célules endoteliales (Navarro et al., 1998, 2010; Juárez, 2003; Valle del, 2002).

L'análisis per aciu de «Western Blot» punxo de manifiestu la espresión d'Apo D tanto na sustancia blanca como na sustancia gris de la corteza frontal. Nesti sen, y en tolos extractos cerebrales analizaos, detectóse la presencia d'una banda, correspondiente a una proteína mui glicosilada pol so aspeutu, ente 29 y 31 kDa que se correspuende cola Apo D.

***L'estudiu de la presencia d'Apo D a lo llargo de les distintes décadas de la vida, pon de manifiestu un claru incrementu na señal d'Apo D rrellacionada cola edá. Nos individuos mozos la señal presente na sustancia gris ye dispersa y feble, y allúgase principalmente nos elementos gliales, en dalgunes célules menínxees y perivasculares. Na sustancia blanca la señal ye más intensa y asítiase fundamentalmente nos oligodendrocitos. Nel avieyamientu increméntase notablemente la señal asina como'l númberu de célules marcaes na sustancia blanca. Na gris va medrando progresivamente la señal, tanto n'intensidá como en tipos celulares marcaos, apaeciendo, xunto colos oligos, célules astrogliales tamién inmunopositivos***



**ARRIBA**

Gráfica que recueye la expresión d'Apo D, nel córtex cerebral, en relación cola edá y el sexu. Hai que destacar qu'hai un aumentu progresivu claramente edá-dependiente.

**ABAXO**

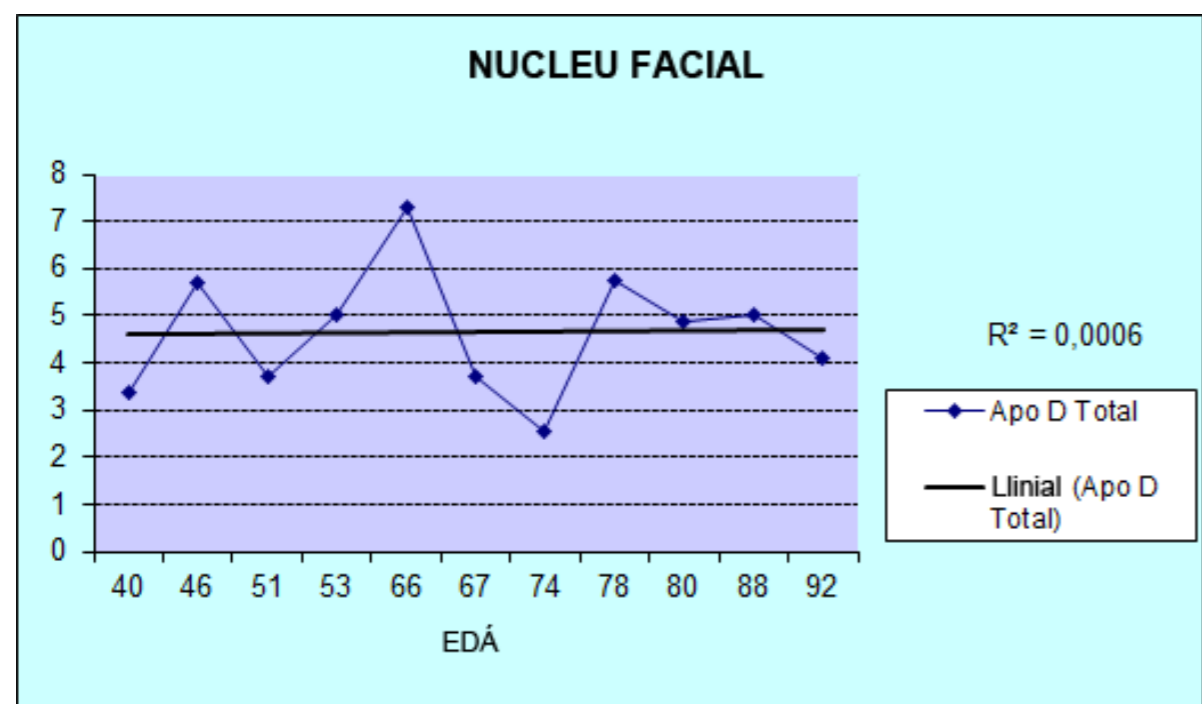
Gráfica que recueye la expresión d'Apo D, nel Nucleu Facial, en relación cola edá. Como se puede ver esta expresión ye alta y constante a lo llargo de les distintes edaes.

Nos extractos de sustancia gris puede observarse una clara tendencia al aumentu d'Apo D relacionáu col avieyamientu, ocurriendo lo mesmo coles amueses correspondientes a la sustancia blanco. Finalmente, cuando comparamos les bandes de sustancia gris y sustancia blanco del mesmu individu u vese la presencia d'una mayor cantidá d'Apo D na sustancia blanco. Esta característica caltiénse a lo llargo del avieyamientu en tolos casos estudiaos (Navarro et al., 2010; Juárez, 2003).

Pa realizar un análisis más precisu de la cantidá d'Apo D presente nos extractos cerebrales fixéronse «Slot Blots» d'estos. L'análisis densitométricu confirmó dafechu les apreciaciones suxetives tenies a partir de los «Western Blots». Esti análisis amuesa la existencia d'un incrementu progresivu, edá-dependiente, na cantidá d'Apo D, tanto nes amueses de sustancia gris como nes amueses de sustancia blanco. D'igual miente, obsérvase claramente que la cantidá de proteína ye siempre mayor, y a cualquier edá, na sustancia blanco que no gris (Navarro et al., 2010; Juárez, 2003).

Pa estudiar la expresión de l'Apo D fíxose un análisis cromoxénicu, per mediu d'hibridación *in situ*, del allugamientu nel córtex frontal del ARNm pa l'Apo D. Nos individuos mozos la señal apaec restrinxida mayoritariamente a la sustancia blanco, apaeciendo namás una señal mui feble na sustancia gris. Col avieyamientu la señal de la sustancia blanco intensifícase notablemente y allúgase, como nos mozos, principalmente nos oligodendrocitos. Na sustancia gris tamién s'observa un incrementu d'expresión relacionáu cola edá. Nesta zona asítiase la expresión non solo nos oligos sinón tamién n'astrocitos y neuronas principalmente. Tamién entama a detectase la expresión d'Apo D n'otros tipos celulares como les células de microglía y los pericitos. Les primeres neuronas qu'espresen Apo D son les piramidales y posteriormente tamién s'afaya esta expresión nes granulares. Les características morfolóxicas d'estes neuronas indiquen que se trata de células dafechamente funcionales, magar que nesti casu y por mor del tipu de técnica utilizáu, los elementos citoplasmáticos permanecen amazcaraos pol marcaxe. El númberu de neuronas con capacidá d'espresar Apo D xorrez notablemente cola edá del individu u (Navarro et al., 2010; Juárez, 2003).

Pa cuantificar la expresión d'Apo D fixéronse «Slot Blots» de los extractos d'ARN y sobre ellos se realizó una técnica d'hibridación. El resultáu de los análisis densitométricos de los «Slots» amosó un incrementu gradual y significativu de los niveles d'ARNm p'Apo D, tanto na sustancia blanco como no gris. Los mayores niveles d'ARNm siempre se detectaron na sustancia blanco respeuto a la sustancia gris. Como se puede observar, estos resultados dicen colos



llograos al medir la cantidad de proteína presente nos extractos cerebrales, obteniendo cuando se comparen los valores una correlación clara ente la cantidad d'Apo D y la expresión d'esta (Navarro et al., 2010; Juárez, 2003).

### 2.2.- Expresión constante de l'Apo D en relación cola edá (Protuberancia y Bulbu raquideu)

Pa confirmar la observación aparente de la existencia d'un comportamientu estremáu, al respetive de la expresión d'Apo D, per parte de les neuronas de sistemas más modernos filoxenéticamente falando, y más vieyos, plantegámonos l'estudiu y la comparanza detallada d'un modelu de cada sistema. Como modelu más evolucionáu utilizamos los datos, yá descritos, obteníos nel córtex cerebral y como modelu más vieyu plantegamos l'estudiu de diferentes zonas del bulbu raquideu humanu. Esta rexón estudiárase primero per parte del nuesu grupu con bastante detalle, tanto nel adultu mozu como nel avieyamientu, nel home y otros mamíferos (Alvarez et al., 2000; Fernández et al., 2007; Suárez et al., 1993, 1997).

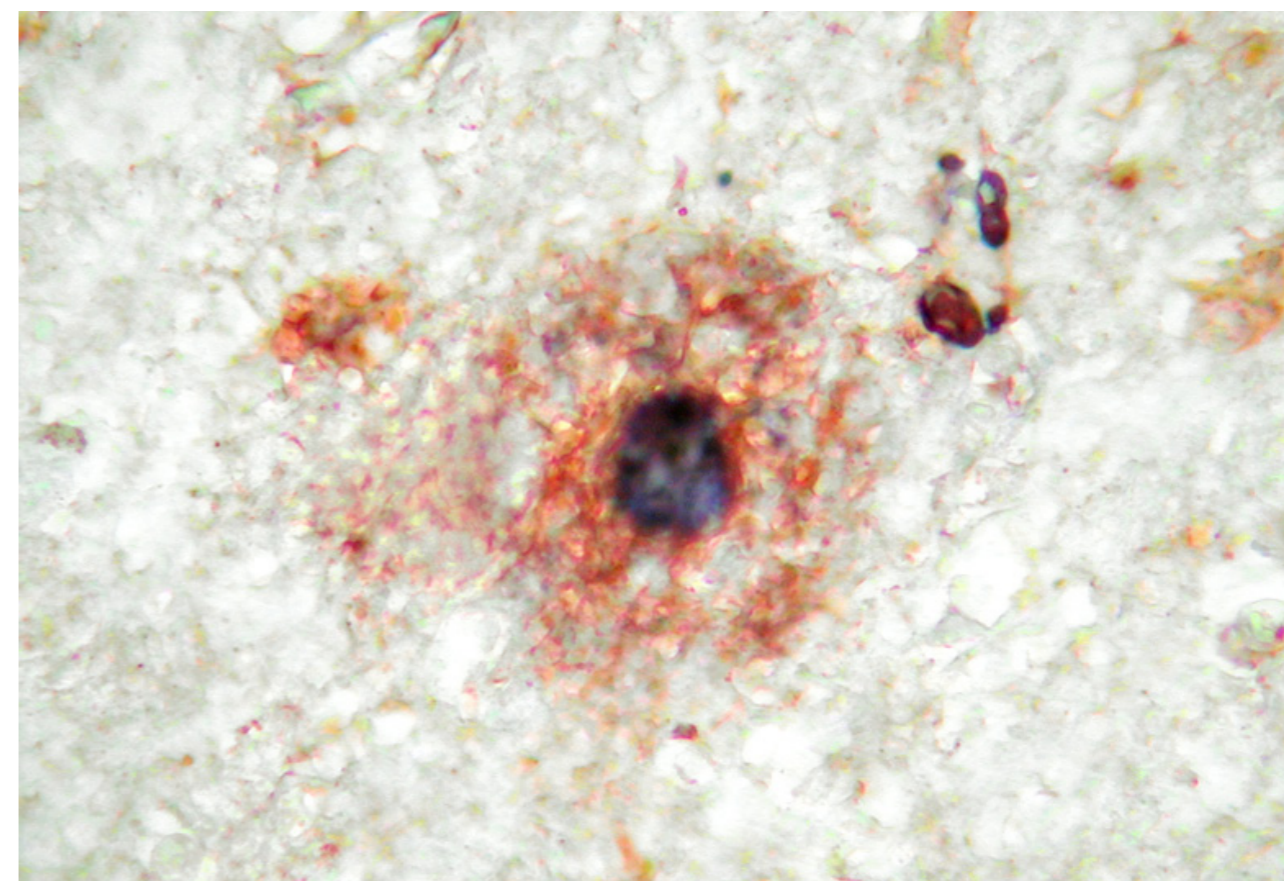
L'estudiu fíxose sobre diversos núcleos motores (nucleu, hipoglosu, nucleu oculomotor, nucleu facial, nucleu del tractu solitariu, nucleu dorsal motor del vagu y sensitivos (nucleu de la oliva inferior y núcleos vestibulares)) de la médula oblongata, obteniéndose unos resultaos que contrastaben colos atopaos nel córtex cerebral y otros centros nerviosos superiores. Los distintos núcleos estudiaos amosaron una alta inmunopositividá pa l'Apo D dende les edaes más nueves estudiaes (Méndez, 2009; Navarro et al. 2013b). Esta inmunopositividá p'Apo D

nun s'allugaba namás nel parénquima nerviosu de los núcleos o nel componente de sustancia blanco, sinón qu'había una clara expresión d'Apo D na mayor parte de los elementos neuronales. Al facer l'estudiu d'esta rexón nel avieyamientu la impresión suxetiva sofító la idea de que la expresión d'Apo D, a nivel neuronal, se caltenía y abultaba ser bastante constante nel tiempu. Cuando fiximos l'análisis densitométricu de la expresión d'Apo D, los resultaos algamaos confirmaron dafechamente'l fechu de qu'en tolos núcleos, de la médula oblongata, estudiaos se caltenía de forma prácticamente estable nel tiempu la expresión d'Apo D (Méndez, 2009; Navarro et al. 2013b).

Los resultaos algamaos contrasten claramente colu qu'ocurre nel córtex cerebral humanu y n'otres rexones superiores onde la expresión de l'Apo D sufre variaciones importantes a lo largo del envejecimiento, caracterizadas por un incremento progresivo de la misma (Navarro et al., 2010; Juárez, 2003; Valle, 2002).

### 3.- Apolipoproteína D y marcadores anatómopatolóxicos de la EA

Nos estudios previos del grupu, fechos sobre'l patrón d'espresión d'Apo D nel sistema nerviosu humanu (Navarro et al., 1998), observamos que'l marcaxe yera siempre mayor na sustancia blanco que no gris, y dientro d'esto ta en mayor cantidad nes capes más fondes que nes más superficiales. Los tipos celulares que presenten más Apo D nel SNC son los oligodendrocitos y astrocitos de la sustancia blanco y los astrocitos y pericitos na sustancia gris, magar que puede apaecer en dalgunes neuronas disperses. Per otra parte, resultó llamadera la presencia d'Apo D nos individuos



#### ARRIBA

Expresión d'Apo D (coloráu) y Apo E (azul) nuna placa amiloidea. Hai que destacar que nel corazón d'amiloide hai una alta expresión p'Apo E y que la expresión d'Apo D remite a la periferia de la placa.

d'edá avanzada en relación coles plaques seniles.

Esta observación llevónos a plantegar la realización d'un estudiu inmunohistoquímicu p'Apo D sobre amueses de texíu cerebral de pacientes diagnósticaos d'EA, con unos resultaos que fixeron posible que fóremos el primer grupu nel mundu en describir la presencia d'Apo D en tolos tipos de plaques seniles, tanto difuses como maduras (Navarro et al., 2001).

El marcaxe ye llixeru y homogéneamente distribuyíu per tola placa nes PSD. Nes PSM allúga-

se mayormente alrededor del corazón d'amiloide. Per otra parte, atópense un mayor número de PSM con marcaxe d'Apo D que PSD. De fechu, la presencia d'Apo D en PSD nun foi atopada por otros autores n'análisis inmunohistoquímicos de cerebros de pacientes d'EA (Kalman et al., 2000; Desai et al., 2005). Sicasí, tanto nel presente estudiu como n'otros estudios previos fechos pol nuesu grupu d'investigación, demostróse claramente la presencia d'esta proteína n'entrambos tipos de plaques (Navarro et al. 2001, 2003).



Les diferencies nos resultaos pueden esplicase poles diferencies d'especificidá de los anticuerpos usaos. L'ausencia de colocalización d'Apo D y amiloide nes PSM ye un fechu que se repite nel casu de l'Apo D y l'amiloide vascular. Los vasos pueden presentar marcaxe p'Apo D pero siempre en zones llibres de  $\beta$ A (Navarro et al., 2001).

Pa cabu, los ONF nun presentaben nunca marcaxe d'Apo D, nin cuando taben intracelulares ni cuando quedaben de forma estracelular a la muerte de la neurona.

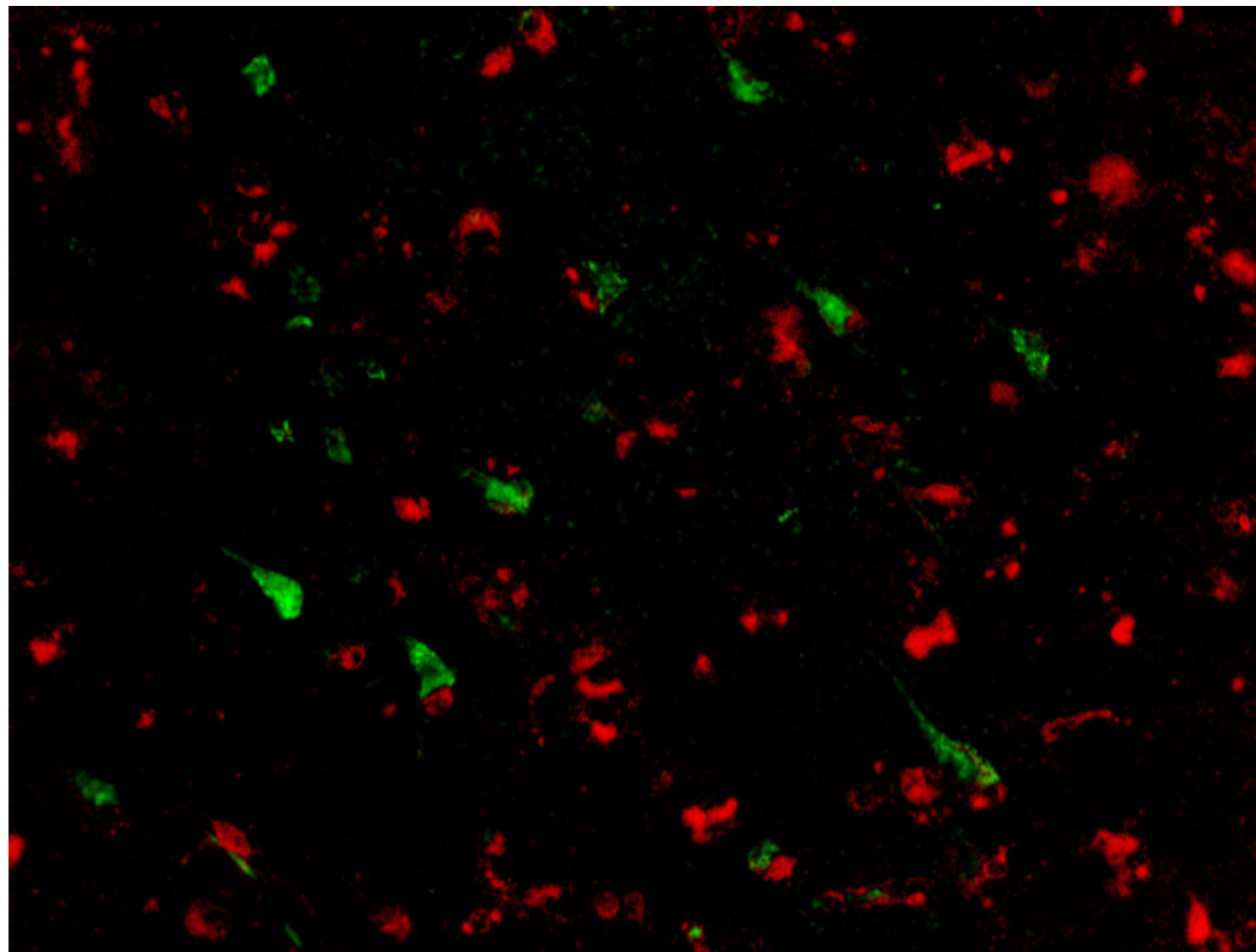
### 3.1.- Rellación de l'Apo D y l'Apo E na EA

La rellación ente Apo E y la EA y sobre manera colos depósitos d'amiloide foi ampliamente recoyida por otros investigadores, presentándola como una proteína rellacionada cola fibriloxénesis y la formación de los depósitos de  $\beta$ A nes plaques seniles, como remanez de dellos estudios esperimentales.

Yá que tanto Apo D como Apo E se presenten nes plaques seniles, fiximos un estudiu de la rellación ente entrambes proteínas pa inferir sobre'l papel de l'Apo D na EA. Pa ello plantegámonos un estudiu de doble marcaxe IHQ combináu cola coloración histoquímica del Bermeyu d'El Congu (Navarro et al., 1999, 2013a) pa poner de manifiestu la presencia d'acúmulos d'amiloide nel parénquima cerebral y los vasos sanguíneos.

Los resultaos d'esti estudiu demostraron qu'entrambes apolipoproteínes allugábenos dos tipos de PS; l'Apo D de forma más fuerte y estensa nes neurites y alrededor del amiloide y l'Apo E más fuertemente sobre'l corazón d'amiloide y más débilmente nes neurites distrófiques (Navarro et al., 2003).

Nel casu de los vasos con congopatía amiloidea siguiase un patrón equivalente



#### ARRIBA

Micrografía na que s'observa la espresión d'Apo D (coloráu) y un marcador de muerte neuronal [Fluor Jade] (verde). Puede observase l'ausencia d'espresión p'Apo D nes neuronas en procesu de muerte (ausencia de colocalización).

d'allugamientu, amosándose un marcaxe cada vegada más positivu d'Apo E cuanto mayor yera'l depósite d'amiloide pero, pelo contrario, menor marcaxe d'Apo D (Navarro et al., 2003).

Con toos estos datos, concluyimos que l'Apo D y l'Apo E debíen xugar papeles mui estremaos na patoxénesis del depósite d'amiloide. La diferencia d'allugamientu de les apolipoproteínes podría tar en rellación cola presencia de diferentes isoformes de  $\beta$ A ( $\beta$ A-40 y  $\beta$ A-42)

que como se sabe camuden ente les diferentes lesiones, tienen diferencies na so capacidá de formar fibrines y presenten diferents efeutos tóxicos en neuronas y célules vasculares. L'Apo D preséntase naquelles mancadures onde predomina la isoforma  $\beta$ A 42 como les plaques seniles y nun apaez onde abonda la isoforma  $\beta$ A 40, ello ye, nos depósitos vasculares (Yamada, 2000). La presencia d'Apo E en tolos depósitos d'amiloide y d'Apo D namás nes plaques, onde se'alcuentra la isoforma más patoxénicamente activa, suxer que'l papel de l'Apo D sedría opuestu al de l'Apo E na fibriloxénesis y deposición d'amiloide o tamién podría tratase d'una respuesta celular adautativa al dañu causáu pol  $\beta$ A.

### 3.2.- Espresión d'Apo D en rellación col estadiu de Braak

N'afitándose per parte del nuestro grupu la espresión área dependiente de l'Apo D nel avieyamientu, decidimos facer un estudiu de la espresión d'esta en rellación colos diferentes estadios de la EA teniendo en cuenta tamién el sexu del paciente, yá que como comentamos anteriormente na rexón promotora del xen de l'Apo D hai elementos reguladores pa estrógenos.

Pa ello fiximos un marcaxe inmunohistoquímicu p'Apo D y una cuantificación densitométrica (Tolivia et al., 2006) d'esti marcaxe a lo llargo de los diferentes estadios de Braak en cortes d'hipocampu, corteza entorrinal y corteza frontal.

Los resultaos del estudiu amuesen un incrementu de la espresión d'Apo D a lo llargo de la progresión de la enfermedá, pero ensin haber diferencies significatives entre homes y mueres (Ordoñez et al., 2012).

### 3.3.- Apolipoproteína D en modelos de neurodexeneración in vitro

Darréu que la espresión d'Apo D correllaciona bien col estadiu de la EA sobre manera n'árees como l'hipocampu, entrugámonos cuánta podría ser la causa d'esta sobreexpresión. Pa ello fiximos un tratamientu con un fragmentu tóxicu de  $\beta$ A, el  $\beta$ A (25-35), sobre un cultivu de células hipocampales HT22. Observamos, que'l tratamientu produz una mengua de la viabilidad celular independiente de la dosis de  $\beta$ A utilizada (Martínez et al., 2012). Esto yera por cuenta de que'l  $\beta$ A producía una disminución de la proliferación celular más qu'un fenómenu de muerte celular, como yá indicaren años atrás Gillardon et al. (1996) en otras poblaciones de células.

En cuantes a la espresión d'Apo D, resulta interesante qu'atopemos un incrementu na concentración celular d'esta colos tratamientos. Estos datos dexáronnos suxerir la existencia d'una rellación ente la inhibición de la medría celular por  $\beta$ A y la espresión d'Apo D, nesti modelu de citotoxicidá celular (Martínez et al., 2012). Yá se describieren fenómenos asemeyaos anteriormente (Do Carmo et al., 2002; Provost et al., 1991a). Amás, les nuses afayadures son consistentes cola hipótesis de que'l  $\beta$ A más qu'un causante de la neurodexeneración na EA ye o bien un desencadenante o bien un socesu secundariu d'otres situaciones patoxéniques, como l'estrés oxidativu (Zhu et al. 2007).

En rellación con esto, demostróse que na rexón promotora del xen de l'Apo D hai elementos reguladores amás de pa estróxenos, pa sueru o estrés oxidativu polo que los niveles elevaos d'Apo D n'EA podríen ser resultancia del dañu oxidativu produciu por  $\beta$ A.

Pa probar la nuesa hipótesis xeneramos otu modelu celular, nesti casu d'estrés oxidativu, per aciu del tratamientu de les células HT22 con  $H_2O_2$ , una especie reactiva d'oxíxenu utilizao ampliamente nesta mena d'ensayos. Les concentraciones crecientes d' $H_2O_2$ , nesti casu, produxeron un descensu de la viabilidad celular y aumentu de la peroxidación lipídica y la muerte celular, too ello dosis dependiente.

Los resultaos d'estos trabayos amosaron tamién que l' $H_2O_2$  induz la muerte por apoptosis de les células HT22 de forma dependiente de la concentración. Les pruebas con Anexina V/PI y la microscopía electrónica confirmaron estos resultaos. Ye más, fuimos a demostrar que la vía apoptótica que s'activa ye la clásica; observóse un incrementu de los niveles de caspasa 3 y una mengua del ratiu de proteínes anti/proapoptótiques Bcl-2/Bax. Pa cabu, los niveles de 4-HNE (productu de la peroxidación lipídica) taben incrementaos nes células llueu del tratamientu como tamién vimos qu'asocedía nes amueses de cerebru humanu avieyáu y con EA.

Con esti modelu tamién fuimos a demostrar que la espresión d'Apo D nes células HT22 non solo s'incrementaba cola concentración del estresante, sinón que la so distribución subcelular sufría cambeos, pasando d'un allugamientu perinuclear a espardece pel restu del citoplasma y les eepansiones celulares. Estos fechos concuerden con resultaos previos descritos por otros autores pa otros tipos celulares como astrocitos y fibroblastos (Patel et al., 1995; Do Carmo et al. 2002).

L'incrementu d'Apo D podría ser una respuesta proteutora y antioxidante pa combatir la peroxidación lipídica y los radicales

*L'incrementu d'Apo D podría ser una respuesta proteutora y antioxidante pa combatir la peroxidación lipídica y los radicales llibres xeneraos nos cultivos. Polo tanto, podríamos asumir qu'esta función neuroproteutora ta incluyida nos mecanismos de defensa contra l'estrés oxidativu qu'ocurre de forma inherente al avieyamientu y a los procesos neurodexenerativos como la EA. Los estudios fechos sobre l'Apo J nel SN y en rellación cola EA dan-y tamién un papel neuroproteutor polo que nos plantegamos un estudiu de la rellación nel allugamientu y la espresión d'entrambes apolipoproteínes, D y J*

llibres xeneraos nel cultivu. Polo tanto, podríamos asumir qu'esta función neuroproteutora ta incluyida nos mecanismos de defensa contra l'estrés oxidativu qu'ocurre de forma inherente al avieyamientu y a los procesos neurodexenerativos como la EA.

### 3.4.- Apo D y Apo J na EA

Los estudios fechos sobre l'Apo J nel SN y en rellación cola EA dan-y tamién un papel neuroproteutor polo que nos plantegamos un estudiu de la rellación nel allugamientu y la espresión d'entrambes apolipoproteínes, D y J.

Los estudios de doble marcaxe p'Apo J y Apo D amosaron poca o nenguna colocación nes neurones o nes plaques seniles. En comparanza, el marcaxe p'Apo J nes plaques seniles ye en xeneral más intensu que l'observáu pa l'Apo D. L'Apo D tiende a allugase en células gliales y pericitos y l'Apo J nes neurones, PSD y paredes engrosaes por amiloide de los vasos. Nes PSM observóse marcaxe p'Apo J nel corazón de la placa mentanto que de nuevo, l'Apo D namás apaecía en la periferia qu'arrodia al corazón y nes proyeiciones de los astrocitos que les arrodien (Valle del et al., 2016).

Esto podría significar qu'entrambes dos son proteínes proteutores qu'incrementen la

so espresión na EA como una respuesta celular adautativa al dañu de diferentes tipos celulares: la sobreexpresión de l'Apo D sedría por mor de la reaición de les células de glía y la d'Apo J a la de les neurones. Nesti sen, la capacidá de l'Apo J p'amestar y secuestrar oligómeros tóxicos y mal plegaos formaos na agregación y disgregación de fibrines de  $\beta$ A 40 foi espublizada por dellos autores (Yerbury et al., 2007; Narayan et al., 2012). Ye más, l'Apo J podría tamién prevenir la formación de fibrines de  $\beta$ A promoviendo'l so tresporte al traviés de la barrera hematoencefálica (Wu et al., 2012).

Nesti sen, cuntáronse les PSM y PSD marcaes con cada apolipoproteína y rellacionáronse col grau de progresión de la EA. Les PSD presentaben un marcaxe creciente y asemeyáu pa entrambes apolipoproteínes que se correllacionaba de xeitu positivu col grau de Braak. Sicasí, nel casu de la cuantificación de les PSM la correllación yera mayor nel casu de l'Apo D. La cantidá de PSM Apo J positives yera enforma mayor nos primeros estadios de la enfermedá, resultando ser un r marcador meyor de los inicios de la enfermedá (Valle del et al., 2016).

## CONCLUSIONES

Les conclusiones algamaes, referíes al SNC humanu y les neuropatoloxíes estudiaes, resúmense nos puntos que vienen darréu:

- a. Hai espresión d'Apo D nes estremaes zones y rexones del SNC.
- b. La espresión y acúmulu d'Apo D faise per aci de diferentes tipos celulares: células gliales, elementos perivascuales, piales y subpiales, y neuronas.
- c. Hai una espresión diferencial d'Apo D per parte de los estremaos tipos celulares.
- d. La espresión d'Apo D nel SNC amuesa diferencies rexón-dependientes.
- e. La espresión d'Apo D ye siempre superior na sustancia blanca, que no gris, en toles rexones y edaes estudiaes.
- f. Nos centros nerviosos filoxenéticamente más de recién, hai una espresión d'Apo D edá dependiente y progresiva en tiempu.
- g. Nos centros nerviosos filoxenéticamente más antiguos, hai una espresión d'Apo D constante cola edá, non progresiva en tiempu.
- h. L'Apo D espresase nes plaques seniles, tanto difuses como madures, asina como na parede de los vasos congófilos ensin colocalización colos depósitos amiloideos.
- i. L'Apo D nun s'espresa, normalmente, nes neuronas con lluviellos neurofibrilares.
- j. L'Apo D presenta un papel antagonista al de l'Apo E nel desendolcu de la enfermedá d'Alzheimer.
- k. La espresión d'Apo D aumenta, tanto n'homes como en muyeres, a lo llargo de los diferentes estadios de Braak.
- l. L'efectu neurotóxicu de los fragmentos de Beta-Amiloide, sobre cultivos de neuronas hipocampales, provoca una sobreespresión d'Apo D.
- m. La inducción esperimental d'estrés oxidativu sobre neuronas hipocampales, provoca una sobreespresión d'Apo D, peroxidación lipídica y pa cabu muerte por apoptosis.
- n. L'Apo D, al igual que l'Apo J, ye un bon marcador del progresu de la EA. L'Apo D na glía y l'Apo J nes neuronas exerceríen funciones adautatives y complementaries como proteínes neuroprotectores.

## Referencies bibliográfiques

- Álvarez, J.C., Díaz, C., Suárez, C., Fernández, J.A., González del Rey, C., Navarro, A., Tolivia, J. (2000). Aging and the human vestibular nuclei: morphometric analysis. *Mech. Ageing Dev.* 114, 149-172.
- Bishop, R.E. (2000) The bacterial lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2), 73-83.
- Blais, Y., Sugimoto, K., Carriere, M.C., Haagenzen, D.E., Labrie, F., Simard, J. (1994) Potent stimulatory effect of interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 59(3), 400-7.
- Boyles, J.K., Notterpek, L.M., Anderson, L.J. (1990a) Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 265(29), 17805-15.
- Boyles, J.K., Notterpek, L.M., Wardell, M.R., Rall, S.C. (1990b). Identification, characterization and tissue distribution of apolipoprotein D in rat, *J. Lipid Res.*, 31, 2057-2065.
- Braak H, Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16:271-278.
- Camato, R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Lussier-Cacan, S., Weech, P.K. (1989) Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J Lipid Res* 30(6), 865-75.
- Carter JC (2007) Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochem Int* 50(1):12-38.
- Cofer, S. y Ross, S.R. (1996) The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene* 171(2), 261-3.
- Desai PP, Ikonovic MD, Abrahamson EE, Hamilton RL, Isanski BA, Hope CE, Klunk WE, DeKosky ST, Kamboh MI (2005) Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiol Dis* 20(2):574-82.
- Diez-Itza, I., Vizoso, F., Merino, A.M., Sanchez, L.M., Tolivia, J., Fernández, J., Rubial, A., Lopez-Otin, C. (1994) Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol* 144:310-320.
- Do Carmo S, Séguin D, Milne R, Rassart E (2002) Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem.* 277(7):5514-23.

Drayna, D.T., McLean, J.W., Wion, K.L., Trent, J.M., Drabkin, H.A., Lawn, R.M. (1987) Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily. *DNA* 6(3), 199-204.

Fernández, J., Suárez, C., Navarro, A., Díaz, C., Alvarez, J., González del Rey, C., Tolivia, J. (2007) Aging in the vestibular nuclear complex of the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*): anatomic and morphometric study. *Histol Histopathol* 22: 855-868.

Gillardot F, Skutella T, Uhlmann E, Holsboer F, Zimmermann M, Behl C. (1996) Activation of c-Fos contributes to amyloid beta-peptide-induced neurotoxicity. *Brain Res* 706(1):169-72.

Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12: 383-388.

Juárez, A. (2003) Presencia y expresión de la Apolipoproteína D en el Sistema Nervioso Central Humano a lo largo del envejecimiento. Tesis Doctoral, Universidad d'Uviéu.

Kalman J, McConathy W, Araoz C, Kasa P, Lacko AG. (2000). Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol Res* 22: 330-6.

Lambert, J., Provost, P.R., Marcel, Y.L., Rassart, E. (1993) Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim Biophys Acta* 1172(1-2), 190-2.

Lopez-Boado, Y.S., Tolivia, J., Lopez-Otin, C. (1994) Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269:26871-26878.

Martínez E, Navarro A, Ordóñez C, Del Valle E, Tolivia J. (2012). Amyloid-25-35 induces apolipoprotein D Synthesis and growth arrest in HT22 hippocampal cells. *J Alzheimers Dis* 30(2):233-44.

McConathy, W.J., Alaupovic, P. (1973) Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett* 37(2), 178-82.

Méndez, E. (2009) Expresión de la Apolipoproteína D en el tronco del encéfalo humano durante el envejecimiento. Tesis Doctoral, Universidad d'Uviéu.

Narayan P, Meehan S, Carver JA, Wilson MR, Dobson CM, Klenerman D. (2012) Amyloid- $\beta$  oligomers are sequestered by both intracellular and extracellular chaperones. *Biochemistry*. 51(46): 9270-6.

Navarro A, Tolivia J, Astudillo A, Del Valle E (1998) Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neurosci Lett* 254:17-20.

Navarro A, Tolivia J, del Valle E. (1999). Congo Red method for demonstrating amyloid in paraffin sections. *J Histotech* 22: 305-08.

Navarro A, del Valle E, Astudillo A, Gonzalez del Rey C, Tolivia J. (2001) Immunohistochemical presence of apolipoprotein D in senile plaques. *J Histotech* 24 (1): 45-48.

Navarro A, del Valle E, Astudillo A, González del Rey C, Tolivia J. (2003) Immunohistochemical study of distribution of apolipoproteins E and D in human cerebral beta amyloid deposits. *Exp Neurol* 184(2):697-704.

Navarro A, Del Valle E, Tolivia J (2004) Differential expression of apolipoprotein D in human astroglial and oligodendroglial cells. *J Histochem Cytochem* 52:1031-1036.

Navarro A, Del Valle E, Juárez A, Martínez E, Ordóñez C, Astudillo A, Tolivia J (2010) Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *Age* 32:85-96.

Navarro A, del Valle E, Martínez E, Ordóñez C, Pérez C, Tolivia J. (2013a) Highly selective and fast diagnosis of Alzheimer's disease hallmark lesions using Congo Red in isopropyl alcoholic solution. *J Alzheimers Dis*. 35(3):589-97.

Navarro A, Méndez E, Diaz C, del Valle E, Martínez-Pinilla E, Ordóñez C, Tolivia J. (2013b). Lifelong expression of apolipoprotein D in the human brainstem: correlation with reduced age-related neurodegeneration. *PLoS One*. 8(10): e77852.

Ordóñez C, Navarro A, Pérez C, Astudillo A, Martínez E, Tolivia J (2006) Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol Histopathol* 21:361-366.

Ordóñez C, Navarro A, Pérez C, Martínez E, del Valle E, Tolivia J. (2012). Gender differences in apolipoprotein D expression during aging and in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 33(2): 433.e11-20.

Patel, S.C., Asotra, K., Patel, Y.C., McConathy, W.J., Patel, R.C. y Suresh, S. (1995) Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuroreport* 6(4), 653-7.

Provost, P.R., Weech, P.K., Tremblay, N.M., Marcel, Y.L., Rassart, E. (1990). Molecular characterization and differential mRNA distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipid Res.*, 31 2057-2065.

Provost, P.R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Weech, P.K. y Rassart, E. (1991a) Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett* 290(1-2), 139-41.

Provost, P.R., Villeneuve, L., Weech, P.K., Milne, R.W., Marcel, Y.L., Rassart, E. (1991b) Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J Lipid Res* 32(12), 1959-70.

Provost, P.R., Tremblay, Y., el-Amine, M., Belanger, A. (1995) Guinea pig apolipoprotein D RNA diversity, and developmental and gestational modulation of mRNA levels. *Mol Cell Endocrinol* 109(2), 225-36.

Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L., Milne, R. (2000) Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2), 185-98.

Sánchez, D., Ganfornina, M.D., Bastiani, M.J. (2000a) Lazarillo, a neuronal lipocalin in grasshoppers with a role in axon guidance. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2), 102-9.

Sánchez, D., Ganfornina, M.D., Torres-Schumann, S., Speese, S.D., Lora, J.M., Bastiani, M.J. (2000b) Characterization of two novel lipocalins expressed in the Drosophila embryonic nervous system. *Int J Dev Biol* 44(4), 349-59.

Seguin, D., Desforges, M., Rassart, E. (1995) Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res Mol Brain Res* 30(2), 242-50.

Simard, J., Veilleux, R., de Launoit, Y., Haagensen, D.E., Labrie, F. (1991) Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 51(16), 4336-41.

Smith, K.M., Lawn, R.M., Wilcox, J.N. (1990) Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin: cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J Lipid Res* 31(6), 995-1004.

Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Olek, K., Muller, H.W. (1990) Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblast of peripheral nerve, *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, 9(8), 2479– 2484.

Suárez, C., González del Rey, C., Tolivia, J., Díaz, C., Navarro, A., Llorente, J.L., Gómez, J., (1993) Morphometric analysis of the vestibular complex in the rat. *Laryngoscope* 103, 762–773.

Suárez, C., Díaz, C., Tolivia, J., Alvarez, J.C., González del Rey, C., Navarro, A., (1997) Morphometric analysis of the human vestibular nuclei. *Anat. Rec.* 247, 271–288.

Tolivia J., Navarro A., del Valle E., Pérez C., Ordóñez C., Martínez E. (2006) Application of Photoshop and Scion Image analysis to quantification of signals in histochemistry, immunocytochemistry and hybridocytochemistry. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 28:43-53.

Valle del E., Navarro A., Méndez E., Juárez A., Astudillo A., Tolivia J. (2001). Could apolipoprotein D be a neuronal marker of necrobiosis?. *J. Histotech.* 24, 29-35.

Valle del, E. (2002) Localización de la Apolipoproteína D en el Sistema Nervioso Central Humano a lo largo del envejecimiento. Tesis Doctoral, Universidad d'Uviéu.

Valle del E, Navarro A, Martinez-Pinilla E, Torices S, Tolivia J. (2016). Apo J and Apo D: Complementary or Antagonistic Roles in Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis* May 17.

Wu ZC, Yu JT, Li Y, Tan L. (2012) Clusterin in Alzheimer's disease. *Adv Clin Chem* 56:155-73.

Yamada M. *Neuropathology.* 2000 Mar; 20(1): 8-22. doi: 10.1046/j.1440-1789.2000.00268.x.PMID: 10935432 Review

Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, Wilson MR. (2007) The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J* 21(10):2312-22.

Zhang, S.X., Bentel, J.M., Ricciardelli, C., Horsfall, D.J., Haagensen, D.E., Marshall, V.R. y Tilley, W.D. (1998) Immunolocalization of apolipoprotein D, androgen receptor and prostate specific antigen in early stage prostate cancers. *J Urol* 159(2), 548-54.

Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. (2007) Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta* 1772(4):494-502.