



Universidad de Oviedo

Estudio del papel de la Apolipoproteína D en la neurodegeneración
y desmielinización en modelos experimentales de Esclerosis Múltiple
inducida por cuprizona

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud

Nuria Rubio Sardón

2024



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma:	Inglés:
Estudio del papel de la Apolipoproteína D en la neurodegeneración y desmielinización en modelos experimentales de Esclerosis Múltiple inducida por cuprizona	Study of the role of Apolipoprotein D in Neurodegeneration and Demyelination in Cuprizone-Induced Experimental Models of Multiple Sclerosis
2.- Autor	
Nombre: Nuria Rubio Sardón	
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

La Apolipoproteína D (Apo D) es una lipocalina multifuncional, capaz de unir y transportar gran variedad de pequeñas moléculas hidrofóbicas, para la cual se ha descrito una función antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora. En el sistema nervioso central, la Apo D se ve incrementada durante el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Múltiple (EM), sin embargo, poco se sabe de sus mecanismos de acción en esta patología. En esta Tesis Doctoral decidimos estudiar el papel de la Apo D en la neurodegeneración y desmielinización en un modelo celular de EM inducida por cuprizona (CPZ), así como en su versión murina. Para ello, se procedió a la puesta a punto de un modelo in vitro de citotoxicidad reversible en las líneas celulares SH-SY5Y y HOG, su co-cultivo, y cultivos primarios neuronales, a los que se les trató con CPZ durante 24-48h, seguidas o no de un periodo de recuperación sin el tóxico. En el caso del modelo in vivo, ratones de la cepa C57BL/6 fueron alimentados con 0,25% (p/p) de CPZ durante 3 y 6 semanas, seguidas de otras 3 o 6 semanas sin el tóxico en el caso los ensayos de recuperación. El efecto de la CPZ sobre el patrón de expresión de la Apo D se estudió mediante análisis de expresión génica e inmunohistoquímica. La potencialidad neuroprotectora de la Apo D se probó de manera indirecta mediante la inducción de su expresión con el antipsicótico clozapina (CLO), y de manera directa mediante la adición exógena de la Apo D humana purificada al medio de cultivo celular. En conjunto, los resultados obtenidos confirmaron que, tanto el modelo celular como el modelo animal de citotoxicidad reversible, suponen una aproximación adecuada para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la EM, caracterizada por brotes y remisiones, así como para testar el efecto de distintas moléculas con potencialidad terapéutica como la Apo D. En este sentido, nuestros datos demostraron que la CPZ comprometía el metabolismo celular, a nivel mitocondrial, en las líneas de oligodendroglioma y neuroblastoma humano, y provocaba cambios a nivel sistémico y de sistema nervioso en los



ratones que se recuperan tras la suspensión del tratamiento con el tóxico. Sin embargo, el efecto neurotóxico/desmielinizante de la CPZ no fue capaz de inducir la expresión de la Apo D en ambas situaciones. De manera interesante, el aumento de los niveles de esta apolipoproteína, de forma endógena o exógena, previno la pérdida de viabilidad celular y la desmielinización ocasionada por el tratamiento con CPZ, en las líneas celulares y los ratones respectivamente, lo cual abre una nueva vía en el desarrollo de intervenciones terapéuticas para la EM y otras enfermedades desmielinizantes.

RESUMEN (en Inglés)

Apolipoprotein D (Apo D) is a multifunctional lipocalin capable of binding and transporting a variety of small hydrophobic molecules. It has been described to have antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective functions. In the central nervous system, Apo D levels increase during aging and in neurodegenerative diseases such as Multiple Sclerosis (MS). However, little is known about its mechanisms of action in this pathology. In this Doctoral Thesis, we decided to study the role of Apo D in neurodegeneration and demyelination in a cellular model of cuprizone (CPZ)-induced MS, as well as in its murine version. For this purpose, an in vitro model of reversible cytotoxicity was established using SH-SY5Y and HOG cell lines, their co-culture, and primary neuronal cultures. These cultures were treated with CPZ for 24-48 hours, followed or not by a recovery period without the toxin. For the in vivo model, C57BL/6 mice were fed 0.25% (w/w) CPZ for 3 and 6 weeks, followed by another 3 or 6 weeks without the toxin for the recovery assays. The effect of CPZ on the expression pattern of Apo D was analyzed through gene expression analysis and immunohistochemistry. The neuroprotective potential of Apo D was tested indirectly by inducing its expression with the antipsychotic clozapine (CLO), and directly by adding exogenous purified human Apo D to the cell culture medium. Overall, the results obtained confirmed that both the cellular and animal models of reversible cytotoxicity constitute an adequate approach to study the molecular mechanisms underlying the pathophysiology of MS, characterized by relapses and remissions, as well as to test the effect of different molecules with therapeutic potential, such as Apo D. In this regard, our data demonstrated that CPZ compromised cellular metabolism at the mitochondrial level in human oligodendrogloma and neuroblastoma cell lines, and caused systemic and nervous system changes in mice that recovered after cessation of treatment with the toxin. However, the neurotoxic/demyelinating effect of CPZ was not able to induce the expression of Apo D in both situations. Interestingly, the increase in levels of this apolipoprotein, either endogenously or exogenously, prevented the loss of cell viability and demyelination caused by CPZ treatment in the cell lines and mice, respectively, which opens a new avenue in the development of therapeutic interventions for MS and other demyelinating diseases.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____

INDICE DE CONTENIDOS

I.	Abreviaturas.....	i
II.	Caracteres especiales	iv
III.	Resumen.....	v
	INTRODUCCIÓN	1
1	Esclerosis Múltiple.....	2
1.1	Etiología de la Esclerosis Múltiple	4
1.2	Patogénesis de la Esclerosis Múltiple.....	5
1.3	Diagnóstico de la Esclerosis Múltiple	9
1.4	Tratamiento de la Esclerosis Múltiple	10
1.4.1	Tratamiento farmacológico	10
1.4.2	Tratamiento no farmacológico.....	11
2	Modelos de estudio de la Esclerosis Múltiple.....	12
2.1	Modelos animales.....	12
2.2	Modelos celulares	14
3	La Apolipoproteína D.....	15
3.1	La Apolipoproteína D como proteína multiligando y multifunción	16
3.2	Regulación de la expresión de la Apolipoproteína D.....	17
3.3	Localización y expresión de la Apolipoproteína D en el sistema nervioso.....	18
3.4	Papel de la Apolipoproteína D en el sistema nervioso.....	19
3.4.1	La Apolipoproteína D en la modulación de la neurotransmisión.....	19
3.4.2	La Apolipoproteína D en el estrés oxidativo del sistema nervioso.....	20
3.4.3	La Apolipoproteína D en la neuroinflamación.....	21
3.4.4	La Apolipoproteína D en la homeostasis lipídica	22
3.4.5	La Apolipoproteína D en la desmielinización y remielinización	23
3.5	Papel de la Apolipoproteína D en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas	24

OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1 Estudio de la expresión y papel de la Apolipoproteína D en un modelo celular de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	33
1.1 Líneas celulares.....	33
1.2 Co-cultivos celulares.....	33
1.3 Cultivos primarios	34
1.4 Purificación de la Apolipoproteína D humana.....	34
1.5 Tratamientos celulares	36
1.6 Ensayo de tasa de consumo de oxígeno.....	37
1.7 Ensayo de reducción del MTT	38
1.8 Ensayo de mortalidad celular.....	38
1.9 Determinación de especies reactivas de oxígeno	38
1.10 Inmunocitoquímica para la Apolipoproteína D.....	39
1.10.1 Cuantificación de la señal inmunocitoquímica.....	39
1.11 Extracción y purificación de ARN	40
1.12 PCR cuantitativa en tiempo real.....	40
1.13 Análisis de datos.....	41
2 Estudio de la expresión y papel de la Apolipoproteína D en un modelo murino de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	42
2.1 Animales.....	42
2.2 Administración de cuprizona.....	42
2.3 Tratamiento con clozapina	43
2.4 Imagen por Resonancia Magnética.....	43
2.5 Procesamiento de los tejidos y tinción histoquímica	44
2.6 Inmunohistoquímica para la Apolipoproteína D.....	45
2.6.1 Cuantificación de la señal inmunohistoquímica.....	46
2.7 Análisis de datos.....	46

RESULTADOS	47
1 Estudio de la expresión y papel de la Apolipoproteína D en un modelo celular de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	49
1.1 La cuprizona disminuye la viabilidad celular pero no causa la muerte de las células SH-SY5Y y HOG	49
1.2 La pérdida de viabilidad celular causada por la cuprizona en las células SH-SY5Y y HOG es revertida una vez se suspende el tratamiento	51
1.3 La cuprizona disminuye la viabilidad celular pero no induce la muerte en co-cultivos SH-SY5Y/HOG	52
1.4 La pérdida de viabilidad celular causada por la cuprizona en los co-cultivos SH-SY5Y/HOG es revertida una vez suspendido el tratamiento.....	55
1.5 La cuprizona causa una reducción en la tasa de consumo de oxígeno de las neuronas y las células de glía	56
1.6 Análisis de la expresión de la Apolipoproteína D en células SH-SY5Y y HOG en respuesta al tratamiento con cuprizona	58
1.7 La clozapina previene la pérdida de viabilidad celular en los modelos celulares de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	60
1.8 Las dosis neuroprotectoras de clozapina aumentan la expresión de la Apolipoproteína D en los modelos celulares de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	62
1.9 La Apolipoproteína D, añadida de manera exógena, es capaz de incrementar la viabilidad celular y revertir el efecto citotóxico de la cuprizona tras ser internalizada mediante un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina.....	66
1.10 El efecto neuroprotector de la Apolipoproteína D humana no está relacionado con una disminución de los niveles de estrés oxidativo inducidos por la cuprizona.....	69
2 Estudio de la expresión y papel de la Apolipoproteína D en un modelo murino de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	70
2.1 La administración de cuprizona causa cambios a nivel sistémico y conductual que se revierten tras la suspensión del tratamiento.....	70
2.2 La administración de cuprizona induce desmielinización y otras alteraciones cerebrales que se revierten tras la suspensión del tratamiento.....	72
2.3 La administración de cuprizona induce una disminución en la expresión de la Apolipoproteína D a nivel del cuerpo calloso que se revierte tras la suspensión del tratamiento.....	77
2.4 La clozapina no ejerce ningún efecto sobre la pérdida de mielina causada por el tratamiento con cuprizona a nivel del cuerpo calloso	80
2.5 La clozapina contrarresta la disminución de la expresión de la Apolipoproteína D causada por el tratamiento con cuprizona a nivel del cuerpo calloso	82

DISCUSIÓN.....	85
1 Desarrollo y puesta a punto de un modelo celular reversible de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona.....	87
2 Estudio de la expresión y papel de la Apolipoproteína D en un modelo celular de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	91
3 Puesta a punto de un modelo murino de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	96
4 Estudio de la expresión y papel de la Apolipoproteína D en un modelo murino de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona	102
CONCLUSIONES.....	107
ANEXOS.....	111
BIBLIOGRAFÍA	115
PUBLICACIONES.....	151

I. ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADNc	ADN complementario
Apo D	Apolipoproteína D
ARNm	ARN mensajero
ATP	<i>Adenosin triphosphate</i> /Adenosín Trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> /Albúmina Sérica Bovina
CIS	<i>Clinical isolated syndrome</i> /Síndrome Clínicamente Aislado
CLO	Clozapina
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígenos
CPZ	Cuprizona
DAB	Diaminobencidina
DO	Densidad óptica
DCF	Diclorofluoresceína
DIS	<i>Dissemination in space</i> /Diseminación en el espacio
DIT	<i>Dissemination in time</i> /Diseminación en el tiempo
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> / Medio Eagle modificado de <i>Dulbecco</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
EM	Esclerosis Múltiple
EMA	<i>European Medicines Agency</i> /Agencia Europea del Medicamento
EMEM	<i>Eagle's minimum essential Medium</i> / Medio esencial mínimo de <i>Eagle</i>
EMPP	Esclerosis Múltiple primaria progresiva
EMRR	Esclerosis Múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis Múltiple secundaria progresiva

ABREVIATURAS Y CARACTERES ESPECIALES

EP	Enfermedad de Parkinson
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> /Suero fetal bovino
FDA	<i>Food & Drug Administration</i> /Administración de Alimentos y Medicamentos
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> /Estudios de asociación de genoma completo
H2DCFDA	Diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
hApo D	Apolipoproteína D humana
HDL	<i>High density lipoprotein</i> /Lipoproteínas de alta densidad
HLA	<i>Human leukocyte antigens</i> /Antígenos leucocitarios humanos
4-HNE	4-hidroxinonenal
hrApo D	Apolipoproteína D humana recombinante
IFN	Interferón
IL	Interleucina
<i>Immunogold-EM</i>	Microscopía electrónica de inmunomarcaje
KO	<i>Knock out</i>
LCR	Líquido ceforraquídeo
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> /Lipoproteínas de baja densidad
LFB	<i>Luxol Fast Blue</i>
MDA	Malondialdehído
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoproteins</i> /Glicoproteínas asociadas a la mielina
MPM	Metaloproteasa de matriz
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OCR	<i>Oxygen consumption rate</i> /Tasa de consumo de oxígeno

OLGs	Oligodendrocitos
OPCs	<i>Oligodendrocyte precursor cells</i> /Células precursoras de oligodendrocitos
PBM	Proteína básica de la mielina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> /Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PLP	<i>Proteolipid protein</i> /Proteína proteolipídica
PVDF	Polifloruro de vinilideno
qRT-PCR	<i>Quantitative real time-polymerase chain reaction</i> /Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa
REDOX	Reducción y oxidación
RM	Resonancia magnética
ROI	<i>Regions of interest</i> /Regiones de interés
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i> /Dispersión de rayos X de ángulo pequeño
SCTs	Servicios Científico Técnicos
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> / Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> / Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	<i>Standard error of the mean</i> / Error estándar de la media
SOD1	Superóxido dismutasa 1
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TBS-T	<i>Tris buffer saline-Tween 20</i> / Tampón salino con Tris y Tween 20
TNF α	<i>Tumoral necrosis factor α</i> /Factor de necrosis tumoral α
WAT	<i>White adipose tissue</i> /Tejido adiposo blanco

II. CARACTERES ESPECIALES

cm ²	Centímetro cuadrado	mM	Milimolar
G	Fuerza centrífuga relativa	nm	Nanómetro
g	Gramo	nM	Nanomolar
kDa	Kilodalton	p/p	Peso/peso
Kg	Kilogramo	rpm	Revoluciones por minuto
μl	Microlitro	RFU	Unidades Relativas de Fluorescencia
μm	Micrómetro	s	Segundos
μM	Micromolar	u.a.	Unidades arbitrarias de medida
μs	Microsegundo	v/v	Volumen/volumen
mA	Miliamperio	V	Voltio
mg	Miligramo	°C	Grado Celsius
ml	Mililitro		

III. RESUMEN

La Apolipoproteína D (Apo D) es una lipocalina multifuncional, capaz de unir y transportar gran variedad de pequeñas moléculas hidrofóbicas, para la cual se ha descrito una función antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora. En el sistema nervioso central, la Apo D se ve incrementada durante el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Múltiple (EM), sin embargo, poco se sabe de sus mecanismos de acción en esta patología. En esta Tesis Doctoral decidimos estudiar el papel de la Apo D en la neurodegeneración y desmielinización en un modelo celular de EM inducida por cuprizona (CPZ), así como en su versión murina. Para ello, se procedió a la puesta a punto de un modelo in vitro de citotoxicidad reversible en las líneas celulares SH-SY5Y y HOG, su co-cultivo, y cultivos primarios neuronales, a los que se les trató con CPZ durante 24-48h, seguidas o no de un periodo de recuperación sin el tóxico. En el caso del modelo in vivo, ratones de la cepa C57BL/6 fueron alimentados con 0,25% (p/p) de CPZ durante 3 y 6 semanas, seguidas de otras 3 o 6 semanas sin el tóxico en el caso los ensayos de recuperación. El efecto de la CPZ sobre el patrón de expresión de la Apo D se estudió mediante análisis de expresión génica e inmunohistoquímica. La potencialidad neuroprotectora de la Apo D se probó de manera indirecta mediante la inducción de su expresión con el antipsicótico clozapina (CLO), y de manera directa mediante la adición exógena de la Apo D humana purificada al medio de cultivo celular. En conjunto, los resultados obtenidos confirmaron que, tanto el modelo celular como el modelo animal de citotoxicidad reversible, suponen una aproximación adecuada para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la EM, caracterizada por brotes y remisiones, así como para testar el efecto de distintas moléculas con potencialidad terapéutica como la Apo D. En este sentido, nuestros datos demostraron que la CPZ comprometía el metabolismo celular, a nivel mitocondrial, en las líneas de oligodendroglioma y neuroblastoma humano, y provocaba cambios a nivel sistémico y de sistema nervioso en los ratones que se recuperan tras la suspensión del tratamiento con el tóxico. Sin embargo, el efecto neurotóxico/desmielinizante de la CPZ no fue capaz de inducir la expresión de la Apo D en ambas situaciones. De manera interesante, el aumento de los niveles de esta apolipoproteína, de forma endógena o exógena, previno la pérdida de viabilidad celular y la desmielinización ocasionada por el tratamiento con CPZ, en las líneas celulares y los ratones respectivamente, lo cual abre una nueva vía en el desarrollo de intervenciones terapéuticas para la EM y otras enfermedades desmielinizantes.

Introducción

1 ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica, autoinmune, inflamatoria y neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (SNC) (Axisa & Hafler, 2016; Reich et al., 2018). En torno a tres millones de personas en todo el mundo, 58.510 pacientes sólo en España, sufren esta patología de acuerdo con la *International Federation of Multiple Sclerosis (Number of people with MS / Atlas of MS, s. f.)* (Figura 1). Dentro de nuestro país, Asturias es una de las comunidades autónomas con mayor número de casos de EM (García López et al., 2022). Aunque las mujeres son más susceptibles que los hombres a padecerla en un ratio 3:1, su incidencia también varía según la etnia y la geografía, siendo los europeos y americanos del norte más propensos a desarrollarla (Feigin et al., 2019). Las consecuencias de la EM van más allá de los síntomas físicos; los pacientes tienen que limitar las actividades diarias y las relaciones sociales, viendo afectada su autoestima y reduciendo, con ello, su calidad de vida (Coyne et al., 2015). Se estima que el coste sanitario en España por paciente/año es de 30.000 euros, más de 1.400 millones de euros anuales, estando el 80% de estos gastos relacionados con la discapacidad así como con los recursos asociados a la rehabilitación y la hospitalización que necesitan los enfermos de EM (Gitto, 2017; Kobelt, 2006).

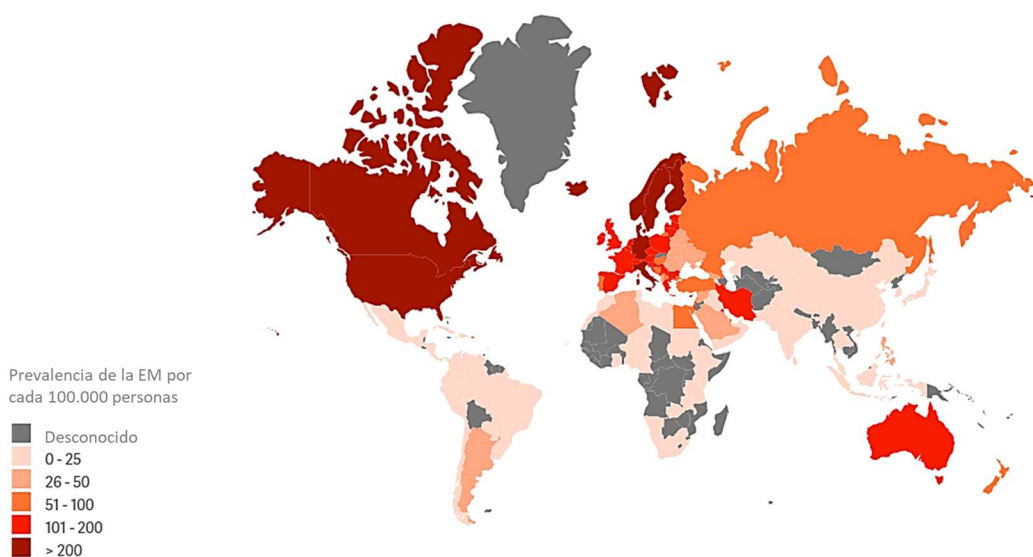


Figura 1. Distribución geográfica mundial de la prevalencia de EM (Imagen modificada de <https://www.atlasofms.org>)

Aunque la EM puede diagnosticarse en cualquier momento de la vida, los primeros síntomas observables aparecen en adultos jóvenes de unos 30 años, manifestándose en forma de un primer episodio llamado síndrome clínicamente aislado (CIS, de sus siglas en inglés *clinical isolated syndrome*), seguido un periodo de remisión y de nuevos brotes parcialmente reversibles que pueden durar días o semanas. Este tipo de EM es conocida como EM remitente-recurrente (EMRR), y en ella las lesiones neurológicas pueden provocar desde disfunción cognitiva hasta alteraciones motoras, digestivas, sensoriales, visuales, urinarias y/o sexuales, dependiendo de la zona del SNC afectada. De hecho, dada la variedad de manifestaciones clínicas, la EM es considerada una enfermedad muy heterogénea (Reich et al., 2018; Schiess & Calabresi, 2016). Tras 10-20 años desde su inicio, la EM pasa, en el 25-40% de los casos, a una fase secundaria progresiva (EMSP) en la que el paciente acaba sufriendo incapacidad parcial o total, tanto motora como cognitiva (Revisado por Reich et al., 2018; Yamout & Alroughani, 2018) (Figura 2a). En un 15% de los pacientes, normalmente mayores de 60 años, la enfermedad se agrava desde su inicio sin periodos de remisión de los síntomas, clasificándose como una EM primaria progresiva (EMPP) (Reich et al., 2018; Thompson et al., 2018) (Figura 2b).

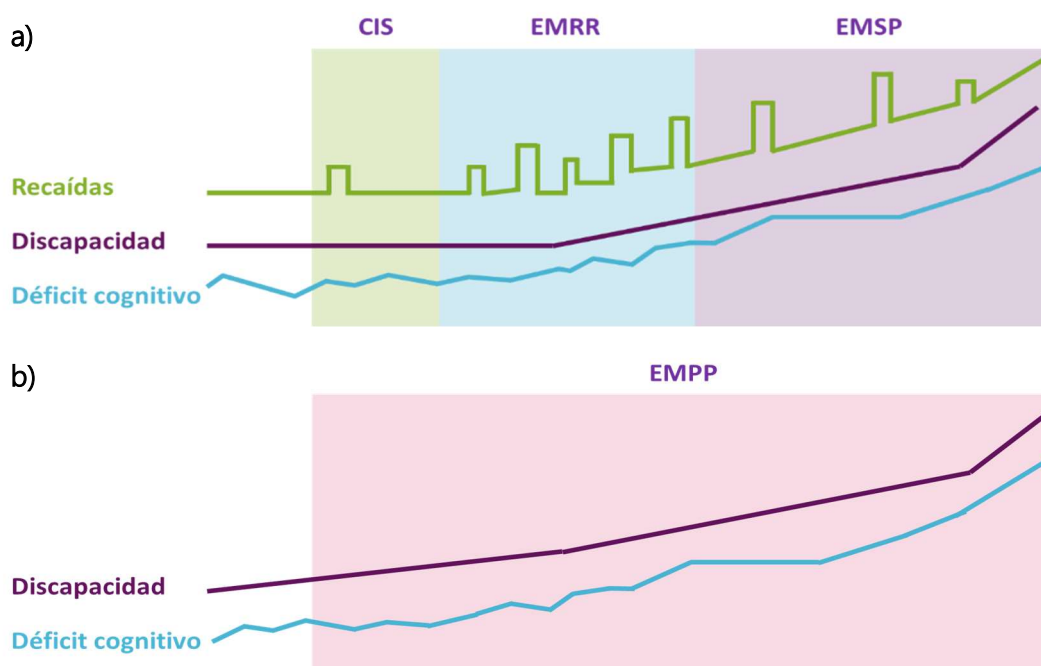


Figura 2. Clasificación de los tipos de EM en función de la aparición/remisión de los episodios desmielinizantes-inflamatorios (verde), así como el grado de discapacidad (morado) y déficit cognitivo (azul) adquiridos. a) CIS, Síndrome Clínicamente Aislado; EMRR, Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente; EMSP, Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva; b) EMPP, Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva (Fuente: elaboración propia).

1.1 Etiología de la Esclerosis Múltiple

A pesar de los avances realizados en investigación, la causa exacta de la EM sigue siendo desconocida a día de hoy. Se han descrito varios factores que aumentan el riesgo de padecer la patología, sin embargo, los mecanismos mediante los cuales actúan o incluso la posibilidad de que existan interacciones entre ellos siguen sin estar claros.

Entre los factores ambientales que pueden tener relación con la EM se encuentran i) los bajos niveles de vitamina D, una sustancia de efecto inmunomodulador cuya síntesis está relacionada con la latitud y la exposición al sol (Cotsapas et al., 2018; Yadav et al., 2015), ii) el consumo de tabaco, ya que las sustancias tóxicas inhaladas pueden incrementar los niveles de estrés oxidativo y la producción de citoquinas proinflamatorias en el SNC dando lugar a fenómenos de citotoxicidad sobre la microglía (Yadav et al., 2015), y iii) la infección por virus como el de Epstein Barr, postulado recientemente como uno de los agentes causantes de la EM (Bjornevik et al., 2022).

En cuanto a los factores genéticos, en 1970 se localizaron 3 alelos cuya presencia estaría relacionada con un mayor riesgo de padecer EM. Estos alelos se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en concreto, en los genes que codifican para los antígenos leucocitarios humanos (HLA, de sus siglas en inglés *human leukocyte antigens*), importantes en la regulación del sistema inmune (Jersild et al., 1972, 1973; Naito et al., 1972). Actualmente, y a través de estudios de asociación del genoma (GWAS, de sus siglas en inglés *genome-wide association studies*), se han localizado hasta 11 alelos de riesgo en la región del CMH (Patsopoulos et al., 2013), además de otros fuera de ella, entre los que se encuentran dos receptores de interleucinas (Hafler et al., 2007). En conjunto, se conocen más de 200 variantes genéticas implicadas en la EM, algunas de ellas relacionadas con funciones como la activación y proliferación de los linfocitos T, lo que apoyaría la hipótesis de que el factor impulsor de la enfermedad podría ser una alteración en la respuesta inmunitaria (Cotsapas et al., 2018). Respecto a la heredabilidad de la EM, se ha observado que las personas con un pariente de primer grado afectado tienen entre un 2% y un 4% más de posibilidades de padecer esta patología, respecto al 0,1% de prevalencia que presenta la población general (Reich et al., 2018). Al final, todas estas observaciones sugieren una etiología poligénica, según la cual el riesgo global de padecer EM es el resultado de la contribución de múltiples alelos que, a su vez, pueden interaccionar con factores ambientales (Didonna & Oksenberg, 2015).

Aunque los factores mencionados son los más estudiados, no se deben descartar otros como la existencia de trastornos comórbidos concomitantes (ej.: obesidad o diabetes) (Thompson et al., 2018) o las alteraciones de la microbiota intestinal (Correale et al., 2022; Reich et al., 2018), los cuales están cobrando cada vez más importancia.

1.2 Patogénesis de la Esclerosis Múltiple

A pesar de que la primera referencia sobre la enfermedad data de 1868 (Kumar et al., 2011), no es hasta comienzos del siglo XX cuando Dawson describe la EM como una condición patológica caracterizada por inflamación y daño mielínico en torno a los vasos sanguíneos del cerebro (Dawson, 1916). Por aquel entonces se postulaba que un agente extrínseco, un virus o una bacteria, era el causante de esta patología. Sin embargo, estudios posteriores realizados por Rivers y Schwentker (1935), y más tarde por Kabat y colaboradores (1942) demostraron la implicación del sistema inmune y sus células en ella.

Actualmente, los mecanismos exactos implicados en la fisiopatología de la EM, tanto a nivel celular como molecular, se desconocen. No obstante, existen varias hipótesis que tratan de dar respuesta a algunas de las incógnitas relacionadas con el desarrollo de la enfermedad, como el evento inicial responsable de la activación de la cascada neurodegenerativa característica de esta patología, o la contribución de cada uno de sus componentes (inflamatorio, neurodegenerativo e inmunológico) a su patogénesis (Reich et al., 2018).

Una de las hipótesis, la denominada “de fuera hacia dentro” por su nombre en inglés (*outside-in*), postula que la pérdida de los puntos de control tanto en el sistema inmune innato como en el adaptativo provoca, en un primer momento, una inflamación de carácter autoinmune la cual, a su vez, da lugar a la degradación de la mielina de manera secundaria (Caprariello et al., 2018; Stys et al., 2012; Titus et al., 2020). Según esta teoría, la pérdida de tolerancia inmunitaria periférica hace que proteínas propias del SNC, como las que forman parte de la vaina de mielina, sean reconocidas como antígenos por los linfocitos B y T de los ganglios linfáticos periféricos, diferenciándose a linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (Teniente-Serra et al., 2017; Yadav et al., 2015). Una vez activos, los linfocitos consiguen entrar en el SNC a través de la barrera hematoencefálica (BHE), un proceso facilitado por la presencia de citoquinas proinflamatorias y metaloproteasas de matriz (MPM) que alteran las uniones adherentes y estrechas de las células endoteliales (Aung et al., 2015; Yamout & Alroughani, 2018). Tras alcanzar el SNC, los linfocitos T reconocen proteínas locales presentadas como antígenos por células dendríticas y macrófagos, desencadenando una cascada inflamatoria. Esta reacción va acompañada de la producción de más citoquinas proinflamatorias, de la llegada de más linfocitos T, linfocitos B y monocitos, y de la activación de macrófagos perivasculares y microglía que secretan proteasas y MPM, especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN) o glutamato (Disanto et al., 2012; Koudriavtseva & Mainero, 2016; Luchetti et al., 2018; Piani et al., 1991; Thompson et al., 2018; Yamout & Alroughani, 2018). Además, bajo estas condiciones los oligodendrocitos (OLGs), astrocitos y neuronas expresan proteínas del CMH de clase I reconocidas por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, lo que hace que se mantenga o incluso intensifique el proceso inflamatorio, induciendo la muerte celular (McQualter & Bernard, 2007; Yadav et al., 2015). El papel de los linfocitos B en la EM aún está por determinar pero se cree que, una vez en el SNC, éstos se diferencian a células plasmáticas y causan desmielinización mediante la producción de anticuerpos anti-mielina que provocan la activación del complemento y fagocitosis

(Yadav et al., 2015) (Figura 3). De hecho, existen pruebas de que estas células juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad, pues su activación se relaciona con la conversión de un CIS en una EM definida, así como con la aparición de recaídas y agravamiento de la discapacidad (Disanto et al., 2012). También se ha observado que el virus de Epstein Barr, uno de los posibles agentes causales de la EM, reside de forma latente en los linfocitos B tras la infección (Robinson & Steinman, 2022).

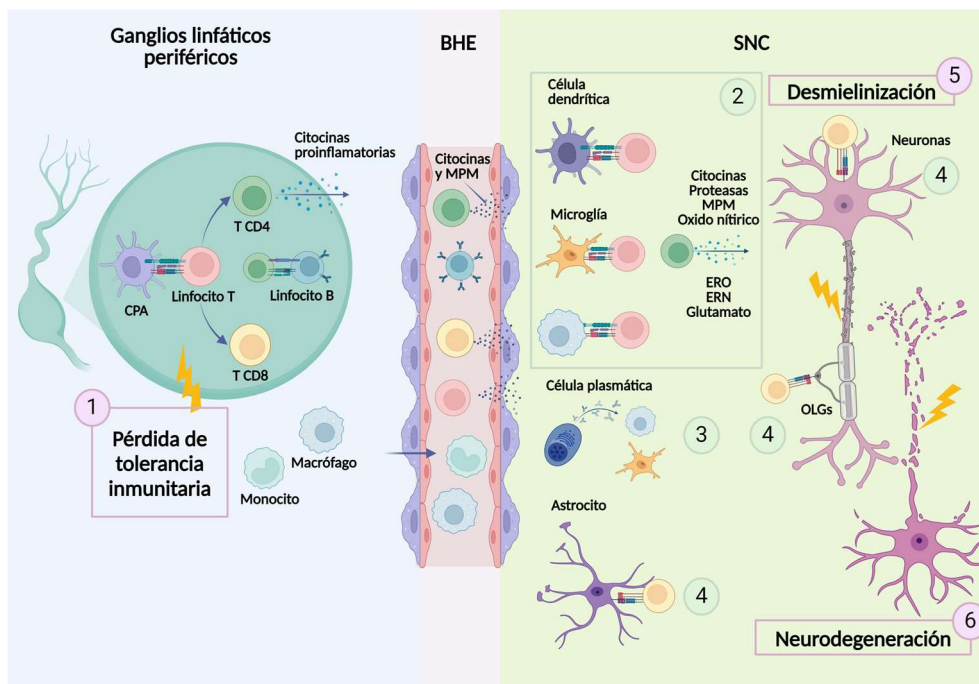


Figura 3. Fisiopatología de la EM basada en la hipótesis "outside-in". La pérdida de tolerancia inmunitaria periférica (1) hace que se activen linfocitos B y linfocitos T frente a proteínas propias del SNC. Estas células entran en el SNC a través de la BHE donde los linfocitos T reconocen proteínas locales como antígenos, desencadenando una cascada inflamatoria (2); los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas y producen anticuerpos anti-mielina (3); y células propias del SNC como OLGs, neuronas y astrocitos expresan proteínas reconocidas por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (4). Estos mecanismos contribuyen al mantenimiento del ambiente inflamatorio en el tiempo, lo que provoca desmielinización (5) y neurodegeneración (6). BHE, barrera hematoencefálica; CPA, células presentadoras de antígenos; ERN, especies reactivas de nitrógeno; ERO, especies reactivas de oxígeno; MPM, metaloproteasas de matriz; OLGs, oligodendrocitos; SNC, sistema nervioso central (Elaboración propia con BioRender.com).

Otra de las hipótesis propuestas sobre la patogénesis de la EM es el llamado modelo "de adentro hacia afuera" (*inside-out*) que cuenta cada día con el apoyo de más autores (Figura 4). Basado en evidencias recientes, defiende que la alteración de la mielina a nivel bioquímico y/o la degeneración de los OLGs constituyen el evento inicial de la EM, el cual ocurre años antes de la aparición de los primeros síntomas (Titus et al., 2020). Por un lado, la liberación de proteínas mielínicas fuera del SNC a través de la BHE, seguida del reconocimiento de éstas como antígenos y la activación de linfocitos T autorreactivos en los ganglios linfáticos periféricos desencadenan una respuesta autoinmune secundaria la cual, a su vez, resulta en una reacción inflamatoria desmielinizante que afecta

al SNC de los pacientes con EM (Stys et al., 2012). Esta conexión fue demostrada empíricamente por Caprariello y su equipo en el año 2018, gracias al desarrollo de un modelo murino en el que pequeñas modificaciones bioquímicas de la mielina cerebral, inducidas por el tratamiento con un neurotóxico, provocaban respuestas inmunitarias alteradas con características radiológicas e histológicas similares a las lesiones de desmielinización inflamatoria de la EM (Caprariello et al., 2018). Más autores han arrojado luz sobre esta hipótesis, postulando que la eliminación de la proteína básica de la mielina (PBM), la cual participa en la compactación y el mantenimiento de la integridad de la vaina de mielina, es un punto clave en la desmielinización patológica (Musse et al., 2006). Además, se sabe que el grado de alteración bioquímica de la mielina está relacionado directamente con la gravedad de las lesiones de la EM (Bradford et al., 2014; Moscarello et al., 1994; Wood et al., 1996). Por otro lado, también se ha demostrado que la degeneración de los OLGs es un factor desencadenante de la enfermedad. Así, Traka y colaboradores, desarrollaron un modelo de ratón, *Plp1-CreERT; ROSA26-eGFP-DTA*, con modificaciones genéticas que provocaban la muerte de sus OLGs lo que, en consecuencia, daba lugar a una enfermedad mortal de aparición tardía caracterizada por una extensa pérdida de mielina y degeneración axonal asociadas a un aumento del número de linfocitos T en el SNC. En conjunto, estos datos indican que la muerte de los OLGs sería suficiente para desencadenar una respuesta autoinmune adaptativa contra la mielina como la que ocurre en la EM (Traka et al., 2016).

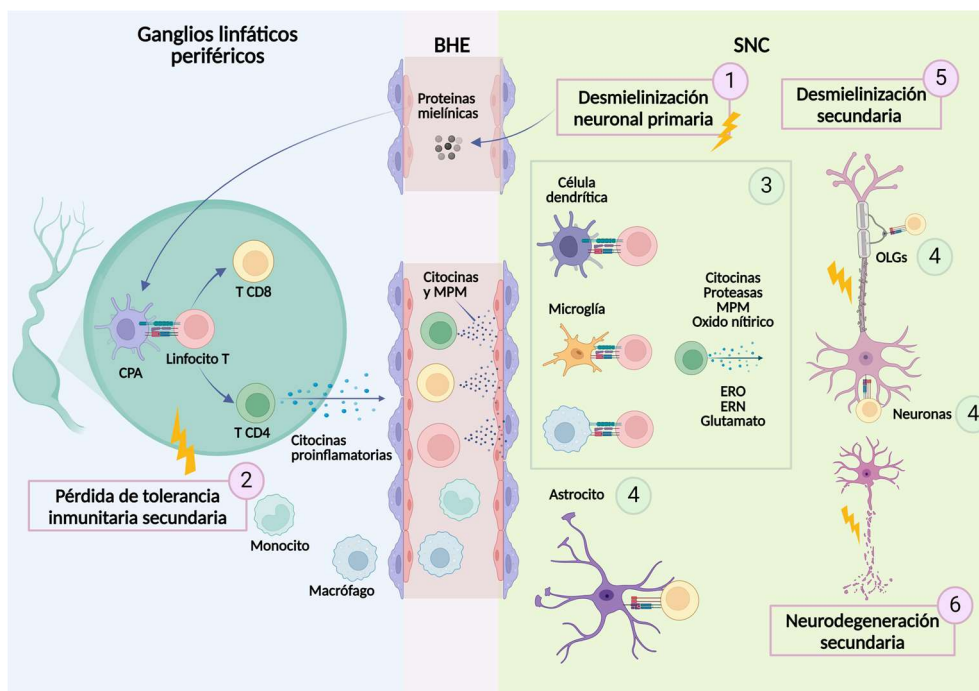


Figura 4. Fisiopatología de la EM basada en la hipótesis "inside-out". La alteración primaria de la mielina es el evento inicial de la EM (1). La liberación de proteínas mielínicas fuera del SNC a través de la BHE, seguida de la pérdida de tolerancia inmunitaria en los ganglios linfáticos periféricos (2) desencadenarían la respuesta autoinmune secundaria (3). Células propias del SNC como OLGs, neuronas y astrocitos expresan proteínas reconocidas por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (4). Todo ello se traduce en las consecuentes desmielinización (5) y neurodegeneración (6) a nivel del SNC. BHE, barrera hematoencefálica; CPA, células presentadoras de antígenos; ERN, especies reactivas de nitrógeno; ERO, especies reactivas de oxígeno; MPM, metaloproteasas de matriz; OLGs, oligodendrocitos; SNC, sistema nervioso central (Elaboración propia con BioRender.com).

INTRODUCCIÓN

Independientemente de su causa, el mantenimiento del ambiente inflamatorio en el tiempo debido a la activación persistente de la microglía, la producción de citoquinas proinflamatorias, proteasas, óxido nítrico y glutamato, así como la presencia de anticuerpos que reconocen como extrañas algunas proteínas esenciales del SNC como la PBM o las glicoproteínas asociada a la mielina (MOG, de sus siglas en inglés, *myelin oligodendrocyte glycoproteins*) provocan, finalmente, la destrucción de la vaina de mielina, pérdida axonal, y muerte oligodendrocítica y neuronal (Bjartmar et al., 2003; Cross et al., 2001; Markovic et al., 2003; Yamout & Alroughani, 2018). Tras este episodio inicial, los siguientes brotes que suceden a los periodos de remisión de la EM se deben, al menos en cierta medida, a la presentación de proteínas locales liberadas en el SNC durante la recaída anterior como nuevos antígenos por parte de las células dendríticas. Esto provoca que los linfocitos T se activen y se desencadene una nueva cascada inflamatoria (Cavone et al., 2014; McMahon et al., 2005; Vanderlugt & Miller, 2002).

Todos los procesos patológicos bioquímicos/celulares que acontecen en la EM se reflejan a nivel histológico en placas de desmielinización, también denominadas placas escleróticas o cicatrices escleróticas, localizadas en el cerebro y otras zonas del SNC como el tálamo, tronco encefálico y médula espinal, así como en el sistema nervioso periférico (SNP) a nivel del nervio óptico (Reich et al., 2018; Zindler & Zipp, 2010). Las placas escleróticas evolucionan de forma diferente durante las fases de la enfermedad, observándose dos tipos en función del grado de desmielinización:

- Las placas activas, caracterizadas por la presencia de linfocitos B y T activos, OLGs y restos de mielina, son comunes en la fase aguda de la EM (Popescu et al., 2013). El ambiente inflamatorio en estas placas induce la llegada de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs, de sus siglas en inglés *Oligodendrocyte Precursor Cells*) que se diferencian a OLGs maduros, de astrocitos reactivos y de macrófagos que actúan eliminando los restos de mielina y subproductos inflamatorios mediante fagocitosis. El reclutamiento de estas células promueve la remielinización (Navarro et al., 2018; Reich et al., 2018), un proceso por el cual se forman nuevas vainas de mielina en aquellos axones que han quedado desprovistos de ellas (Franklin & Goldman, 2015). La remielinización es un fenómeno habitual en los periodos de remisión que siguen a los brotes en las primeras etapas de la EM, reestableciéndose la conducción saltatoria del impulso nervioso, potenciándose la supervivencia axonal y revirtiéndose algunos de los déficits funcionales (Merkler et al., 2006). No obstante, la recuperación de los síntomas también podría deberse, en parte, a la plasticidad cortical, es decir, a una reorganización funcional y estructural de la corteza que tiene por objetivo mantener la función cerebral (Thompson et al., 2018).
- Las placas inactivas, por su parte, son zonas completamente desmielinizadas que aparecen principalmente en la fase EMSP. Estas placas muestran una infiltración celular menor y una pérdida sustancial de axones y OLGs, por lo que su desmielinización es irreversible (Bradford et al., 2014; Navarro et al., 2018). En ellas, se produce una alteración del transporte y la homeostasis iónica axonal, daño mitocondrial, y una secreción

reducida de factores neurotróficos por parte de las neuronas (Bradl & Lassmann, 2009; Lassmann et al., 2012).

A nivel funcional, las lesiones desmielinizantes producidas en cada brote se traducen en la limitación de los impulsos eléctricos, disminuyendo la velocidad o incluso bloqueando la conducción nerviosa, lo que provoca la disfunción neurológica de la zona afectada (Fuller & Goodman, 2001). Así, la expansión de las lesiones preexistentes, aunque lenta, hace que los pacientes pasen de la fase remitente-recurrente a la secundaria progresiva (Bradl & Lassmann, 2009; Lassmann et al., 2012). A esto se añade el hecho de que a medida que progresa la EM los mecanismos de remielinización se hacen menos eficientes (Navarro et al., 2018).

1.3 Diagnóstico de la Esclerosis Múltiple

El diagnóstico de la EM es muy complejo debido sobre todo a la heterogeneidad intra e interindividual de la enfermedad y a la imposibilidad de realizar pruebas invasivas en humanos (ej.: biopsias cerebrales), lo cual, a su vez, dificulta la búsqueda de biomarcadores diagnósticos específicos.

En los años 70 y 80 se obtuvieron las primeras imágenes de lesiones cerebrales en pacientes con EM gracias al desarrollo de la resonancia magnética (RM), lo que mejoró el diagnóstico de esta patología de manera considerable (Cotsapas et al., 2018). De hecho, la RM, aunque con mejoras, es la herramienta más utilizada en la actualidad permitiendo visualizar la lesiones desmielinizantes, la alteración de la BHE y la atrofia cerebral incluso en ausencia de síntomas clínicos (Reich et al., 2018). Además de la historia clínica y la exploración neurológica, también se emplean otras técnicas de forma complementaria a la RM, como los estudios de potenciales evocados que identifican lesiones clínicamente silenciosas a nivel del nervio óptico, el tronco cerebral y la médula espinal (Yamout & Alroughani, 2018), o la detección de las inmunoglobulinas G y M en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en forma de bandas oligoclonales (Titus et al., 2020).

Desde 2001, se utilizan para el diagnóstico de la EM los criterios de McDonald, revisados y actualizados varias veces desde entonces (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005, 2011; Thompson et al., 2018). Estos criterios parten de la observación mediante RM de, al menos, dos episodios clínicos o un único episodio con dos o más lesiones desmielinizantes que se expanden en el espacio (DIS, del término en inglés *dissemination in space*) y tiempo (DIT, del término en inglés *dissemination in time*). La DIS se define como la presencia de una lesión desmielinizante en, como mínimo, dos de las cuatro áreas del SNC (periventricular, yuxtacortical, infratentorial y espinal). La DIT, por su parte, puede demostrarse por la aparición simultánea de varias lesiones sintomáticas, o por la presencia de una o más nuevas lesiones detectadas en comparación con una RM de referencia (Polman et al., 2011). La última revisión de los criterios de McDonald (2018), ya incluye la presencia de bandas oligoclonales en el LCR como nuevo parámetro diagnóstico (Thompson et al., 2018).

1.4 Tratamiento de la Esclerosis Múltiple

Hoy en día no existe una cura para la EM, pero sí se han desarrollado una serie de tratamientos, farmacológicos y no farmacológicos, efectivos y seguros que alivian algunos de los síntomas de la enfermedad o que ralentizan el avance de ésta, sobre todo en la EMRR. También se han descrito algunos fármacos para el tratamiento específico de la EMPP o EMSP.

1.4.1 Tratamiento farmacológico

Entre los tratamientos farmacológicos utilizados se encuentran aquellos que tienen por finalidad la mejora sintomatológica de la EM, por ejemplo, el nabiximol o el baclofeno para reducir la espasticidad, o algunos fármacos neuromoduladores para aliviar el dolor neuropático (Conte & Silván, 2021). En lo que se refiere al tratamiento de los brotes se suelen utilizar corticoides orales o intravenosos, como la metilprednisolona. Estos compuestos reducen la gravedad y duración del brote pero no son capaces de disminuir la discapacidad a largo plazo (Le Page et al., 2015). Por último, se encuentran las llamadas terapias modificadoras de la enfermedad que tienen por objetivo disminuir la probabilidad de nuevos brotes o la aparición de nuevas lesiones. En algunas de estas terapias se emplean fármacos inmunomoduladores como el Interferón β (IFN β) y el acetato de glatiramer que modulan la actividad de los linfocitos T y B así como la secreción de citoquinas (Ebers, 1998; Fridkis-Hareli et al., 1994; Goodin et al., 2012; Lalive et al., 2011); la teriflunomida, un inhibidor reversible de la enzima mitocondrial que media la síntesis *de novo* de pirimidina en las células inmunitarias (Confavreux et al., 2014); y el fingolimod, un antagonista del receptor de la esfingosina-1-fosfato en leucocitos y en células endoteliales que impide la infiltración de linfocitos en el SNC (Kappos et al., 2010; Pelletier & Hafler, 2012). Otras terapias utilizan anticuerpos monoclonales como el natalizumab y el alemtuzumab aprobados para el tratamiento de la EMRR, o el ocrelizumab en el caso de la EMPP. Todos ellos tienen como diana determinadas proteínas de superficie de los linfocitos T y B (Cohen et al., 2012; Hauser et al., 2017; Polman et al., 2009). Actualmente, se encuentran bajo estudio otros posibles tratamientos para la EMPP como la biotina, un cofactor que parece mejorar la síntesis de ácidos grasos y la reparación de la mielina y, con ello, la preservación de los axones al incrementar el metabolismo energético de las neuronas (Tourbah et al., 2016). Otra alternativa es la mitoxantrona, un agente citotóxico que impide la activación y proliferación de los linfocitos T y B, además de disminuir la producción de anticuerpos (Boneschi et al., 2013).

De entre los compuestos utilizados en las terapias para combatir la EMSP destaca el siponimod, un modulador del receptor de esfingosina-1-fosfato que actúa reduciendo la salida de linfocitos de los tejidos linfoides, evitando la recirculación de los mismos por el SNC (Kappos et al., 2018).

Todos los tratamientos farmacológicos descritos han demostrado reducciones significativas en la frecuencia de las recaídas y la progresión de la incapacidad neuromotora. El IFN β , acetato de glatiramer, dimetil fumarato y teriflunomida han sido aprobados por la FDA (*Food & Drug Administration*) y la EMA (*European*

Medicines Agency) como tratamientos de primera línea para la EM sin ninguna restricción. El fingolimod, el natalizumab, el ocrelizumab y el alemtuzumab son los medicamentos usados habitualmente en pacientes con una respuesta subóptima a las terapias anteriores (Yamout & Alroughani, 2018). Desafortunadamente, algunos de estos compuestos presentan efectos secundarios importantes, por ejemplo, el aumento de la tasa de infecciones por inmunosupresión relacionadas con eventos autoinmunes secundarios como la enfermedad tiroidea (30%), la trombocitopenia inmunológica (1-2%), y los casos "raros" de enfermedad de la membrana basal antiglomerular (Fox et al., 2016).

El objetivo último de cualquiera de estos abordajes terapéuticos es disminuir la neuroinflamación. No obstante, y teniendo en cuenta el componente neurodegenerativo de la EM, se han empezado a investigar varios compuestos que podrían promover la remielinización endógena, protegiendo la mielina y los axones, y estimulando la diferenciación de las OPCs (Deshmukh et al., 2013; Fancy et al., 2011; Huang et al., 2011). Hasta el momento, la repercusión de los resultados experimentales llevados a cabo es escasa ya que su eficacia parece limitada, posiblemente debido a que la neurodegeneración está causada por múltiples mecanismos bioquímicos que funcionan de manera aditiva a través de vías diversas (Gonsette, 2008). Algunas de las moléculas bajo estudio son la hidralazina (G. Leung et al., 2011), el resveratrol (Sun et al., 2010) o la lovastatina (Abdanipour et al., 2014). También son de interés moléculas neuroprotectoras sintetizadas por el propio organismo como las apolipoproteínas, una familia de proteínas con un papel esencial en el transporte y metabolismo de los lípidos (Sarantseva et al., 2009). Varios estudios sugieren que éstas ejercen efectos beneficiosos en algunas patologías neurológicas como la enfermedad de Alzheimer (EA) o la EM, por lo que su sobreexpresión o administración exógena podría ser considerada una terapia prometedora desde el punto de vista clínico (Elliott et al., 2010; Wang et al., 2007). Dentro de este grupo de moléculas neuroprotectoras endógenas también se incluyen los endocannabinoides, compuestos neuromoduladores pertenecientes al sistema endocannabinoide, que actúan sobre los receptores cannabinoides y que constituyen, según diferentes estudios, posibles dianas terapéuticas para controlar la progresión de la neurodegeneración en la EA, la enfermedad de Parkinson (EP) o la EM (Fernández-Ruiz et al., 2017; Martínez-Pinilla et al., 2014). De hecho, se ha demostrado que la activación de estos receptores puede inducir la eliminación de agregados de proteínas mediante autofagia (Costa et al., 2016), así como promover procesos neurogénicos (Esposito et al., 2011). Además, los endocannabinoides también pueden ejercer efectos antioxidantes y antiinflamatorios a través de mecanismos independientes de receptor (Fernández-Ruiz et al., 2013).

1.4.2 *Tratamiento no farmacológico*

En los últimos años, se ha hecho un gran avance en el desarrollo de nuevos tratamientos no farmacológicos para la EM, si bien es verdad que la mayoría de ellos se encuentran todavía bajo estudio. Ensayos realizados en modelos animales de EM han demostrado que el ejercicio físico tiene efectos beneficiosos en el cerebro, ya que atenúa la neuroinflamación y mejora la remielinización (Centonze et al., 2020). En algunos pacientes se ha

observado que el ejercicio físico tiene un papel central en la recuperación de los brotes, tanto a nivel de movilidad como de capacidad cognitiva (Briken et al., 2013; Motl et al., 2017). De forma complementaria, la fisioterapia es útil para aliviar ciertos síntomas de la EM como la espasticidad, el deterioro de la marcha, la ataxia o la fatiga (Hauser & Cree, 2020). La hidroterapia también es una actividad recomendable ya que la flotabilidad, la presión hidrostática y la resistencia ejercida por el agua pueden utilizarse de forma beneficiosa para reducir la tensión muscular (Amedoro et al., 2020).

Por último, entre los tratamientos no farmacológicos más novedosos se puede incluir el trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas, o de células precursoras neuronales u oligodendrocíticas a nivel cerebral (Muraro et al., 2017; Nash et al., 2017). Estos procedimientos se han demostrado eficaces en modelos animales pero aún no se han realizado ensayos clínicos en pacientes (Hu et al., 2009; Wang et al., 2013).

2 MODELOS DE ESTUDIO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El estudio de la EM presenta dos limitaciones importantes, como ya se ha mencionado, una es que su causa sigue siendo desconocida, y otra que el acceso al tejido cerebral humano está restringido a los estudios *post-mortem*. Esto ha hecho necesario el desarrollo de modelos experimentales que reproduzcan los aspectos fisiopatológicos más relevantes de la enfermedad, como la autoinmunidad, la neuroinflamación, la degeneración axonal, y/o los mecanismos de des/remielinización. Estos prototipos experimentales también permiten el estudio de la evolución de la enfermedad en el tiempo y la evaluación de intervenciones terapéuticas (van der Star et al., 2012). Sin embargo, a pesar de la variedad de modelos que existen, tanto *in vitro* como *in vivo*, ninguno de ellos recapitula todos los aspectos patológicos de la EM al mismo tiempo (Revisado por Sanabria-Castro et al., 2020).

2.1 Modelos animales

Los modelos *in vivo* permiten el estudio de los mecanismos fisiopatológicos asociados a las enfermedades neurodegenerativas, y son esenciales para confirmar la eficacia y la seguridad de compuestos terapéuticos previamente testados en modelos *in vitro*. En concreto, los modelos utilizados para la investigación de la EM, desarrollados principalmente en roedores, pueden clasificarse en i) modelos inmunomediados, como el modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune (EAE), ii) modelos inducidos por virus como el de la encefalomiелitis murina de Theiler, el virus de Semliki Forest o el de la hepatitis murina, iii) modelos de des/remielinización mediante el uso de toxinas, y iv) modelos transgénicos (Sanabria-Castro et al., 2020).

Los modelos inmunomediados, como el de la EAE, se basan en la activación de linfocitos T reactivos en el SNC tras la inmunización con un autoantígeno (EAE activa), o mediante la administración de los propios linfocitos ya activados frente a dicho antígeno (EAE pasiva). Las características clínicas y patológicas de la enfermedad inducida dependen del autoantígeno utilizado; por ejemplo mielina purificada, péptidos encefalitogénicos de proteínas de la mielina o proteínas neuronales (Merrill, 2009; van der Star et al., 2012). Estos modelos han resultado

útiles para el desarrollo de terapias modificadoras de la EM, como las basadas en los fármacos natalizumab, fingolimod, dimetilfumarato o alemtuzumab (Kipp et al., 2017).

En cuanto a los modelos virales de la patología destaca el del virus de Semliki Forest el cual, una vez inoculado periféricamente y después de atravesar la BHE, infecta neuronas y OLGs, provocando zonas de desmielinización a nivel del SNC (van der Star et al., 2012). Aunque es un modelo útil para estudiar la des/remielinización en roedores, no reproduce todos los síntomas de la EM, probablemente porque no provoca un daño axonal grave (Kipp et al., 2012). El virus de la encefalomyelitis murina de Theiler, un patógeno exclusivo de ratones, es capaz de inducir una enfermedad neurológica desmielinizante por infección de las neuronas e inflamación crónica, que también causa daño en la microglía y los OLGs (DePaula-Silva et al., 2017) Aunque es muy útil para estudiar el daño mielínico y axonal, presenta dificultades técnicas importantes al necesitar de la inyección directa del virus en el SNC mediante cirugía estereotáctica (Kipp et al., 2012). Por su parte, las cepas neurovirulentas del virus de la hepatitis murina afectan a astrocitos, OLGs y células de microglía, produciendo lesiones inflamatorias desmielinizantes y dando lugar a una enfermedad neuroparalítica tras una infección intracraneal o nasal (Bender & Weiss, 2010). De nuevo, la principal desventaja de este modelo radica en la complejidad para introducir el virus en el SNC (Vega-Riquer et al., 2019).

Por último, los modelos de toxicidad se basan en la administración de moléculas bioactivas que van dirigidas específicamente contra los OLGs, provocando su degeneración y muerte, lo que en última instancia conduce a una desmielinización grave en el SNC, pero sin la complejidad añadida que supone la presencia del componente inmunológico de la EM (Palumbo & Pellegrini, 2017). La desmielinización puede ser provocada por la inyección local de compuestos químicos específicos como la lisolecitina y el bromuro de etidio mediante cirugía estereotáctica (Franklin et al., 1993; Woodruff & Franklin, 1999), o por la administración sistémica de una toxina. Entre las toxinas, la cuprizona (CPZ), un agente neurotóxico quelante de cobre, es la más empleada (Kipp et al., 2009; Sanabria-Castro et al., 2020). El modelo de toxicidad inducida por CPZ se ha utilizado ampliamente para estudiar los procesos de desmielinización y la remielinización experimental ya que afecta seriamente a la sustancia blanca del cerebro y se observa de forma fácil y consistente en el cuerpo calloso. Otras regiones de sustancia blanca afectadas incluyen los pedúnculos cerebelosos superiores y la comisura anterior. También actúa en regiones de sustancia gris como el hipocampo. Este modelo favorece la comprensión básica de la desmielinización y el diseño de estrategias remielinizantes y neuroprotectoras en enfermedades desmielinizantes del SNC (Skripuletz et al., 2011).

El mecanismo por el cual la CPZ induce la desmielinización no está del todo claro, pero teniendo en cuenta que el cobre es un componente esencial de la enzima citocromo oxidasa mitocondrial (complejo IV), se ha propuesto que es el déficit de este metal el que induce alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial y promueve la lesión oxidativa (Vega-Riquer et al., 2019; Venturini, 1973). A su vez, las alteraciones mitocondriales

darían lugar a una pérdida energética que, sumada a la elevada demanda metabólica que supone la síntesis de mielina, compromete la viabilidad e induce la muerte de los OLGs (Praet et al., 2014; Zhan et al., 2020). En consecuencia, la administración de CPZ acaba provocando desmielinización, daño axonal, activación de astrocitos y microglía, infiltración de macrófagos e inflamación, incrementando los niveles de estrés oxidativo en el SNC (Kipp et al., 2017; Raivich & Banati, 2004; Sen et al., 2022).

No obstante, para desgranar aún más los mecanismos que subyacen al proceso de desmielinización y obtener respuestas fiables se requiere el desarrollo de modelos más simples que los basados en animales, para lo cual son fundamentales las líneas celulares inmortalizadas o cultivos primarios neuronales y/o de OLGs (Pasquini et al., 2007; Praet et al., 2014).

2.2 Modelos celulares

Los modelos *in vitro* se basan principalmente en el uso de cultivos celulares, bien sea cultivos primarios de células obtenidas a partir de cerebros de mamíferos o líneas celulares inmortalizadas de origen animal o humano. En ambos casos, estas aproximaciones permiten estudiar las interacciones celulares en un entorno simplificado, controlado y replicable que no se da *in vivo* (Kipp et al., 2012).

En lo que se refiere a la EM, cobra especial importancia el uso de cultivos de OLGs y/o neuronas de origen humano para i) el estudio de los procesos de diferenciación, y del efecto de los factores inflamatorios en la desmielinización y neurodegeneración (Kipp et al., 2012), ii) la investigación de nuevos compuestos químicos que favorezcan la proliferación de los OLGs (van der Star et al., 2012), y iii) el desarrollo de estrategias que ayuden a mejorar la eficacia del proceso de remielinización (Merrill, 2009). Por un lado, los modelos de desmielinización y neurodegeneración se basan en el uso de agentes citotóxicos que provocan la muerte de los OLGs y neuronas en cultivo, como el ácido kaínico o citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α , de sus siglas en inglés *tumoral necrosis factor*) o el IFN γ (Mieke Buntinx et al., 2004; McCarthy, 2008). Por otro lado, en los modelos de remielinización se promueve la supervivencia, proliferación o migración de neuronas y OLGs a través de la adición de factores de crecimiento celular, hormonas como el estradiol, o pequeñas moléculas como el adenosín trifosfato (ATP) o el ácido retinoico (McCarthy, 2008; Merrill, 2009). El cultivo de células de microglía, por su parte, permite analizar la respuesta de éstas ante diversas señales y estímulos así como estudiar su mecanismo de activación, el cual parece implicado en la patogénesis de la enfermedad (Torre-Fuentes et al., 2020; van der Star et al., 2012). Así mismo, se han desarrollado modelos *in vitro* para el estudio de las interacciones celulares del sistema nervioso (SN) basados en el co-cultivo de dos o más tipos de células (van der Star et al., 2012).

A efectos prácticos, los cultivos primarios pueden replicar las condiciones presentes en un tejido con mayor fidelidad. Sin embargo, la obtención y preservación de estas células a partir de tejido nervioso animal o humano requiere protocolos complejos y costosos. Además, su capacidad de proliferación es limitada (Sanabria-Castro et

al., 2020). Como alternativa se utilizan líneas celulares inmortalizadas, como la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, base de varios modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas como la EA, la EP o la EM (Grimm et al., 2020; van der Star et al., 2012; Xicoy et al., 2017). Otro ejemplo es la línea celular de oligodendroglioma humano, HOG, utilizada como modelo de estudio de la mielinización en la EM (Madill et al., 2016). De forma complementaria, se pueden aplicar técnicas de diferenciación sobre estas líneas celulares, permitiendo una mejor extrapolación de los resultados obtenidos (De Kleijn et al., 2019; Kovalevich & Langford, 2013).

3 LA APOLIPOPROTEÍNA D

La Apolipoproteína D (Apo D) es una glicoproteína de secreción de 29 kDa, miembro de la superfamilia de las lipocalinas (Rassart et al., 2020), que actúa como un transportador de una gran variedad de pequeños ligandos hidrofóbicos como el retinol, el ácido retinoico, la esfingomielina, la progesterona, la anandamida o el ácido araquidónico (AA), este último con una gran afinidad (Cabral et al., 1995; Ruiz et al., 2013; Vogt & Skerra, 2001).

La Apo D fue aislada en los años 70 a partir de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, de sus siglas en inglés *high density lipoprotein*) del plasma sanguíneo humano, por lo que inicialmente se incluyó en la familia de las lipoproteínas (McConathy & Alaupovic, 1973). Sin embargo, tras varios años de estudio se observó que la Apo D no era una apolipoproteína típica. A diferencia del resto de lipoproteínas, cuya presencia se limita al hígado y/o intestino, el gen *APOD* se expresa también en muchos otros órganos como el bazo, las glándulas adrenales, los pulmones y los riñones (Weech et al., 1991), siendo su expresión más elevada en los testículos, los nervios periféricos, el cerebro, la médula espinal, y fluidos corporales como el plasma (Rassart et al., 2020). Además, la secuencia de aminoácidos de la Apo D no presenta similitudes con la del resto de apolipoproteínas, pero sí con la de miembros de la familia de las lipocalinas (Weech et al., 1991). Recientemente, se ha comprobado que la Apo D contiene un péptido señal en su extremo N-terminal que permite que la proteína entre en el retículo endoplásmico y que pueda seguir una vía de secreción canónica, durante la cual se glicosila (Rassart et al., 2020; Sanchez & Ganfornina, 2021).

En cuanto a la expresión de la Apo D a nivel celular, los fibroblastos, en concreto los más cercanos a los vasos sanguíneos, parecen ser los que más cantidad de Apo D acumulan, algo que podría estar relacionado con el transporte local de moléculas como el colesterol, los esteroides, la bilirrubina y el AA (Rassart et al., 2020; Smith et al., 1990; Weech et al., 1991). Pero, además, hay otros tipos celulares que expresan Apo D y/o son capaces de endocitarla del medio extracelular (Sanchez & Ganfornina, 2021). Por ejemplo, la Apo D es sintetizada por células del aparato reproductor, tanto humano como de otros mamíferos, como las células del epitelio glandular de la mama (Eigeliene et al., 2012), las células de la teca y del cuerpo lúteo del ovario (Hatzirodos et al., 2015; Kfir et al., 2018), las células estromales y epiteliales del endometrio durante la fase secretora del ciclo (Germeyer et al., 2013), así como los espermatozoides durante la espermatogénesis en el testículo (Lim et al., 2016). Dentro del SN las células

gliales mielinizantes (OLGs y células de Schwann) son las que más cantidad de Apo D muestran (García-Mateo et al., 2018; Navarro et al., 2004). En el otro extremo se encuentran las células sanguíneas y las células inmunes, que se caracterizan por bajos o nulos niveles de Apo D (Sanchez & Ganfornina, 2021).

3.1 La Apolipoproteína D como proteína multiligando y multifunción

Desde un punto de vista estructural, la Apo D es una glicoproteína globular monodominio con dos enlaces disulfuro intramoleculares, lo que la capacita para actuar en medios extracelulares (Sanchez & Ganfornina, 2021). Está compuesta por 8 láminas β antiparalelas dispuestas en forma de barril flanqueado por una hélice α . Uno de los extremos del barril está abierto en forma de copa o cáliz y posee algunos residuos hidrofóbicos, además de otros residuos de gran relevancia en las propiedades antioxidantes que se le otorgan a la Apo D, como se detallará más adelante (Figura 5). Probablemente, esta zona se encargue de la interacción de la proteína con las membranas celulares o con la fase lipídica de las HDL. Su otro extremo forma una especie de pico que podría estar implicado en la interacción con un receptor celular aún desconocido (Eichinger et al., 2007; Sanchez & Ganfornina, 2021). La cavidad central de la Apo D también presenta residuos hidrofóbicos y funciona como sitio de unión para numerosas moléculas (Eichinger et al., 2007; Weech et al., 1991). Además, esta apolipoproteína puede formar homodímeros o heterodímeros mediante el establecimiento de puentes disulfuro intermoleculares (Bhatia et al., 2013; Yang et al., 1994). De hecho, recientemente, se ha descrito que la Apo D es capaz incluso de formar tetrámeros en el fluido quístico de mama (Kielkopf et al., 2021; Oakley, et al., 2018).

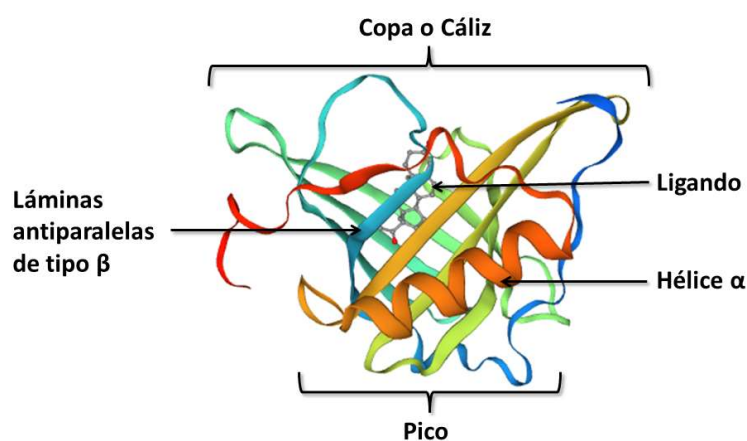


Figura 5. Estructura cristalina de la Apolipoproteína D humana, en cuyo centro de unión se encuentra una molécula de progesterona (Imagen creada con SWISS-MODEL Interactive Workspace).

Debido a su carácter multiligando y su ubicua localización, la Apo D también es considerada una proteína multifuncional. Así, participa en la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, mediando procesos como la angiogénesis (Lai et al., 2017), la osteogénesis (R. H. Yu et al., 2020), la neuritogénesis, o la sinaptogénesis (Kosacka et al., 2009). También interviene en la regulación del metabolismo lipídico y de los carbohidratos (Perdomo et al., 2010), así como en el mantenimiento de los niveles plasmáticos de colesterol (Ali et al., 2014). En este sentido, existen evidencias de que la Apo D regula indirectamente el tráfico de lípidos al influir en la dinámica de las lipopartículas HDL y lipoproteínas de baja densidad (LDL, de sus siglas en inglés *low density lipoprotein*) (Desmarais et al., 2019). De hecho, niveles elevados de Apo D se han relacionado con una mejor salud metabólica y un mejor estado inflamatorio en mujeres con obesidad mórbida (Fyfe-Desmarais et al., 2023). Pero sin duda, una de sus funciones más importantes tiene que ver con el mantenimiento del equilibrio entre las reacciones de reducción y oxidación (REDOX), tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La Apo D, según todos los estudios, formaría parte del mecanismo de defensa celular frente al daño oxidativo, con un papel clave en la recuperación del tejido lesionado/infartado (Martineau et al., 2016; Tsukamoto et al., 2013). A nivel del SN, la Apo D ejercería una importante función neuroprotectora frente al estrés oxidativo generado en procesos senescentes o neurodegenerativos (Fyfe-Desmarais et al., 2023; He et al., 2009; Martínez-Pinilla et al., 2015; Najyb et al., 2017).

3.2 Regulación de la expresión de la Apolipoproteína D

A lo largo de los últimos años, el estudio en profundidad del promotor del gen de la Apo D ha revelado que éste contiene algunos elementos de respuesta a estrés celular, así como un fragmento rico en purinas y pirimidinas implicado en la respuesta a la detención del crecimiento (Do Carmo et al., 2002; Lambert et al., 1993). Además, presenta elementos de respuesta a estrógenos, progesterona, glucocorticoides, ácidos grasos, y sitios de unión para el factor nuclear kappa β , que interviene en la señalización celular frente a estímulos como la inflamación o la radiación ultravioleta (Do Carmo et al., 2002, 2007). En esta línea, varios grupos de investigación han demostrado que la detención del crecimiento celular y la senescencia en cultivos celulares de fibroblastos murinos, frecuentemente causadas por la exposición a condiciones de estrés oxidativo e inflamación, estarían relacionadas con un incremento en los niveles celulares de la Apo D (Lambert et al., 1993). Levros y colaboradores, (2010) observaron que los factores nucleares PARP-1 y APEX, que se sobreexpresan en células no proliferantes, pueden unirse al promotor de la Apo D e inducir su síntesis (Levros et al., 2010). De la misma manera, se ha comprobado que la expresión de la Apo D guarda una relación inversa con el crecimiento celular (Do Carmo et al., 2002). Estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama han constatado que la expresión de esta apolipoproteína es inhibida en presencia de estrógenos (inductores del crecimiento celular) y, sin embargo, estimulada por andrógenos u otras moléculas inhibitoras de la proliferación celular, como el ácido retinoico o la interleucina-1 α (Blais et al., 1994; López-Boado et al., 1994; Simard et al., 1990, 1991). No obstante, también se ha observado que la 1,25-dihidroxivitamina D3 (López-Boado et al., 1994) o el ácido retinoico (Blais et al., 1994), además de frenar la proliferación celular y la expresión de la Apo D, inducen la diferenciación celular (Rassart et al., 2020).

3.3 Localización y expresión de la Apolipoproteína D en el sistema nervioso

Los avances realizados en el campo de la biología celular y molecular y, más concretamente, en técnicas como la inmunohistoquímica o la hibridación *in situ*, han permitido determinar en qué zonas y células se expresa la Apo D a nivel del SN, así como las funciones que lleva a cabo esta proteína tanto en situaciones fisiológicas como patológicas.

Durante el desarrollo embrionario, la Apo D ha sido detectada a nivel proteico y transcripcional en pericitos y células endoteliales durante la formación de la BHE murina (Sánchez et al., 2002). También está presente en las células mielinizantes, OLGs en el SNC y células de Schwann en el SNP, donde participa en la correcta formación de las vainas de mielina (García-Mateo et al., 2018).

En condiciones fisiológicas, se han observado cantidades elevadas de Apo D tanto en el SNC como en el SNP de especies de mamíferos como el conejo (Provost et al., 1990), la rata (Boyles et al., 1990), el ratón (Li et al., 2016), y el mono Rhesus (Smith et al., 1990). Dentro del SNC humano, la Apo D ha sido detectada en el LCR (Koch et al., 2001), así como en las sustancias blanca y gris de la corteza cerebral, el tronco encefálico, el hipocampo o el cerebelo, aunque en este último en menor cantidad (Navarro et al., 2004). A nivel celular, la expresión de esta proteína ha sido descrita principalmente en células gliales, como OLGs y astrocitos, además de en células piales, pericitos, células perivasculares y en menor medida en neuronas (Ganfornina et al., 2010; Hu et al., 2001; Navarro-Incio & Tolivia-Fernández, 2004). La presencia de la Apo D en los pericitos y en las células perivasculares del SNC está relacionada con una de sus principales funciones, el transporte de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de la BHE (Hu et al., 2001). En este punto también se incluye el transporte de hormonas esteroideas de manera local, las cuales participan en la formación de las conexiones sinápticas (Navarro et al., 2004). En el SNP humano, la presencia de Apo D se restringe a las fibras nerviosas, donde es sintetizada por células de Schwann y fibroblastos (Elliott et al., 2010; Ganfornina et al., 2010; García-Mateo et al., 2014).

Estudios recientes centrados en la localización subcelular de la Apo D, han detectado la presencia de esta proteína a nivel del retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi, endosomas, lisosomas, autofagosomas, cuerpos multivesiculares, así como en la membrana plasmática celular o en vesículas recubiertas de clatrina y caveolina, mediante técnicas de inmunomarcaje para microscopía electrónica (*Immunogold-EM*) o inmunofluorescencia (Pascua-Maestro et al., 2017, 2019). De manera interesante, la Apo D aparece en los lisosomas de astrocitos, OLGs, células de Schwann, fibroblastos y neuronas donde desempeña un papel clave en control del metabolismo lipídico y estrés oxidativo (Pascua-Maestro et al., 2017, 2019). Por el contrario, esta proteína está ausente en mitocondrias, peroxisomas, y en el interior del núcleo celular (Bajo-Grañeras et al., 2011a; Martínez-Pinilla et al., 2015; Pascua-Maestro et al., 2017).

En el contexto celular descrito, la Apo D modula funciones de vital importancia en el SN como la neurotransmisión (Kosacka et al., 2009), la homeostasis celular y las reacciones REDOX (Pascua-Maestro et al., 2019), así como la formación y mantenimiento de las vainas de mielina (García-Mateo et al., 2018; Navarro et al., 2018). Es también un hecho que la Apo D forma parte de un sistema de defensa del organismo contra el estrés oxidativo e inflamatorio que se produce durante el envejecimiento (Dassati et al., 2014; Navarro et al., 2010). De hecho, se ha descrito un incremento de la expresión de la Apo D en células gliales y neuronales durante el envejecimiento cerebral (Navarro et al., 2010). Evidencias científicas recientes también han demostrado que esta apolipoproteína juega un papel clave en condiciones patológicas del SN, donde ejercería una importante función protectora frente al daño neuronal (He et al., 2009; Martínez-Pinilla et al., 2015), limitaría la dimensión y duración de la reacción inflamatoria en regiones del SNC como el hipocampo o el córtex cerebral (Bajo-Grañeras et al., 2011b; Najyb et al., 2017), y facilitaría el proceso de remielinización tanto en el SNC como en el SNP (García-Mateo et al., 2018).

3.4 Papel de la Apolipoproteína D en el sistema nervioso

A pesar de su amplia distribución en el organismo, el papel de la Apo D en el SN ha sido el más estudiado hasta el momento. Esto se debe a que los niveles de esta proteína son mucho más elevados en el cerebro humano que en otros órganos, donde, además, desempeña funciones de gran relevancia ya desde el desarrollo embrionario (Li et al., 2016).

3.4.1 *La Apolipoproteína D en la modulación de la neurotransmisión*

Durante el desarrollo cerebral postnatal existe una demanda sustancial de lípidos, no sólo para la correcta mielinización, sino también en relación con el mantenimiento de la plasticidad sináptica y la regulación de la expresión génica (Dietschy & Turley, 2004; Herz & Chen, 2006; McCarthy, 2008). Es precisamente en esta etapa donde se ha demostrado un aumento significativo de la expresión de la Apo D a nivel del córtex prefrontal humano (W. S. Kim et al., 2009). Además, el análisis de la expresión génica en cerebros de ratones *knock out* (KO) para la Apo D o de aquellos que sobreexpresan la Apo D humana (hApo D), reveló una conexión entre esta proteína y genes relacionados con la transmisión sináptica. En concreto, la variación de los niveles de Apo D se ha asociado con alteraciones en la neurotransmisión del glutamato (Bajo-Grañeras et al., 2011b; Najyb et al., 2017), la somatostatina (Kumar, 2012), la dopamina (Bajo-Grañeras et al., 2011b) y la acetilcolina (Boer et al., 2010), afectando a la función motora así como al aprendizaje espacial (Bajo-Grañeras et al., 2011a; Bajo-Grañeras et al., 2011b; Boer et al., 2010; Najyb et al., 2017), e incluso a la función retinal (El-Darzi et al., 2021).

3.4.2 La Apolipoproteína D en el estrés oxidativo del sistema nervioso

El cerebro es el órgano con más cantidad de lípidos, y éstos son la principal diana de las ERO, por lo que resulta un tejido muy susceptible a la peroxidación lipídica (Hulbert et al., 2007). Dicha susceptibilidad se intensifica durante el envejecimiento (Hajam et al., 2022) y en determinadas situaciones patológicas, como la EA (Bai et al., 2022), la esquizofrenia (Ermakov et al., 2021) o el síndrome bipolar (Young & Juruena, 2021), principalmente debido a un sistema antioxidante ineficiente que no es capaz de restablecer el equilibrio de las reacciones REDOX (Amor et al., 2010). En las últimas décadas se ha observado que los niveles celulares de la Apo D cambian en respuesta a fenómenos de estrés oxidativo, ya sean naturales o inducidos de manera experimental.

Por un lado, estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de la Apo D es inducida de una forma dosis y tiempo dependiente tras la exposición a diferentes agentes que provocan estrés oxidativo como la radiación ultravioleta (Do Carmo et al., 2007), el péptido β -amiloide (Martínez et al., 2012), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Martínez et al., 2013), el ácido kaínico (He et al., 2009), o el paraquat (Bajo-Grañeras et al., 2011b). Esta inducción parece ser específica, ya que cuando las células se someten a frío, calor o condiciones hiper/hipo osmóticas los niveles de la Apo D se mantienen dentro de los límites fisiológicos (Do Carmo et al., 2007).

Por otro lado, varios estudios *in vivo* en roedores han confirmado la presencia de la Apo D, e incluso un incremento de su expresión, tanto en neuronas como células gliales a nivel del hipocampo y corteza cerebral en situaciones de alto estrés oxidativo, como las provocadas por la inyección de ácido kaínico (Ong et al., 1997) o una lesión cerebral traumática (Franz et al., 1999; Terrisse et al., 1999). Otro ejemplo es el descrito por Ganfornina y colaboradores (2008), los cuales observaron que los ratones KO para la Apo D mostraban una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y unos mayores niveles de peroxidación lipídica cerebral en comparación con los animales silvestres, lo cual afectaba a su capacidad locomotora y a sus procesos de aprendizaje. Por el contrario, si se sobreexpresaba la versión humana de esta proteína en el cerebro murino, se incrementaba la resistencia al estrés oxidativo, se reducían los niveles de lípidos peroxidados y aumentaba la supervivencia del animal en términos generales (Ganfornina et al., 2008). Estudios más recientes como los de Najyb y colaboradores (2017) coinciden con lo descrito hasta el momento, confirmando que la sobreexpresión neuronal de la hApo D protege a los ratones frente a los efectos citotóxicos del ácido kaínico; además, se observa un incremento en la internalización de la Apo D por parte de las neuronas. En este caso, el efecto neuroprotector de la Apo D estaría relacionado con su capacidad para regular la distribución del colesterol neuronal, limitando su disponibilidad para reacciones de peroxidación lipídica perjudiciales (Najyb et al., 2017). También con la estabilización o "secuestro" del AA, en su forma libre, evitando que este ácido graso sea transformado en moléculas proinflamatorias u oxidado para dar lugar a compuestos tóxicos (Desmarais et al., 2019; Fyfe-Desmarais et al., 2023; Thomas et al., 2003b). Un estudio pionero de Pascua-Maestro y colaboradores (2017) demostró la implicación de la Apo D en el mantenimiento del pH lisosomal, el cual se encuentra alterado en condiciones patológicas como las descritas la EA, el PD o el

Huntington (Colacurcio & Nixon, 2016; Mazzulli et al., 2011; Stoka et al., 2016). Según estos autores, la Apo D es sobreexpresada y secretada por los astrocitos y los OLGs en vesículas extracelulares al tejido nervioso, en presencia de un agente inductor de estrés oxidativo como el paraquat, desde donde es captada mediante endocitosis por las neuronas. Una vez en el interior neuronal, la Apo D se dirige a los lisosomas afectados, donde todo parece indicar que media la recuperación funcional de estos orgánulos (Pascua-Maestro et al., 2017, 2019). De todas maneras, aún quedan muchas dudas por aclarar respecto al mecanismo de acción por el que la Apo D ejerce su función protectora frente al estrés oxidativo. Una de ellas es la forma de entrada de esta apolipoproteína al interior celular. En este sentido, algunos autores proponen la existencia de un receptor de membrana para la Apo D, la glicoproteína transmembrana basigina (Najyb et al., 2015).

Tampoco hay que olvidar que la Apo D puede ejercer un efecto antioxidante *per se* gracias a sus propiedades antioxidantes intrínsecas. La presencia de un residuo de metionina altamente conservado (Met₉₃) en su estructura inhibiría la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos en radicales peroxilo y alcoxilo, altamente tóxicos para las células e implicados en la patogenia de múltiples enfermedades (Oakley et al., 2012). De manera interesante, se ha comprobado que el contacto con lípidos oxidados promueve la dimerización y, posterior, oligomerización de la hApo D (Sanchez & Ganfornina, 2021).

3.4.3 La Apolipoproteína D en la neuroinflamación

La inflamación se define como una reacción sistémica consecuencia de un daño, trauma, o infección en un tejido, en este caso en el tejido nervioso, frente a la que se activan procesos de reparación celular en los cuales la Apo D parece ejercer un papel muy importante (Do Carmo et al., 2007).

Estudios realizados en un modelo murino de encefalitis inducida por el coronavirus humano OC-43 han demostrado una sobreexpresión de la Apo D a nivel de corteza cerebral e hipocampo que parece estar directamente relacionada con una reducción de la infiltración de linfocitos T en el SNC, con una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y, por tanto, con una limitación del proceso inflamatorio (Do Carmo et al., 2008). Al mismo tiempo, otros autores comprobaron que el aumento de los niveles de la Apo D en las neuronas piramidales y en los OLGs de ratas sometidas a un infarto cerebral experimental estaría inducido por la presencia de mediadores inflamatorios como las interleucinas liberadas por la microglía/macrófagos y los astrocitos de la zona afectada (Rickhag et al., 2008). En este caso, la Apo D favorecería el tráfico de lípidos como el colesterol, en la periferia de la lesión, lo cual es crucial para la recuperación de la zona infartada y el restablecimiento de las funciones sensorio-motoras de los animales (Rickhag et al., 2008). Resultados similares se han obtenido en ratas a las que se induce una lesión del nervio ciático. En este caso, la Apo D es capaz de controlar la magnitud y la duración de la respuesta inflamatoria, en particular la extensión de la infiltración de macrófagos y la velocidad con la que se elimina la mielina dañada, dando lugar a un entorno favorable para una regeneración y remielinización

axonal adecuada (Ganfornina et al., 2010). La evidencia de que Apo D es un mediador antiinflamatorio directo es menos clara que la de sus propiedades oxidantes, pero se ha especulado que, al actuar como antioxidante, Apo D podría disminuir la inflamación inducida por ERO. Sin embargo, Apo D también podría actuar como agente antiinflamatorio modulando otras vías, en particular la vía metabólica AA. Tal como se muestra en la Figura 6, la Apo D altera el procesamiento de los productos del metabolismo enzimático del AA disminuyendo la actividad de PLA2, aumentando el nivel de moléculas antiinflamatorias (efecto antiinflamatorio indirecto) y reduciendo estos productos enzimáticos a moléculas no reactivas a través de su residuo Met93 (efecto antiinflamatorio directo). Por otro lado, el AA puede metabolizarse de forma no enzimática a través de reacciones de peroxidación lipídica o diversas especies reactivas para generar productos de oxidación citotóxicos como 4-hidroxinonanal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). En este caso, la ApoD también puede reducir los productos del estrés oxidativo disminuyendo la peroxidación lipídica del AA secuestrándolo directamente (Fyfe-Desmarais et al., 2023).

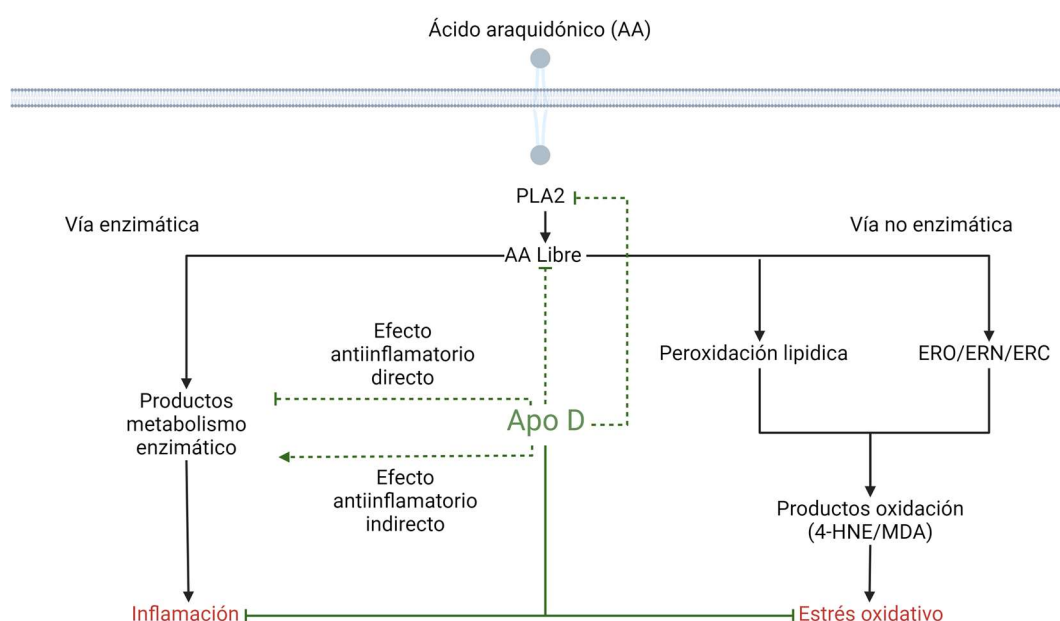


Figura 6. Efecto de la Apo D sobre la inflamación y el estrés oxidativo relacionados con el metabolismo del ácido araquidónico. Las líneas verdes discontinuas muestran un mecanismo de acción que tiene un efecto positivo sobre la inflamación (reduciéndola) o el estrés oxidativo (disminuyendo los niveles de especies reactivas). AA: Ácido araquidónico; ERC: Especies reactivas de carbono; ERN: Especies reactivas de nitrógeno; ERO: Especies reactivas de oxígeno; 4-HNE: 4-hidroxinonanal; Imagen modificada a partir de Fyfe-Desmarais et al., 2023.

3.4.4 La Apolipoproteína D en la homeostasis lipídica

La capacidad de la Apo D para la unión y/o el transporte de lípidos como el colesterol y el AA, la convierte en una proteína relevante en la modulación de la composición de las membranas celulares y, por tanto, en el mantenimiento de la homeostasis y la viabilidad celular en condiciones fisiológicas (Navarro et al., 2004). En

concreto, la expresión de la Apo D en los OLGs maduros y OPCs se relaciona con el desarrollo y maduración del SN durante la embriogénesis, pero también en el cerebro adulto (Ganfornina et al., 2010).

A nivel del SNP, se ha comprobado que la Apo D participa en el mantenimiento de la vaina de mielina y la homeostasis de las membranas axonales. En un estudio realizado por Ganfornina y colaboradores (2010), se observó que los ratones KO para la Apo D mostraban alteraciones en las propiedades conductoras del nervio ciático así como cambios específicos en el transcriptoma y el proteoma, semejantes a los descritos en ratones silvestres con un daño nervioso periférico (Ganfornina et al., 2010). En una investigación más reciente, García Mateo y colaboradores (2018) describen de forma más detallada la función de la Apo D en el proceso de mielinización y en el mantenimiento de las vainas de mielina desde la etapa postnatal hasta la etapa adulta, encontrando un aumento significativo de la expresión de esta apolipoproteína durante la fase final de compactación de la mielina, tanto en el SNC como SNP. De hecho, constatan que la falta de la Apo D en ratones KO para la misma, altera específicamente esta fase terminal, viéndose afectadas la velocidad de conducción axonal y la función cognitiva de los animales; además, la ausencia de la Apo D provocaría una expresión deficiente de las proteínas mielínicas que contribuyen al proceso de compactación de la lámina extracelular de la mielina (García-Mateo et al., 2018).

3.4.5 La Apolipoproteína D en la desmielinización y remielinización

La implicación de la Apo D en los procesos de des/remielinización que tienen lugar a nivel del SNC y SNP, tanto en condiciones normales como patológicas, es un hecho probado desde hace décadas (Boyles et al., 1990; Franz et al., 1999; Provost et al., 1990; Terrisse et al., 1999). Así, la Apo D no sólo es crucial para una correcta mielinización (García-Mateo et al., 2018), sino que se ha observado un aumento de los niveles de esta proteína en las células de Schwann y macrófagos durante la regeneración axonal posterior a un daño en el nervio ciático de rata (Boyles et al., 1990; Ganfornina et al., 2010; García-Mateo et al., 2014; Spreyer et al., 1990). Durante este proceso, la Apo D contribuye a la recuperación de la función de los axones gracias a la retirada de lípidos durante la degeneración nerviosa y la provisión de éstos durante la fase regenerativa (Ganfornina et al., 2010). En este sentido, cuando el daño se infringe en el nervio ciático de ratones KO para Apo D se observa un mayor número de macrófagos en la zona lesionada y una respuesta inflamatoria que se mantiene durante más tiempo, en comparación con ratones silvestres en la misma situación. Todo indica que la ausencia de la Apo D dificulta la retirada de restos de mielina, y supone un retraso en la regeneración axonal y la remielinización tras la lesión (García-Mateo et al., 2014).

De forma similar a lo que ocurre en el SNP, varios autores han descrito una inducción de la expresión de la Apo D en OLGs y astrocitos de ratas sometidas a daños localizados a nivel de hipocampo y cerebelo mediante una inyección de ácido kaínico y paraquat (Bajo-Grañeras et al., 2011b; Montpied et al., 1999; Ong et al., 1997). Estos estudios revelan que tras el daño, la presencia de la Apo D modula la activación de genes relacionados con la

respuesta al estrés oxidativo y la mielinización (Bajo-Grañeras et al., 2011b). Además, la expresión y secreción de la Apo D por parte de astrocitos reactivos durante el envejecimiento cerebral puede ser importante en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol en la reinervación, así como en la regeneración axonal y mielínica (del Valle et al., 2003).

Todas estas observaciones apuntan hacia una clara implicación de la Apo D en procesos relacionados con la dinámica de la mielina, los cuales son de especial importancia en enfermedades neurodegenerativas como la EM y otras patologías desmielinizantes.

3.5 Papel de la Apolipoproteína D en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas

En base al papel antioxidante y antiinflamatorio que desempeña la Apo D en el SN en las situaciones anteriormente descritas, se ha postulado que esta apolipoproteína forma parte de la maquinaria de defensa celular frente al estrés oxidativo y la inflamación, con una clara función neuroprotectora. No es de extrañar, por tanto, que los niveles de la Apo D se incrementen de manera significativa en el SNC durante el envejecimiento (Navarro et al., 2010; Yang et al., 2005) así como en diversas enfermedades neurodegenerativas y neurológicas como la EA, la EP, o la esquizofrenia (Bajo-Grañeras et al., 2011a; Dassati et al., 2014).

El envejecimiento cerebral es el mayor factor de riesgo para el deterioro cognitivo y los trastornos neurodegenerativos (Dassati et al., 2014). Se ha constatado un aumento significativo del número de células positivas para Apo D, principalmente astrocitos y neuronas piramidales, así como de la cantidad de ARNm en el córtex e hipocampo del cerebro humano envejecido (Kalman et al., 2000; Kim et al., 2009; Martínez et al., 2013; Navarro et al., 2010). Este efecto no sólo se observa en humanos; en un análisis comparativo de los cambios de transcripción durante el envejecimiento cerebral entre especies, la Apo D resultó ser el gen con mayor sobreexpresión en primates y roedores (de Magalhães et al., 2009; Loerch et al., 2008). Es más, la sobreexpresión de la Apo D humana o de algunos de sus ortólogos en la mosca *Drosophila melanogaster* supone un aumento de la resistencia al estrés oxidativo, una reducción de la peroxidación lipídica asociada al envejecimiento y una clara prolongación de la esperanza de vida (Muffat et al., 2008; Ruiz et al., 2012; Walker et al., 2006). Por el contrario, se ha descrito que la pérdida de la función de la Apo D en estos insectos aumenta la peroxidación lipídica y la sensibilidad al estrés oxidativo, y disminuye la esperanza de vida (Sanchez et al., 2006). Resultados similares se han obtenido en el modelo murino, en el que la sobreexpresión cerebral del gen de la Apo D humana aumenta la supervivencia al estrés oxidativo y disminuye la peroxidación lipídica (Ganfornina et al., 2008). Sin embargo, se ha observado el efecto contrario en la corteza y el hipocampo de roedores KO para la Apo D, además de una disminución del número de neuronas a nivel de corteza cerebral, envejecimiento prematuro, hiperquinesia y déficits de memoria (Ganfornina et al., 2008; Sanchez et al., 2015).

En humanos también se ha constatado un aumento significativo del número de células positivas para la Apo D, principalmente astrocitos y neuronas piramidales, en la corteza cerebral e hipocampo de cerebros envejecidos (Kalman et al., 2000; Kim et al., 2009; Martínez et al., 2013; Navarro et al., 2010). De hecho, se ha establecido una conexión entre el género y la expresión de la Apo D en el hipocampo y en las cortezas entorrinal y frontal humanas con la edad; la expresión de la Apo D aumenta en mayor proporción en las mujeres que en los hombres (Ordóñez et al., 2012).

En cuanto a las enfermedades neurodegenerativas, se han encontrado niveles elevados de la Apo D en el LCR, el hipocampo y la corteza cerebral tanto en humanos como en el modelo animal de EA (Desai et al., 2005; Li et al., 2015). De forma específica, el incremento de la Apo D se concentra en los astrocitos (Bhatia et al., 2013) y neuronas (Belloir et al., 2001; Kalman et al., 2000), así como en algunas marcas histopatológicas características de la enfermedad como son los depósitos del péptido β -amiloide en los vasos sanguíneos y las placas seniles (del Valle et al., 2003; Desai et al., 2005; Navarro et al., 2001, 2003). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación en células hipocampales, demostraron que el péptido β -amiloide es capaz de inducir la expresión de la Apo D (Martínez et al., 2013); ésta actuaría como un protector contra la citotoxicidad inducida por el péptido, tal como se ha observado, también, con el homólogo de la Apo D en *Drosophila melanogaster* (Muffat et al., 2008). De manera interesante, los modelos murinos de EA que, a su vez, son KO para la Apo D presentan el doble de carga de β -amiloide en el hipocampo lo que, de nuevo, sugiere el papel antioxidante y neuroprotector de la apolipoproteína (Bhatia et al., 2019; Li et al., 2015). Como se ha mencionado anteriormente, la Apo D reduciría los hidroperóxidos lipídicos a hidróxidos lipídicos a través de un residuo de metionina altamente conservado (Met⁹³) (Bhatia et al., 2012). Esta reacción da lugar a la dimerización de la Apo D debido a la desestabilización estructural causada por la formación de sulfóxido de metionina (MetSO), tal y como sugieren los estudios de dinámica molecular (Oakley et al., 2012). Aunque el MetSO suele reducirse de nuevo por las MetSO reductasas, se ha detectado una disminución sustancial de esta actividad enzimática en el cerebro de pacientes de EA, razón por la cual la Apo D se ha detectado predominantemente en forma de un complejo dimerizado en estos enfermos (Bhatia et al., 2012, 2013).

En el caso de la EP, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra son la principal diana de las ERO, lo que produce un incremento de la peroxidación lipídica asociada al metabolismo del AA y el daño del ADN de estas células. A esto hay que añadir un sistema de defensa antioxidante alterado (Fyfe-Desmarais et al., 2023; Simon et al., 2020). Aunque el número de células gliales inmunorreactivas para la Apo D en la sustancia negra aumenta durante la EP, (del Valle et al., 2003), las neuronas no parecen ser capaces de captarla. Ante la posibilidad de que exista una alteración del tráfico de Apo D entre la glía y las neuronas en la sustancia negra, la acción de la Apo D se limitaría a las regiones gliales circundantes, donde podría estar limitando la liberación y metabolismo del AA, actuando como antioxidante (Ordóñez et al., 2006; Waldner et al., 2018).

INTRODUCCIÓN

Aunque menos estudiado, el incremento de la Apo D también ha sido descrito en otras neuropatologías como en el trastorno genético de carácter neurodegenerativo de Niemann-Pick, que afecta al transporte celular lipídico (Pascua-Maestro et al., 2020), la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y el síndrome de Guillain-Barré (Reindl et al., 2001). Por otro lado, el aumento de la expresión de la Apo D en trastornos psiquiátricos como el síndrome bipolar (Thomas et al., 2003a), la esquizofrenia (Thomas et al., 2001b), el trastorno depresivo grave (Xu et al., 2012) o el trastorno del espectro autista (Edlow et al., 2014) hace que esta proteína haya sido postulada como un posible biomarcador para su diagnóstico. En este contexto, cabe destacar una conexión interesante entre la Apo D y la clozapina (CLO), un antipsicótico atípico que parece ser efectivo en el tratamiento agudo y a largo plazo de pacientes con síndrome bipolar y esquizofrenia (Ciapparelli et al., 2000). Algunos trabajos han demostrado un incremento de la cantidad neuronal de Apo D, tanto a nivel transcripcional como de expresión, en ratones tratados de manera continuada con CLO durante dos semanas (Thomas et al., 2001a). Ya que una de las causas de estos trastornos es la deficiencia de AA, componente principal de la membrana plasmática, como consecuencia de la alteración del metabolismo lipídico se ha postulado que la Apo D podría estar detrás de los efectos antipsicóticos de la CLO. En este contexto, la Apo D se uniría específicamente al AA de las membranas celulares evitando su peroxidación, y modulando la señalización y el metabolismo de los lípidos de forma beneficiosa (Thomas et al., 2003b; Thomas & Yao, 2007). Es interesante destacar que dichas patologías, tanto de tipo neurodegenerativo como psiquiátrico, comparten algunas características como un alto estrés oxidativo, peroxidación lipídica, excitotoxicidad, alteración de la mielina, desequilibrio del colesterol y fenómenos apoptóticos. Una vez iniciados, estos procesos se expanden en forma de reacción en cadena donde la Apo D parece desempeñar un papel neuroprotector fundamental, bien acelerando la eliminación de subproductos dañinos o bien impidiendo directamente su formación (del Valle et al., 2023; Muffat et al., 2008).

A pesar de los estudios llevados a cabo en otras enfermedades neurodegenerativas, poco se sabe de la implicación de la Apo D en la EM. Hasta el momento, se ha demostrado la presencia de esta apolipoproteína en el LCR y el suero sanguíneo de pacientes aquejados de EM en unos niveles significativamente mayores a los encontrados en pacientes de otras enfermedades de tipo neurodegenerativo (Reindl et al., 2001; Stoop et al., 2010). La procedencia de la Apo D en estas situaciones no está muy clara pudiendo tener un origen externo al SN, consecuencia de la disrupción de la BHE, o interno, debido a un incremento de la producción local (Navarro-Incio & Tolivia-Fernández, 2004). Independientemente de su origen, esta mayor cantidad se observa principalmente en fases tempranas de la EM en las que la Apo D participaría como una proteína de fase aguda (Reindl et al., 2001). Estudios previos de nuestro grupo de investigación, centrados en la caracterización inmunohistoquímica de la Apo D en lesiones desmielinizantes de pacientes con EM, revelan una clara disminución de la expresión de ésta tanto en las placas escleróticas activas como en las crónicas (Navarro et al., 2018). De forma interesante, se aprecia una recuperación en los niveles de la Apo D en las zonas de remielinización, lo que en conjunto parece indicar que esta proteína es clave en los procesos de des/remielinización.

Objetivos

En base a los conocimientos generados a lo largo de años de investigación, la Apo D sería clave en procesos tan importantes como la neurodegeneración y desmielinización cerebrales característicos de enfermedades neurodegenerativas como la EM. Sin embargo, aún se desconoce su mecanismo de acción, y su participación y contribución exacta en los mismos. Por ello, el objetivo general de esta tesis fue el de estudiar el papel de la Apo D en la EM, en concreto su implicación en la des/remielinización y su posible función como una molécula neuroprotectora, mediante el empleo de modelos in vitro e in vivo de la enfermedad. Como objetivos concretos se plantearon los siguientes:

Objetivo 1. Estudio del papel neuroprotector de la Apo D en un modelo celular de EM de citotoxicidad inducida por CPZ.

- Objetivo 1.1. Poner a punto un modelo celular de EM de citotoxicidad inducida por CPZ en dos líneas celulares, una de oligodendrocitos humanos (HOG) y otra de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), así como en el co-cultivo de ambas (SH-SY5Y/HOG).
- Objetivo 1.2. Caracterizar el efecto citotóxico de la CPZ en las células SH-SY5Y, HOG y co-cultivos SH-SY5Y/HOG, así como en un cultivo primario neuronal.
- Objetivo 1.3. Estudiar el patrón de expresión de la Apo D en las líneas celulares SH-SY5Y y HOG, en situaciones control y tras el tratamiento con diferentes concentraciones de CPZ.
- Objetivo 1.4. Analizar el posible papel neuroprotector de la Apo D en el modelo celular de citotoxicidad mediante la inducción de su expresión endógena con CLO o mediante su adición exógena.

Objetivo 2. Estudio del papel neuroprotector de la Apo D en un modelo animal de EM de citotoxicidad inducida por CPZ.

- Objetivo 2.1. Poner a punto un modelo murino de EM de citotoxicidad mediante el tratamiento de ratones de la cepa C57BL/6 con CPZ.
- Objetivo 2.2. Caracterizar los efectos del tratamiento con CPZ en los ratones a nivel del SNC, pero también a nivel conductual y sistémico.
- Objetivo 2.3. Estudiar la expresión de la Apo D en relación con los procesos de des/remielinización que tienen lugar en el modelo animal de EM inducida por CPZ.
- Objetivo 2.4. Estudiar la expresión de la Apo D en relación con los procesos de des/remielinización que tienen lugar en el modelo animal de EM inducida por CPZ tras el tratamiento con CLO.

Material y métodos

1 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN UN MODELO CELULAR DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

1.1 Líneas celulares

Para este estudio se utilizaron las líneas celulares detalladas a continuación:

- Línea celular HOG, establecida a partir de un oligodendroglioma humano extirpado quirúrgicamente por el Dr. A. T. Campagnoni (Universidad de California, UCLA, Berkeley, CA, EEUU) (Post & Dawson, 1992), que fue cedida amablemente por el Dr. J. A. López-Guerrero (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España) (Bello-Morales et al., 2014). Las células se cultivaron en medio *Eagle* modificado de *Dulbecco* (DMEM de sus siglas en inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*; 22320-022, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido), suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y estreptomina (17-602E, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido), y un 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, de sus siglas en inglés *fetal bovine serum*; 10270-106, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido).
- Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (94030304, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) cultivada en DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina (61965-059, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido), 100 unidades/ml de penicilina y estreptomina, un 1% de aminoácidos no esenciales (11140-035, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido), y un 10% (v/v) de FBS inactivado por calor.
- Línea celular de glioblastoma humano T-98 (CRL-1690, ATCC) cultivada en medio esencial mínimo de *Eagle* (EMEM, de sus siglas en inglés *Eagle's minimum essential medium*; 0050135SA, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y estreptomina, y un 10% (v/v) de FBS inactivado por calor.
- Línea de células microgliales de ratón N-9 (CVCL_0452, ATCC) cultivadas en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI; 61870010, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido) que contenía 100 unidades/ml de penicilina y estreptomina, y un 10% (v/v) de FBS inactivado por calor.

Todas las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y se procedió a su subcultivo al alcanzar una confluencia del 80-90%, es decir, aproximadamente dos veces por semana, durante no más de 20 pases. Los experimentos se realizaron siempre con células de los pases 3-15.

1.2 Co-cultivos celulares

Las células HOG y SH-SY5Y se co-cultivaron en una proporción de 2:1,5 en medio DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomina, un 1% de aminoácidos no esenciales, y un 10% (v/v) de FBS inactivado por calor. El cultivo mixto se creció a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ durante, al menos, 48 horas antes de realizar los tratamientos.

1.3 Cultivos primarios

Las neuronas corticales y las células de tejido adiposo blanco (WAT, de sus siglas en inglés *white adipose tissue*) se extrajeron de embriones de ratas *Sprague-Dawley*, se aislaron como describe Hradsky y colaboradores (2013), y se sembraron a una concentración de 40.000 células/0,32 cm² en una placa de 6 pocillos. A continuación, las células se crecieron durante 12 días en medio Neurobasal (21103049, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomycin, y un 2% (v/v) de suplemento B27 (17504044, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido). El manejo de los animales se realizó en todo momento de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo 2010/63/UE y con la legislación española vigente (RD53/2013). El diseño experimental fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona.

1.4 Purificación de la Apolipoproteína D humana

La Apo D humana (hApo D) se purificó a partir de muestras de fluido quístico de mama proporcionadas por la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). En primer lugar, se realizó un fraccionamiento celular mediante centrifugaciones diferenciales, a partir del cual se extrajo la fase intermedia en la que se encontraba el contenido proteico total. A continuación, se filtró la muestra descartando todas aquellas proteínas mayores de 100 kDa mediante la utilización de amicones *Amicon® Ultra-15*, 100 kDa (Z740211, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU). Una vez filtrada y lavada, la fase se pasó de manera consecutiva por dos columnas cromatográficas de intercambio iónico (*HiTrap® Q Fast Flow*, *GE Healthcare*, Chicago, IL, EEUU) con 25 mM Tris pH 8.

Las muestras obtenidas tras las cromatografías se analizaron mediante *western blot*. Para ello, las proteínas se separaron mediante electroforesis, en condiciones desnaturizantes, en un tampón SDS-PAGE (25 mM Tris base, 190 mM glicina, 0,5% SDS) en geles de acrilamida al 12% (1:30 bisacrilamida:acrilamida) a 100 V durante 2 horas. Previamente, los extractos proteicos se mezclaron con tampón de carga 4x (NP0007, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido) y DTT 10x (D9163, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU). A continuación, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF; *GE Healthcare*, Chicago, IL, EEUU) en tampón de transferencia (25 mM Tris-Base; 190 mM glicina; 20 % metanol) utilizando un sistema de transferencia húmeda (*Bio Rad Laboratories*), a 400 mA en el caso de ser dos membranas y 200 mA en el caso de una, durante 1 hora y 30 minutos. Una vez transferidas las proteínas, se verificó la eficiencia de la transferencia tiñendo los geles con azul de *Coomasie* [0,5% azul de *Coomasie* (161-0400, *Bio Rad Laboratories*); 50% metanol; 10% ácido acético] y las membranas con rojo *Ponceau* [*Ponceau S* (P3504, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) al 0,01% en ácido acético glacial 0,1%].

Para la inmunodetección de la Apo D, las membranas se bloquearon 1 hora en agitación y a temperatura ambiente en una solución de tampón salino con Tris y Tween 20 (TBS-T, de sus siglas en inglés *Tris buffer saline-Tween*, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) y leche desnatada en polvo al 2%. Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-hApo D [dilución 1:5.000, proporcionado por el doctor Carlos López-Otín del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo (Díez-Itza et al., 1994; Martínez-Pinilla et al., 2015; Navarro et al., 2004)] en TBS-T y leche desnatada en polvo al 2%, a 4°C y en agitación durante toda la noche. Tras este tiempo, se realizaron tres lavados con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (A0545, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) dilución 1:5.000 en TBS-T, durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación. Se realizaron de nuevo tres lavados con TBS-T y, finalmente, se llevó a cabo la inmunodetección mediante una reacción de quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL (34080, *Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate*, *Pierce*, Rockford, IL) y películas fotográficas *Amersham ECL hiperfilm* (*GE Healthcare*, Chicago, IL, EEUU).

Una vez identificada la fracción en la que se encontraba la apolipoproteína, ésta se concentró utilizando amicones *Amicon® Ultra-15* de 30kDa de tamaño de corte (Z717185, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU), eliminándose todas aquellas proteínas de menos de 30kDa, y se realizó una nueva cromatografía, en este caso de exclusión por tamaño molecular (*HiLoad® 16/60 Superdex® 200 prep grade*, *GE Healthcare*, Chicago, IL, EEUU), en 50 mM Tris pH 8, 75 mM NaCl. Nuevamente, las fracciones obtenidas se analizaron mediante *western blot* para comprobar la presencia de la hApo D (Figura 7), y se procedió a su cuantificación mediante el kit BCA (23227, *Pierce*, Rockford, IL), usando albúmina sérica bovina (BSA, de sus siglas en inglés *bovine serum albumin*) como estándar.

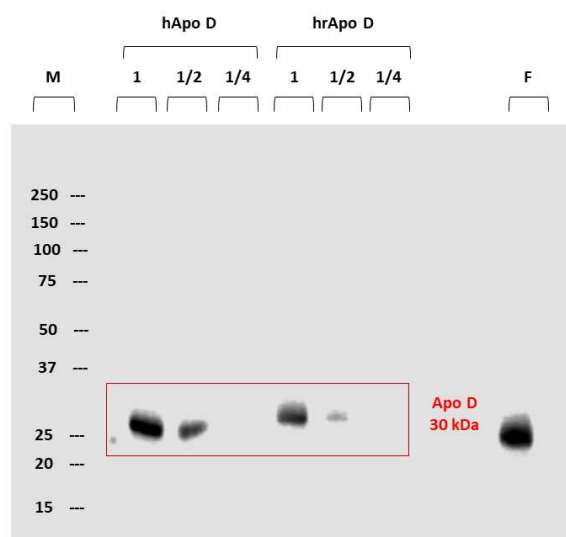


Figura 7. *Western blot* en el que se muestra la presencia de la hApo D en la fracción seleccionada de la cromatografía de exclusión por tamaño molecular (diluciones 1/2). Como control se utilizó una Apo D recombinante comercial de concentración conocida. hApo D: Apo D humana; hrApo D: Apo D humana recombinante; M: marcador de peso molecular; F: fluido quístico mamario.

En la Figura 8 se puede observar un esquema del protocolo llevado a cabo para purificar la hApo D a partir del fluido quístico mamario.

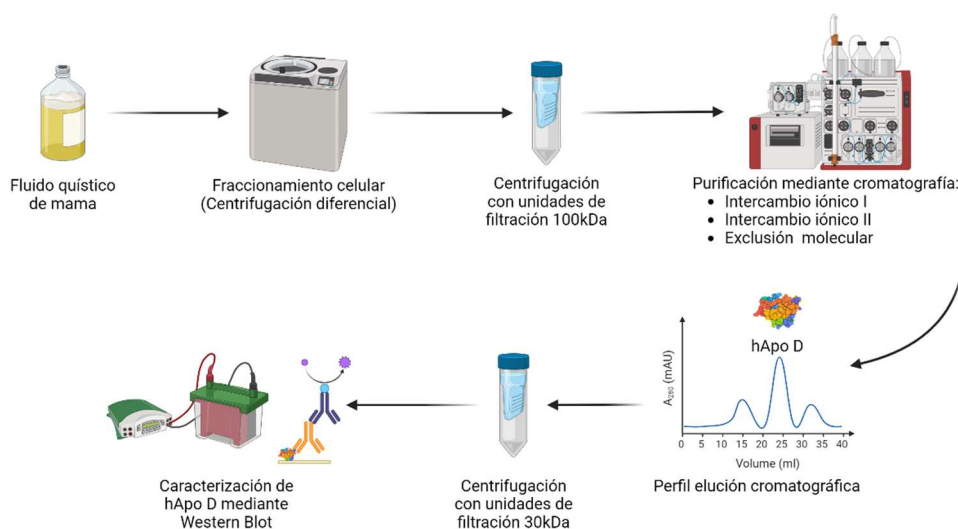


Figura 8. Esquema resumen del protocolo de purificación de la hApo D a partir de fluido quístico de mama. hApo D: Apo D humana. Elaboración propia con BioRender.com

Todos los procedimientos realizados con las muestras de fluido quístico de mama fueron aprobados por el "Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias (CEImPA)" y están de acuerdo con la Declaración de Helsinki, y con las leyes españolas "Ley de Investigaciones Biomédicas (ley 14/2007)", y "Ley de Protección de Datos Personales y Garantías de los Derechos Digitales (Ley Orgánica 3/2018)".

1.5 Tratamientos celulares

Para establecer el modelo de citotoxicidad, 24 horas después de la siembra, las células fueron tratadas con distintas concentraciones de CPZ (0,025-1,5 mM; ver pies de figuras) durante 24, 48 o 72 horas. La solución madre, 30 mM de CPZ (C9012, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU), se preparó el mismo día de la realización de los tratamientos en medio de cultivo y etanol puro (1:1) agitándose a 225 rpm y 60°C durante 15-20 minutos hasta su completa disolución. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo el *stock* de CPZ en el medio específico para cada tipo celular (diluciones seriadas).

El tratamiento de las células con el fármaco antipsicótico CLO (C6305, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) a distintas concentraciones (0,1 nM-5 nM; ver pies de figuras) se realizó 24 horas después de la siembra y 24 horas antes de añadir la CPZ, a partir de una solución madre 20 mM en tampón fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés *phosphate-buffered saline*; 5655, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU). Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo el *stock* de CLO en el medio específico para cada tipo celular (diluciones seriadas).

En el caso de la adición exógena de la Apo D, tanto la hApo D purificada de fluido quístico mamario como la Apo D humana recombinante comercial (hrApo D) (P05090, *Novoprotein*, Summit, NJ, EEUU), se añadieron a los cultivos a distintas concentraciones (0,05 nM-1.000 nM; ver pies de figuras) 24 horas antes de añadir el estímulo tóxico, a partir de una solución madre 4 mM. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo el *stock* de Apo D en el medio específico para cada tipo celular (diluciones seriadas).

Para los experimentos relativos al bloqueo de la endocitosis celular, las células fueron tratadas con citocalasina D (8 µg/ml; C2618, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU), clorhidrato de clorpromazina (5 µg/ml; C8138, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) y dinasore (80 µM; 324410, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU), durante 30 minutos antes de la adición de la hApo D. Las soluciones madre se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo el *stock* en el medio específico para cada tipo celular (diluciones seriadas).

Con el fin de demostrar que los resultados son sólo atribuibles a cada compuesto ensayado, se comprobó el efecto de todas las soluciones vehículo en los distintos modelos celulares (datos no mostrados). También se utilizó H₂O₂ 500 µM como control positivo en algunos ensayos experimentales (ver pies de figuras).

Como consideraciones generales, cabe destacar que en todos los casos se añadió el mismo volumen de medio, o de medio de disolución, a los pocillos. Además, las concentraciones utilizadas para cada uno de los compuestos así como los tiempos de tratamiento fueron seleccionados en función de estudios publicados anteriormente, entre ellos algunos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Bénardais et al., 2013a; Cammer, 1999; Martínez-Pinilla et al., 2015).

1.6 Ensayo de tasa de consumo de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno (OCR, de sus siglas en inglés *oxygen consumption rate*) se evaluó en microplacas sensibles a este elemento químico (*Oxoprobics Biosciences S. L.*, Madrid, España), tal y como se describe en Martínez-Pinilla y colaboradores (2019). Las placas llevan adherida una sonda que emite fluorescencia a medida que el oxígeno es consumido en la respiración celular. La señal de fluorescencia aumenta, por tanto, a medida que lo hace el metabolismo celular (Hynes et al., 2003). Para llevar a cabo esta técnica, las células se sembraron en placas de 96 pocillos sensibles al oxígeno (40.000 células/pocillo) y se incubaron durante 24 horas (40-50% de confluencia celular). Tras ello, se añadieron los tratamientos correspondientes (0,1-50 µM CPZ; ver pies de figuras). Para proteger los pocillos del oxígeno ambiental, éstos se sellaron añadiendo aceite mineral (100 µl/pocillo). Una vez concluidos los tratamientos, las placas se introdujeron en un lector de placas (*Envision, Perkin-Elmer*, Waltham, MA, EEUU), previamente atemperado a 37°C, y se monitorizó la señal de emisión de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 665 nm cada 70 µs durante 24-48 horas.

1.7 Ensayo de reducción del MTT

La viabilidad celular se estudió mediante el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; M5655, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) según se describe en Martínez-Pinilla et al. (2019). Este método se basa en la actividad de las oxidoreductasas mitocondriales dependientes de NADH como indicador del estado funcional de las mitocondrias. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (3.000-5.000 células/pocillo) en un volumen final de 100 μ l medio/pocillo y se incubaron durante 24 horas (40-50% de confluencia celular). A continuación, se añadieron los tratamientos correspondientes (0,025-1,5 mM CPZ; ver pies de figuras). Una vez concluidos éstos (24-48 horas) se añadieron 10 μ l de MTT a cada pocillo a partir de una solución madre (5 mg/ml en PBS), y se incubaron las placas a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. Tras ello, se añadieron 100 μ l de solución de lisis (20% de SDS, 50% de dimetilformamida, pH 4) por pocillo. Tras una noche de incubación se midió la absorbancia a 570 nm con un lector de microplacas (*μ Quant BIO-TEK INSTRUMENTS, INC*) y el software *KC junior*. Los valores de absorbancia de los pocillos "blanco", que sólo contenían medio, se restaron de los valores de los pocillos con células. La viabilidad se expresó como un porcentaje de reducción de MTT respecto al control.

1.8 Ensayo de mortalidad celular

La mortalidad celular se determinó con un ensayo de exclusión con azul tripán (T6146, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU), un colorante azul azoico que sólo penetra en las células con membranas dañadas. Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 30.000 células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo por pocillo. Las células se incubaron durante 24 horas (40-50% de confluencia celular), tras lo cual se añadieron los tratamientos correspondientes (0,1-1,5 mM CPZ; ver pies de figuras). Una vez concluidos éstos (24-48 horas), se recogieron las células por tripsinización, se lavaron en PBS frío, se centrifugaron a 200 G durante 5 minutos y se examinaron añadiendo un volumen equivalente de una solución de azul tripán al 0,4%. El número de células vivas (sin teñir) y muertas (teñidas de azul) se contó en una cámara de *Neubauer (Laboroptik, Arganda del Rey, Madrid, España)*, y el porcentaje de células viables se calculó como se describe en Martínez y colaboradores (2013). En total se incluyeron cuatro muestras por cada grupo experimental, y cada muestra se contó al menos tres veces. La mortalidad se expresó como el porcentaje de células vivas respecto al control.

1.9 Determinación de especies reactivas de oxígeno

El nivel intracelular de ERO se estimó utilizando una sonda de diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA; D399, *Molecular Probes, Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido), un compuesto no polar que penetra fácilmente en la célula, donde es hidrolizado por esterasas intracelulares a 2'7'-diclorodihidrofluoresceína no permeable. Este compuesto no fluorescente se oxida por la acción de diversas ERO a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que sí emite fluorescencia. Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 3.000-5.000 células/pocillo en placas de

96 pocillos en un volumen final de 100 μ l medio/pocillo de medio. Una vez finalizados los tratamientos (50-100 nM hApo D; ver pies de figura), se retiró el medio de cultivo y se añadió la sonda a una concentración final de 10 μ M en PBS. Tras incubar durante 60 minutos a 37°C se midió la fluorescencia en un fluorímetro de microplacas FLX-800 (*Bio-Tek Instruments Inc.*, Winooski, VT, EEUU), a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528 nm. La producción de ERO se expresó como el porcentaje de fluorescencia emitida respecto al control.

1.10 Inmunocitoquímica para la Apolipoproteína D

Para llevar a cabo la inmunocitoquímica se sembraron las células sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 10 mm de diámetro, previamente dispuestos en placas de 6 pocillos (4 cubreobjetos/pocillo), con 50.000 células/pocillo en un volumen final de 2 ml de medio. Una vez concluidos los tratamientos, las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en solución de *Bouin* durante 15 minutos. Tras la fijación, las células se volvieron a lavar tres veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% a temperatura ambiente durante 15 minutos. La unión inespecífica se bloqueó tratando los cubres con BSA (12659, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo anti-hApo D en dilución 1:2.000 durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados con PBS, los cubreobjetos se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo universal de caballo biotilado en dilución 1:50 (*Universal Quick*, PK- 8800, *Vector Laboratories, Inc.*, Burlingame, CA, EEUU). Tras los correspondientes lavados, las células se incubaron con un conjugado de Estreptavidina-Alexa Fluor® 550 en dilución 1:500 (S2138, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido), 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron en agua destilada, se deshidrataron, se aclararon en eucaliptol y se montaron con *NeoBio Mount Fluo* (NB-23-00158-1, *Neo-Biotech*, Nanterre, Francia).

Paralelamente, se realizaron ensayos de control negativo para garantizar la ausencia de marcaje y una posible amplificación inespecífica. En estas condiciones no se observó inmunotinción específica.

1.10.1 Cuantificación de la señal inmunocitoquímica

Una vez realizadas las pruebas inmunocitoquímicas se tomaron imágenes de las zonas de interés, 16 campos aleatorios por tratamiento, con el objetivo de 40 aumentos utilizando una cámara digital *Nikon DN100* acoplada a un microscopio *Nikon Eclipse E400* con el filtro de fluorescencia *Nikon G2-A* para rodamina. Las imágenes se adquirieron en las mismas condiciones de iluminación, ajustes de diafragma y condensador, tiempo de exposición y corrección de fondo.

Para la cuantificación de la señal inmunocitoquímica se utilizó una modificación del método desarrollado por nuestro grupo de investigación que combina el uso de los programas *Adobe Photoshop* (*Adobe Systems Inc.*,

CA, EEUU) e *ImageJ* para *Windows* (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, EEUU) (Tolivia et al., 2006). Los valores obtenidos fueron exportados a *GraphPad Prism 8* (San Diego, CA, EEUU) para realizar los cálculos pertinentes.

1.11 Extracción y purificación de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de placas 100 mm sembradas con 500.000 células/placa en un volumen final de 10 ml de medio por placa. Tras los correspondientes tratamientos, las células se recogieron utilizando rascadores, y el ARN total se aisló mediante *TRIzol* (15596018, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido). A continuación, el ARN se purificó utilizando el *minikit RNeasy* (74104, *Qiagen*, Valencia, CA, EEUU) con un paso de digestión con ADNasa (79204, *Qiagen*, Valencia, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.12 PCR cuantitativa en tiempo real

Para llevar a cabo esta técnica se retrotranscribió 1 µg de ARN total a ADNc mediante el kit *SuperScript III kit* (10432122, *Invitrogen*, Paisley, Escocia, Reino Unido) en un volumen final de 20 µl, de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Posteriormente, se eliminó el ARN de la muestra añadiendo 1 µl ARNasa H, siguiendo nuevamente las recomendaciones del fabricante. El ADNc resultante se mezcló con *SYBR® Green PCR Master Mix* (S9430, *Applied Biosystems*) y 0,3 µM de los oligonucleótidos específicos (directo y reverso) de cada gen (Tabla 1), para su cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, de sus siglas en inglés *quantitative real time-polymerase chain reaction*) en el equipo *7300 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos que incluyen un paso de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y un paso de unión-amplificación a 60°C durante 1 minuto. La especificidad de la amplificación se determinó incluyendo al final del proceso una curva de disociación consistente en la repetición de dos pasos sucesivos de 60°C y 95°C de 15 segundos.

La expresión de cada gen se determinó mediante la interpolación directa y el cálculo del Ct (umbral de ciclo) de amplificación sobre una curva estándar generada con diluciones seriadas 1:10 de plásmidos que portan los genes de interés (10 ng/µl - 0,001 ng/µl). La presencia de genes endógenos estables (*housekeeping*) como el gen *18S* se determinó mediante la interpolación directa del Ct de cada gen sobre una curva estándar generada con las muestras y diluciones seriadas 1:10 de las mismas.

Oligonucleótido	Secuencia
R2-ApoD-Fw	TGCATCCAGGCCAACTACTC
R2-ApoD-Rev	GGGTGGCTTCACCTTCGATT
<i>18S</i> -Fw	ATGCTCTTAGCTGAGTGTCCTCG
<i>18S</i> -Rev	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la qRT-PCR en este estudio. La temperatura de anillamiento fue de 60°C para todos los oligonucleótidos. El gen *18S* fue utilizado como control de la expresión interna.

1.13 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron extraídos y trasladados al programa *GraphPad Prism 8* (San Diego, CA, EEUU) para realizar los cálculos pertinentes y el análisis estadístico. En todos los casos se asumió la independencia y aleatoriedad de las muestras, y se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se usaron test *t* de *Student* de comparación de medias o test de análisis de varianzas (ANOVA), de uno o dos factores, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Durante todo el estudio se utilizó un nivel de significación de 0,05. Los datos en las gráficas se representan como las medias \pm Error Estándar de la Media (SEM, de sus siglas en inglés *standard error of the mean*).

2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN UN MODELO MURINO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

2.1 Animales

En este estudio se incluyeron 96 ratones macho pertenecientes a la cepa C57BL/6, de 8 semanas de edad y un peso de 20 a 24 gramos, procedentes del Bioterio de los Servicios Científico Técnico (SCTs) de la Universidad de Oviedo. Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas con presión positiva a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, alimentados *ad libitum* con pienso estándar (Teklad 2014s, EnVigo), y se les permitió libre acceso a agua filtrada e irradiada con UV antes de los experimentos.

Todo el cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se ajustaron a la normativa europea y española (86/609/CEE; RD1201/2005), y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Oviedo, y la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado (PROAE14/2016). Además, en esta Tesis Doctoral se ha tenido en cuenta la aplicación de las 3Rs en la experimentación animal.

2.2 Administración de cuprizona

En primer lugar, los animales fueron aclimatados a las condiciones experimentales durante una semana. Para ello, los ratones fueron alojados individualmente en cajas de acrílico y alimentados con pienso molido (Teklad 2014s, EnVigo) en las mismas condiciones estándar, mencionadas en el punto anterior, relativas a ciclos de luz/oscuridad, temperatura, humedad y libre acceso a agua y comida.

Para generar el modelo desmielinización inducido por CPZ, los animales se agruparon aleatoriamente en seis grupos experimentales ($n=36$) y seis grupos control ($n=36$). En el caso de los grupos experimentales, los ratones fueron alimentados con pienso estándar molido que contenía un 0,25% (p/p) de CPZ durante 3 y 6 semanas, seguidas de otras 3 o 6 semanas sin CPZ en el caso de los animales con recuperación (Kipp et al., 2009; Vega-Riquer et al., 2019). Los animales de los grupos control recibieron la misma dieta sin CPZ durante todo el tiempo de desarrollo experimental. A continuación, se indican los grupos de estudio, el número de animales, así como la duración del tratamiento y del periodo de recuperación:

- Ratones C57BL/6 sin tratamiento (CTRL3, CTRL6, CTRL3+R3, CTRL3+R6, CTRL6+R3, CTRL6+R6; $n=36$).
- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ durante 3 semanas (CPZ3, $n=6$).
- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ durante 6 semanas (CPZ6, $n=6$).
- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ durante 3 semanas seguidos de un período de recuperación de 3 semanas sin tratamiento (CPZ3+R3, $n=6$).
- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ durante 3 semanas seguidos de un período de recuperación de 6 semanas sin tratamiento (CPZ3+R6, $n=6$).

- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ durante 6 semanas seguidos de un período de recuperación de 3 semanas sin tratamiento (CPZ6+R3, n=6).
- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ durante 6 semanas seguidos de un período de recuperación de 6 semanas sin tratamiento (CPZ6+R6, n=6).

La estimación del tamaño muestral se realizó mediante el software estadístico *GPower3.1* diseñado para realizar estimaciones de la potencia estadística y del tamaño del efecto. En este caso, se ha tenido en consideración la detección de cambios significativos, como resultado de los tratamientos, con una potencia estadística del 80%, así como los resultados observados en estudios previos de la literatura.

Durante el tiempo de tratamiento se realizó un control diario de la ingesta y del consumo de agua. El peso de cada animal se registró cada dos días con una balanza *PB1502-S, MonoBLoc (Mettler Toledo)*. Los animales fueron sacrificados al día siguiente de finalizar el tratamiento con CPZ o el periodo de recuperación.

Con el fin de estudiar los posibles efectos de la CPZ sobre la coordinación motora, el equilibrio y la fatiga, los ratones fueron evaluados mediante una prueba de *Rota-rod*. Durante la primera semana de habituación, y en días alternos, los ratones recibieron entrenamiento para familiarizarse con el aparato; una vez comenzado el tratamiento con CPZ, los ratones fueron sometidos a esta prueba. Para ello, los animales fueron colocados en el *Rota-rod (Lsiletica Rota-rod/rs Le8500)* a una velocidad creciente de 4 a 20 rpm, durante 3 ensayos, y con un tiempo de corte de 3 minutos cada uno. La variable evaluada fue la latencia a la caída, es decir, el tiempo que transcurrió desde que el ratón fue colocado en el eje rotatorio del *Rota-rod* hasta que se cayó de él. Esta variable permite identificar alteraciones en la coordinación motora y el equilibrio.

2.3 Tratamiento con clozapina

La metodología a seguir fue la misma que la descrita en el punto anterior. En este caso los ratones, además de su dosis de CPZ, recibieron una dosis diaria de CLO (10 mg/kg), mediante una solución que sustituía al agua de bebida (Thomas & Yao, 2007). A continuación, se indican los grupos de estudio, el número de animales, así como la duración del tratamiento:

- Ratones C57BL/6 tratados con CLO durante 3 semanas (CLO3, n=6).
- Ratones C57BL/6 tratados con CLO durante 6 semanas (CLO6, n=6).
- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ y CLO durante 3 semanas (CPZ3+CLO3, n=6).
- Ratones C57BL/6 tratados con CPZ y CLO durante 6 semanas (CPZ6+CLO6, n=6).

2.4 Imagen por Resonancia Magnética

Los posibles cambios a nivel cerebral, principalmente la desmielinización y la posible remielinización, así como el ancho de la corteza motora y la hidrocefalia causados por los tratamientos con CPZ fueron monitorizados

mediante RM en la Unidad de Imagen Preclínica de los SCTs de la Universidad de Oviedo con capacidad de 3 Teslas. Para ello, los animales fueron anestesiados con 2-2,5% isoflurano (mg/kg) inhalado e introducidos en el aparato de RM, obteniéndose una imagen completa de todo el cerebro en T2 que permitió monitorizar *in vivo* el curso de las lesiones. Se tomaron imágenes al inicio y al final del tratamiento; además, en los grupos de 6 semanas se obtuvieron imágenes a mitad del tratamiento.

En las imágenes obtenidas por RM se cuantificó el volumen cerebral, el volumen de los ventrículos, el ancho de la corteza motora y la densidad del cuerpo calloso a 0,6+3 mm del punto Bregma, mediante el programa de análisis *ImageJ*. Asimismo, se tuvo en cuenta el cociente del diámetro cerebral y la distancia entre ambos ventrículos como medida de hidrocefalia (ratio de Evans; Figura 9), asumiendo ésta en valores mayores o iguales a 0,3 (Evans, 1942).

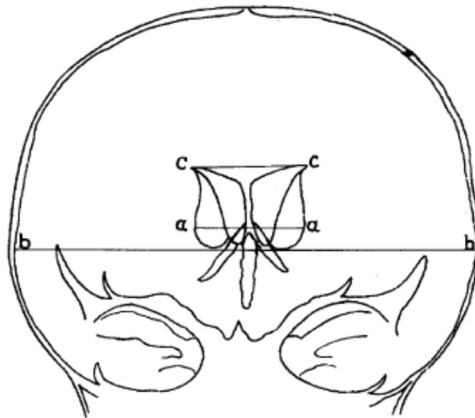


Figura 9. Imagen que muestra la relación entre el diámetro de los ventrículos (α - α) y el diámetro transversal del cerebro (b-b) (Evans, 1942).

2.5 Procesamiento de los tejidos y tinción histoquímica

Una vez concluidos los tratamientos, los animales fueron sacrificados mediante perfusión transcardíaca con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato, previa anestesia por inhalación de isoflurano (2-2,5%). A continuación, se extrajeron los cerebros del cráneo y se post-fijaron durante 12 a 18 horas en PFA al 4% por inmersión. Finalmente, el tejido se incluyó en parafina y se obtuvieron secciones transversales de 5 μ m de grosor a nivel de (0-0,3) Bregma (Figura 10), las cuales se montaron en portaobjetos *SuperFrost® Plus* (*Mentzel-Gläser, Thermo Scientific, Waltham, EEUU*) y se secaron a 36°C durante 24 horas.

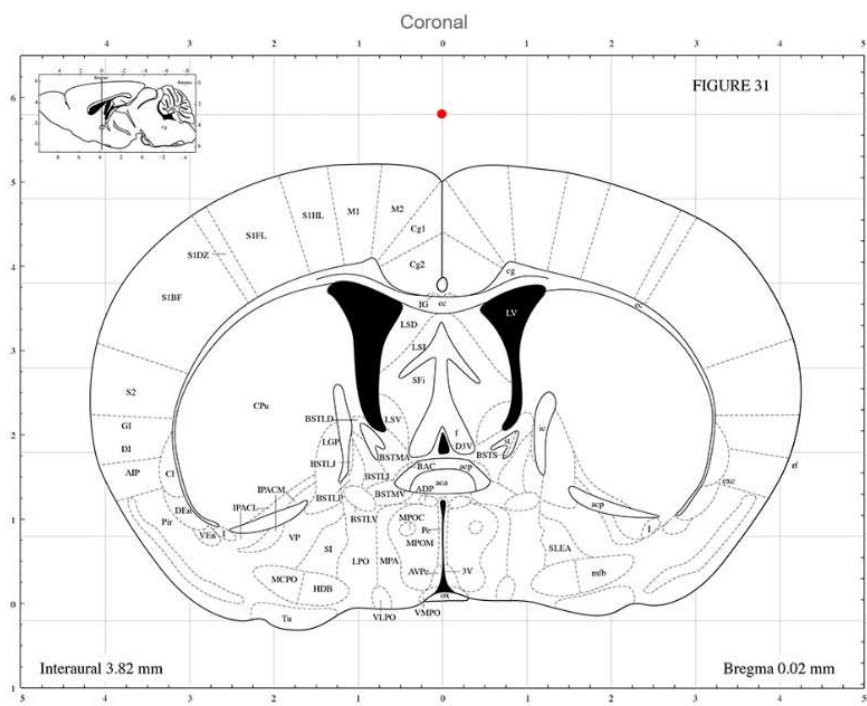


Figura 10. Esquema de un corte coronal del cerebro de ratón a nivel del cuerpo calloso (0-0,3 Bregma). Fuente: (Paxinos & Franklin, 2001).

Para analizar la desmielinización y la degeneración axonal, así como clasificar las muestras según el tipo de lesión, las secciones fueron desparafinadas en xileno, hidratadas utilizando concentraciones decrecientes de alcohol y teñidas con la técnica del *Luxol Fast Blue* (LFB) usando los protocolos histológicos estándar. La tinción de la mielina pone de manifiesto las placas de desmielinización y la magnitud de las lesiones.

2.6 Inmunohistoquímica para la Apolipoproteína D

El marcaje inmunohistoquímico de la Apo D se llevó a cabo como se detalla a continuación. Las secciones fueron desparafinadas en xileno, hidratadas utilizando concentraciones decrecientes de alcohol y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con agua destilada, las secciones fueron tratadas con H_2O_2 al 3% durante 5 minutos para eliminar la actividad peroxidasa endógena, lavadas de nuevo con agua destilada y tratadas con PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. La unión inespecífica se bloqueó mediante su incubación con BSA al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo anti-hApo D en dilución 1:2.000 durante toda la noche a 4°C. Tras varios lavados en PBS, las secciones se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente utilizando un anticuerpo universal de caballo biotinilado en dilución 1:50, seguido de una incubación con estreptavidina marcada con peroxidasa (E2886, Sigma Extra-3, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU) otros 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad peroxidasa se visualizó con diaminobencidina (DAB; D4168, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO,

EEUU). Por último, las secciones se deshidrataron, se aclararon en eucaliptol y se montaron con *Eukitt® mounting médium* (03989, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EEUU).

Como control de la inmunohistoquímica, se procesaron secciones equivalentes de tejido siguiendo el mismo protocolo y utilizando, o bien BSA al 1% en lugar del anticuerpo primario o bien anticuerpo anti-hApo D preabsorbido con péptido inmunizante Apo D (80 mg/ml). En estas condiciones, no se observó inmunotinción específica.

2.6.1 Cuantificación de la señal inmunohistoquímica

Una vez realizadas las pruebas inmunohistoquímicas se tomaron imágenes de 6 regiones aleatorias por cada caso, de la zona central del cuerpo caloso, con el objetivo de 20 aumentos utilizando una cámara digital *Nikon DN100* acoplada a un microscopio *Nikon Eclipse E400* equipado con objetivos *Plan-Fluor*. Las imágenes se adquirieron en las mismas condiciones de iluminación, ajustes de diafragma y condensador, tiempo de exposición y corrección de fondo.

Para la cuantificación densitométrica, tanto del marcaje para la Apo D como para la mielina (LFB), se seleccionó la señal cromogénica con *Adobe Photoshop CS* y se cuantificó con el software *ImageJ* según un procedimiento desarrollado por nuestro grupo de investigación (Tolivia et al., 2006). También se determinó el número de células Apo D positivas mediante el método de doble observador, después de haber acordado contar solo aquellas células en las que se viese también el núcleo para evitar el conteo de precipitados y prolongaciones positivas.

2.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron extraídos y trasladados al programa *GraphPad Prism 8* para realizar los cálculos pertinentes y el análisis estadístico. En todos los casos se asumió la independencia y aleatoriedad de las muestras, y se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianzas. Posteriormente, test de análisis de varianzas (ANOVA), de uno o dos factores, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Durante todo el estudio se utilizó un nivel de significación de 0,05. Los datos en las gráficas se representan como las medias \pm SEM.

Resultados

1 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN UN MODELO CELULAR DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

1.1 La cuprizona disminuye la viabilidad celular pero no causa la muerte de las células SH-SY5Y y HOG

Para analizar el papel de la Apo D en los mecanismos patológicos característicos de la EM a nivel celular se procedió, en primer lugar, al desarrollo y puesta a punto de un modelo de EM de citotoxicidad inducida por CPZ. Para ello, se analizó el efecto de este tóxico sobre dos líneas celulares, una línea de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y otra de oligodendroglioma humano (HOG). De esta manera, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de CPZ durante 24, 48 y 72 horas para, a continuación, medir la viabilidad celular mediante un ensayo de reducción de MTT. Esta prueba se utiliza de manera habitual para estimar la actividad metabólica (funcionalidad mitocondrial) como un indicador de la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celular. A lo largo de este trabajo, usaremos el término viabilidad celular como sinónimo de una reducción de la producción de energía que, de mantenerse, conduciría a la muerte de las células.

Los resultados mostraron que la CPZ compromete la viabilidad de las células SH-SY5Y y HOG de manera dosis-dependiente, tanto a las 24 como a las 48 horas de tratamiento. Como se observa en la Figura 11, este tóxico indujo una reducción significativa de la absorbancia a 570 nm, de hasta el 30%, en las células tratadas con 1 mM de CPZ durante 24 horas. No obstante, es importante destacar que las dos líneas celulares se vieron afectadas por la CPZ de forma diferente, siendo los OLGs más sensibles al efecto de la misma. En el caso de las células SH-SY5Y, las concentraciones de 0,5, 1 y 1,5 mM de CPZ causaron una pérdida de la viabilidad en torno al 20, 25 y 30%, respectivamente (Figura 11a). Sin embargo, las células HOG vieron afectada su funcionalidad mitocondrial a dosis menores, 0,1-0,5 mM de CPZ (Figura 11b).

El tratamiento de las células SH-SY5Y y HOG con las mismas concentraciones de CPZ durante 48 horas mostró resultados similares (Figura 11c-d), si bien en el caso de las células HOG la pérdida de viabilidad resultó ser un poco mayor, llegando a una reducción de la absorbancia del 50%. Al aumentar el tiempo de tratamiento a 72 horas se comprobó que la pérdida de viabilidad también aumentaba de manera significativa (Figura S1, Anexos).

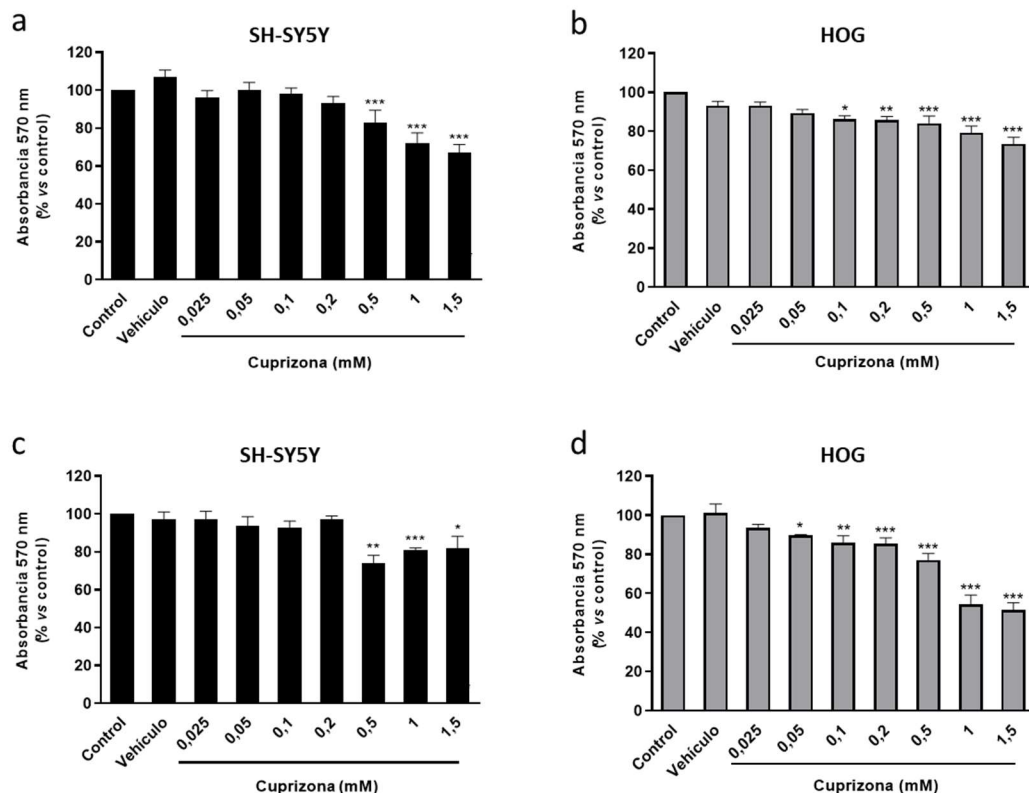


Figura 11. Ensayos MTT en células SH-SY5Y (a,c) y HOG (b,d) tratadas con concentraciones crecientes de cuprizona (0,025-1,5 mM) durante 24 (a,b) y 48 horas (c,d). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A continuación, y para comprobar si la disminución de la viabilidad celular inducida por la CPZ se correlacionaba con un aumento de la muerte celular, se realizó un ensayo de exclusión con azul tripán, un colorante que sólo penetra en las células con membranas dañadas. Con este método comprobamos que la CPZ, en todas las concentraciones ensayadas (0,1-1,5 mM), no causaba la muerte ni de las células SH-SY5Y ni de las células HOG tras 24 y 48 horas de tratamiento, tal como se aprecia en la Figura 12.

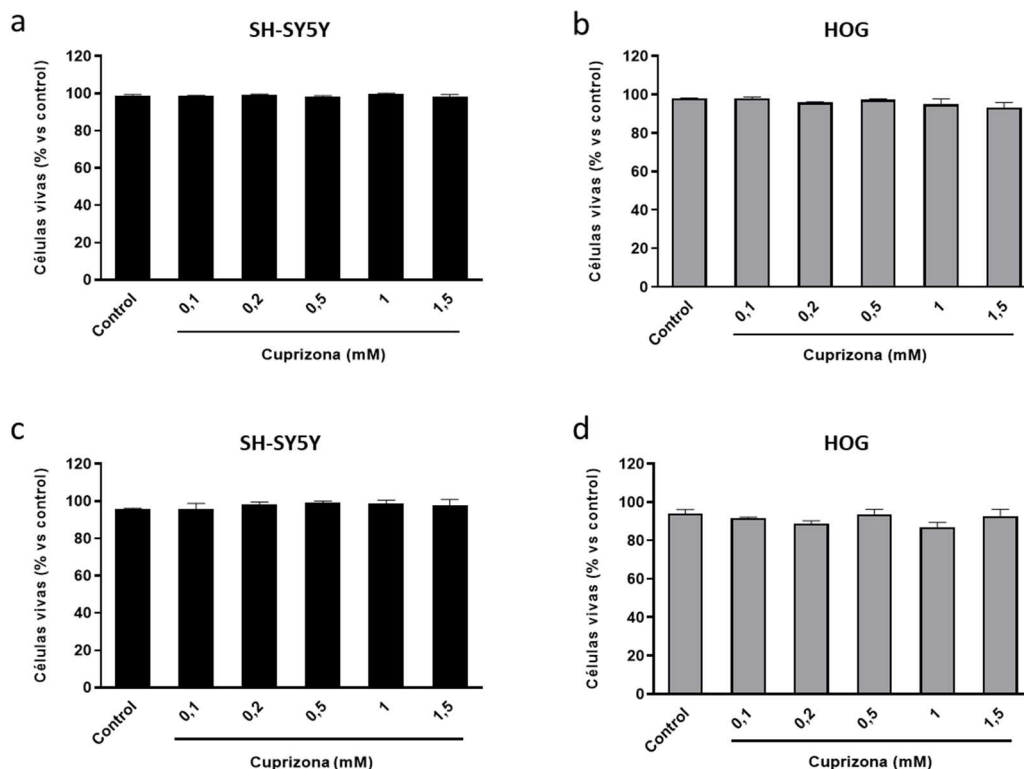


Figura 12. Efecto de la cuprizona (0,1-1,5 mM) sobre la mortalidad celular expresada como el porcentaje de células vivas respecto al control, tras 24 (a,b) y 48 horas (c,d) de tratamiento. Células SH-SY5Y (a,c). Células HOG (b,d). Los datos se representan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

1.2 La pérdida de viabilidad celular causada por la cuprizona en las células SH-SY5Y y HOG es revertida una vez se suspende el tratamiento

Como se indicó previamente, los ratones tratados con CPZ muestran una remielinización espontánea cuando se interrumpe el tratamiento (Zhan et al., 2020). Para comprender mejor los mecanismos moleculares subyacentes a este hecho, el siguiente paso fue determinar si el efecto citotóxico de la CPZ es reversible, y si las células son capaces de recuperarse del daño en ausencia de la misma. Para ello, se analizó la viabilidad de las células SH-SY5Y y HOG tras haber sido sometidas a un tratamiento con CPZ (0,2-1,5 mM) durante 24 horas, seguido de un periodo de recuperación en el que las células se crecieron en medio de cultivo fresco carente de tóxico, manteniéndose el cultivo de 24 a 48 horas más. Los resultados demostraron una reversión significativa de la pérdida de viabilidad causada por todas las concentraciones de CPZ analizadas, en ambas líneas celulares, que llegó a ser de hasta un 60-65% en el caso de la concentración de 1,5 mM de CPZ tras 24 horas de recuperación (Figura 14). Además, esta reversión resultó ser tiempo-dependiente, ya que a más tiempo de ausencia de CPZ en el medio mayor recuperación de la viabilidad de los cultivos, tal y como se observa tras un periodo de recuperación de 48 horas en la Figura 13c,d. Cabe señalar, también, que las células de oligodendrogloma, más sensibles a la CPZ (véase Figura 11), se recuperan de una manera más eficaz a tiempos más largos (48 horas; Figura 13c,d).

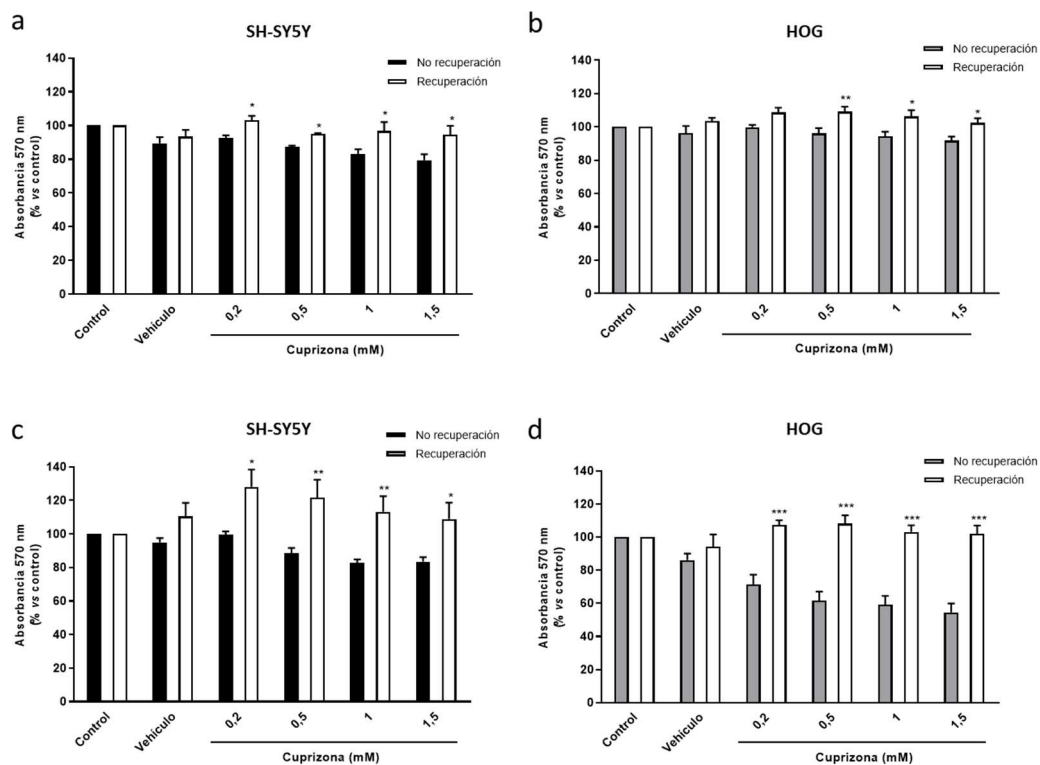


Figura 13. Ensayos MTT en células SH-SY5Y (a,c) y HOG (b,d) tratadas con concentraciones crecientes de cuprizona (0,2-1,5 mM) durante 24 horas, seguidas de 24 (a,b) o 48 horas (c,d) sin tratamiento (periodo de recuperación). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas no recuperación *versus* recuperación * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

1.3 La cuprizona disminuye la viabilidad celular pero no induce la muerte en co-cultivos SH-SY5Y/HOG

Una de las principales limitaciones de los modelos *in vitro* de EM es que el cultivo de un sólo tipo celular no reproduce exactamente el microambiente del SNC, donde tanto neuronas como células de glía interactúan entre sí (van der Star et al., 2012). En este trabajo quisimos ir un paso más allá y analizar el efecto citotóxico de la CPZ en un contexto más realista como es el de un modelo celular neurona-glía, concretamente en un co-cultivo de células SH-SY5Y/HOG.

En primer lugar, y antes de llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad, se caracterizaron las condiciones adecuadas para el cultivo conjunto de las células SH-SY5Y y HOG relativas a las tasas de proliferación de ambas líneas celulares por separado, la proporción correcta de ambos tipos de células en el co-cultivo, y el medio de cultivo óptimo para su crecimiento (ver Material y Métodos). Además de determinar la proporción idónea de células SH-SY5Y/HOG (1,5:2), también se procedió a su identificación morfológica para comprobar la presencia y equilibrio de ambos tipos celulares en los co-cultivos, así como la evolución de éstos en el tiempo, mediante imágenes

tomadas con el microscopio de contraste de fases (Figura 14). En las condiciones seleccionadas, y 24 horas después de la siembra, ambas células eran adherentes y mostraban pequeñas extensiones. A las 48 horas de co-cultivo, éstas mostraban cuerpos cónicos o fusiformes y prolongaciones más largas (Figura 14c, d); en el caso de las células HOG éstas extensiones tenían una longitud mayor que cuando se crecían en monocultivo (Figura 14a,b,d,f). Curiosamente, se observó que las células SH-SY5Y y HOG crecían en una relación física directa estableciendo contactos entre sus prolongaciones, lo cual se hacía muy evidente a las 48 y 72 horas de cultivo (Figura 14c-f; flechas y cabezas de flecha).

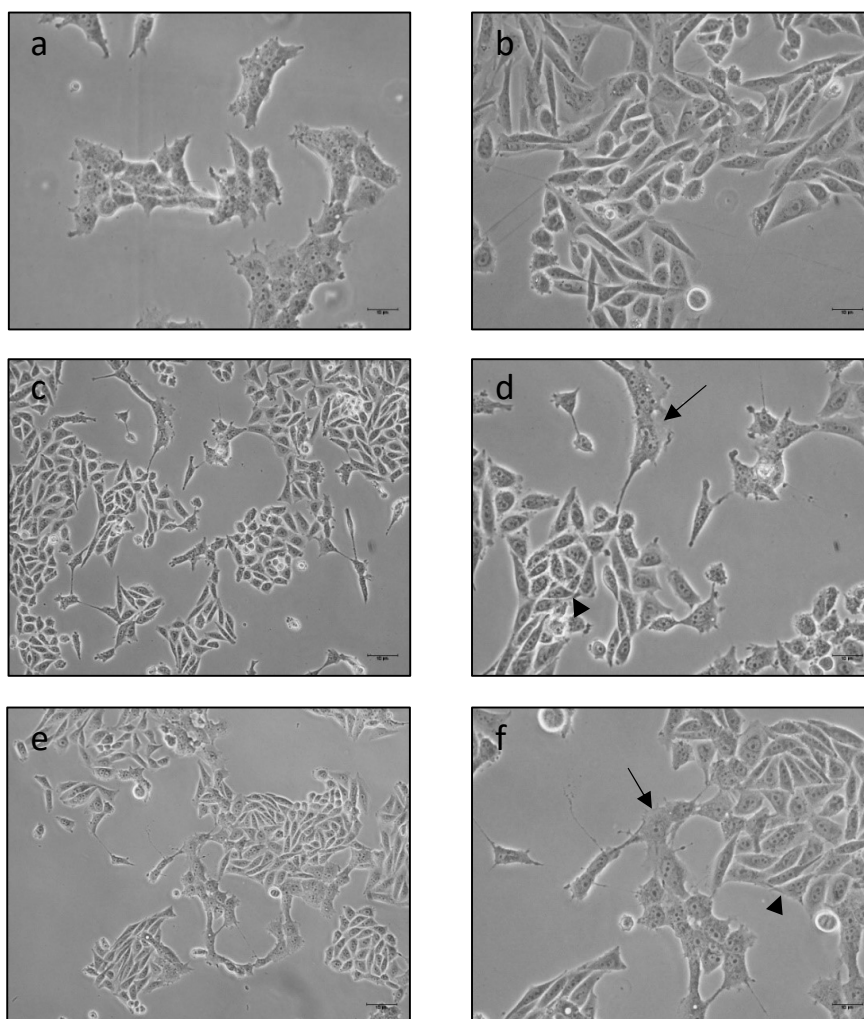


Figura 14. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de los monocultivos de células SH-SY5Y (a) y HOG (b), así como de la evolución del co-cultivo (proporción 1,5:2) a las 48 (c y d) y 72 horas (e y f). Se puede observar que las células SH-SY5Y (cabezas de flecha) y HOG (flechas) entran en contacto físico directo tras 48 (c,d) y 72 horas (e,f) de co-cultivo. Aumentos: 20x (a,b,d,f) y 10x (c,e). Escala: 10 μ m.

RESULTADOS

A continuación, y con el objetivo de analizar el efecto de la CPZ sobre la viabilidad del co-cultivo SH-SY5Y/HOG, las células se trataron con concentraciones crecientes del tóxico durante 24 y 48 horas. Los datos mostraron una pérdida de viabilidad celular en las concentraciones más elevadas de CPZ a las 24 horas de tratamiento. En concreto, las concentraciones de 0,5, 1 y 1,5 mM de CPZ causaron una reducción significativa de la absorbancia a 570 nm del 17%, 21% y 21%, respectivamente (Figura 15a). Resultados similares se obtuvieron tras el tratamiento de las células con CPZ durante 48 horas, aunque en este caso la pérdida de viabilidad llegó a ser del 65-70% con 1 mM de CPZ (Figura 15b).

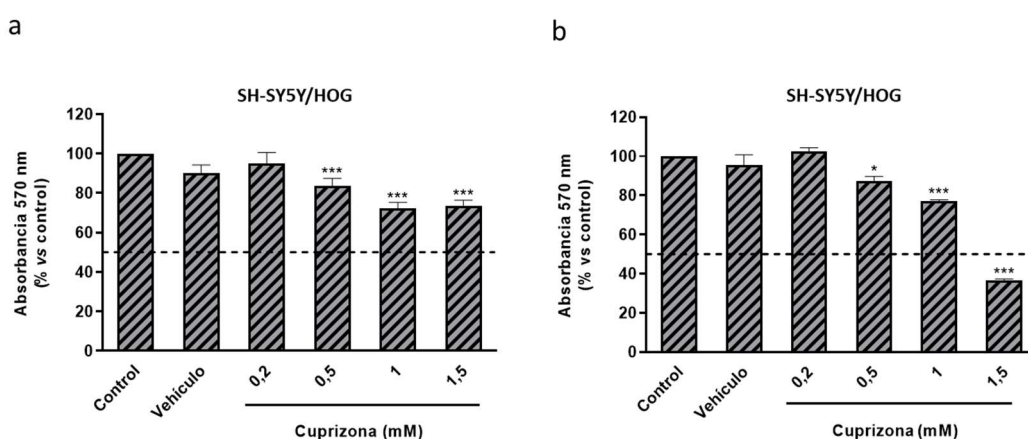


Figura 15. Ensayos MTT en co-cultivos SH-SY5Y/HOG tratados con concentraciones crecientes de cuprizona (0,2-1,5 mM) durante 24 (a) y 48 horas (b). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Por último, se comprobó si la disminución de la viabilidad celular inducida por CPZ se veía reflejada en un aumento de la muerte celular. El ensayo de exclusión con azul tripán demostró que concentraciones altas de CPZ (1-1,5 mM) causaban la muerte de las células del co-cultivo tanto a las 24 como 48 horas de tratamiento, si bien es cierto que los porcentajes era mínimos (5-10%) y que no se correspondían con las tasas de pérdida de viabilidad observadas (Figura 16). Parece que, aunque la administración de CPZ induce pérdida de viabilidad celular, el daño oxidativo ejercido por este quelante de cobre no es suficiente para causar la muerte de las células, al menos a las concentraciones y tiempos ensayados.

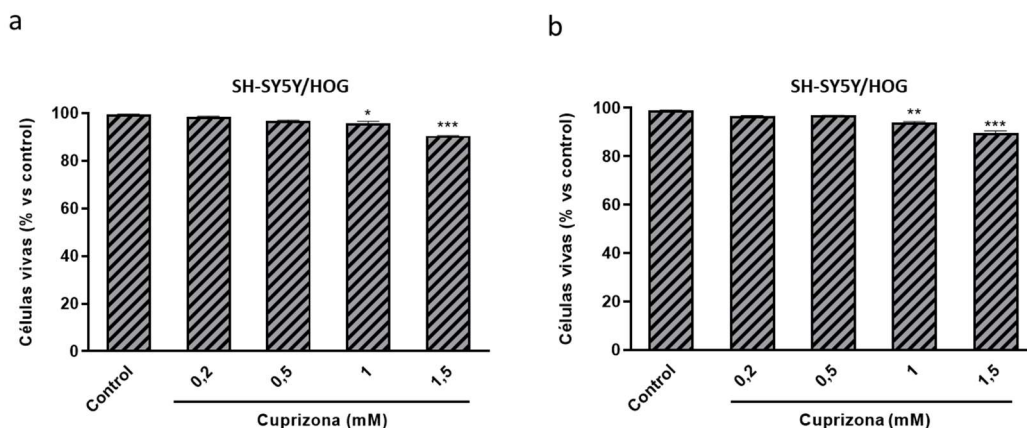


Figura 16. Efecto de la cuprizona (0,2-1,5 mM) sobre la mortalidad celular expresada como el porcentaje de células vivas del co-cultivo SH-SY5Y/HOG respecto al control, tras 24 (a) y 48 horas (b) de tratamiento. Los datos se representan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * = diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

1.4 La pérdida de viabilidad celular causada por la cuprizona en los co-cultivos SH-SY5Y/HOG es revertida una vez suspendido el tratamiento

El siguiente paso consistió en evaluar si los co-cultivos SH-SY5Y/HOG eran capaces de recuperarse del daño citotóxico tras la exposición a la CPZ, como ocurre en el modelo animal y como describimos para las células en monocultivo. Nuevamente, se encontró un aumento significativo (20-30%) de la viabilidad celular en los co-cultivos sometidos a un tratamiento con CPZ (0,2-1,5 mM) durante 24 horas seguido de un periodo de recuperación de 24 o 48 horas (Figura 17). Además, este efecto fue dependiente del tiempo, ya que la mayor capacidad de proliferación celular se observó a las 48 de recuperación (Figura 17).

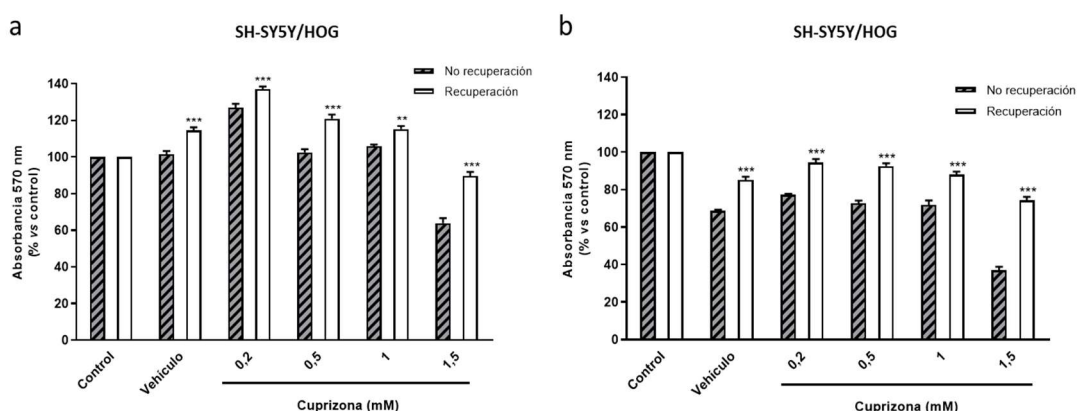


Figura 17. Ensayos MTT en co-cultivos SH-SY5Y/HOG tratados con concentraciones crecientes de cuprizona (0,2-1,5 mM) durante 24 horas seguidas de 24 (a) o 48 horas (b) sin tratamiento (periodo de recuperación). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * = diferencias estadísticamente significativas sin recuperación *versus* recuperación ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

1.5 La cuprizona causa una reducción en la tasa de consumo de oxígeno de las neuronas y las células de glía

Una vez se comprobó que la CPZ provocaba una pérdida reversible de la viabilidad y la actividad mitocondrial de las células SH-SY5Y y HOG, así como de su co-cultivo, se intentó profundizar más en la caracterización del daño que este tóxico induce a nivel celular utilizando, para ello, cultivos primarios neuronales procedentes de corteza cerebral de rata y una técnica específica para medir la OCR en tiempo real en este modelo experimental (ver Material y Métodos). Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos es importante apuntar que la OCR es una medida cinética que se correlaciona directamente con la pendiente de la curva representada en las gráficas, es decir, una mayor pendiente sería indicativo de una mayor OCR y lo contrario (Figura 18).

En nuestro caso, se observó una disminución de la pendiente de la OCR y, en consecuencia, de la respiración celular a medida aumentaba la dosis de CPZ (0,1-50 μ M) con la que fueron tratadas las neuronas corticales durante 24 horas (Figura 18a). La pendiente, de hecho, llegó a ser insignificante en el caso de las neuronas tratadas con 50 μ M de CPZ. Como control del experimento se utilizaron cultivos primarios de células WAT, según las recomendaciones de la casa comercial, obteniéndose resultados similares (Figura 18b).

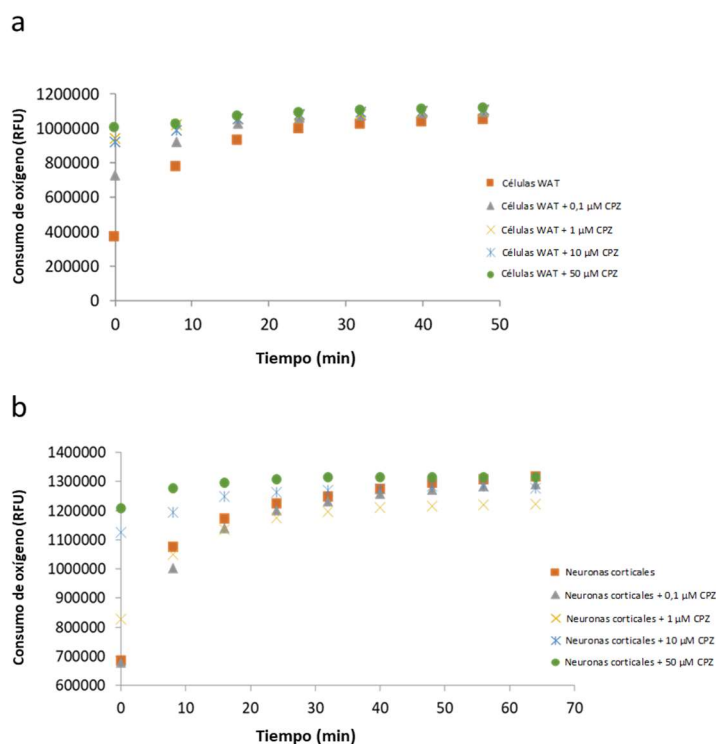


Figura 18. Medida del consumo de oxígeno (ensayo OCR) en neuronas corticales (a) y células de tejido adiposo blanco (WAT) (b) tratadas con concentraciones crecientes de cuprizona (0,1-50 μ M) durante 24 horas. Los datos se representan como la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

Cabe destacar que las concentraciones de CPZ, 10 o 50 μM , que redujeron significativamente la OCR en las neuronas corticales, no causaron alteraciones significativas en la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y (Figura 11a).

Ya que estos datos muestran que el metabolismo energético se ve afectado por la CPZ en tipos celulares bastante diferentes, nos planteamos comparar las OCR de los cultivos primarios neuronales con los de dos líneas de células gliales, una de origen humano (T-98) con una actividad metabólica baja y otra procedente de un glioblastoma de roedor (N-9) con una actividad metabólica alta. En este caso, la CPZ (0,1-50 μM) causó una disminución de la OCR dosis-dependiente en ambas líneas celulares tras 24 horas de tratamiento (Figura 19). No obstante, esta disminución fue mayor en las células T-98 que en las células N-9, lo que sugiere una susceptibilidad diferencial al tóxico, posiblemente relacionada con su metabolismo basal. Además, la reducción de la medida del ensayo OCR, descrita en las dos líneas celulares gliales, ocurrió a dosis de CPZ muy bajas (0,1 μM), las cuales ni siquiera tuvieron efecto en el caso del tratamiento de las neuronas corticales de rata (Figura 20).

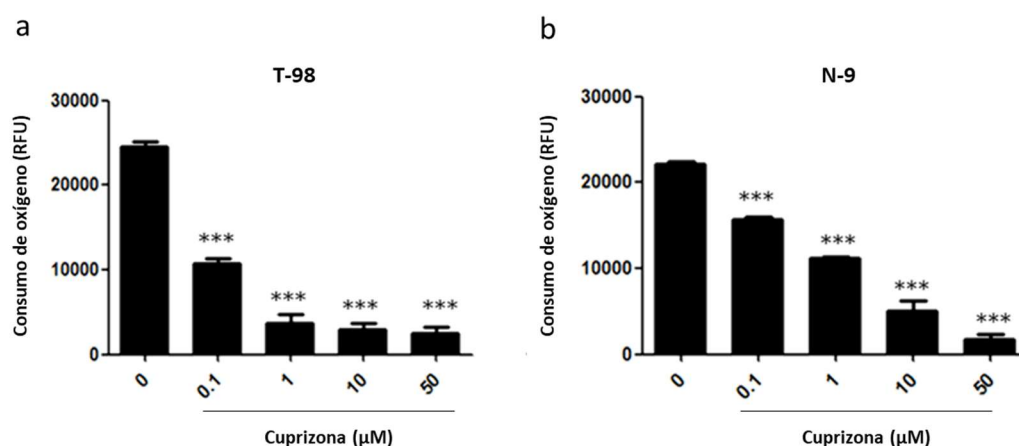


Figura 19. Medida del consumo de oxígeno (ensayo OCR) en células T-98 (a) y N-9 (b) tratadas con concentraciones crecientes de cuprizona (0,1-50 μM) durante 24 horas. Los datos se representan como la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * = diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

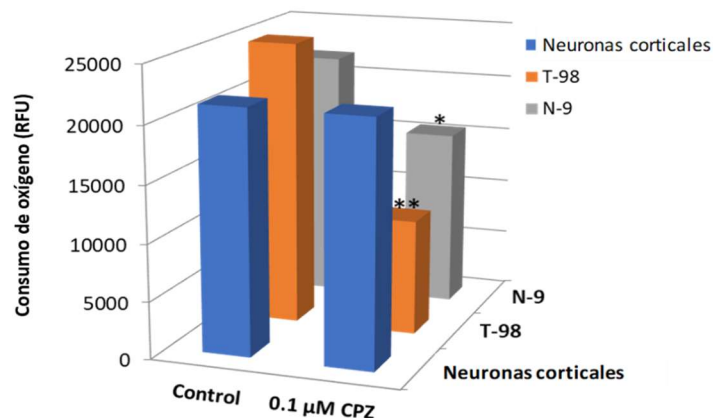


Figura 20. Medida del consumo de oxígeno (ensayo OCR) en células T-98, N-9 y neuronas corticales tratadas con 0,1 μM de cuprizona durante 24 horas. Los datos se representan como la media ± SEM de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test t de *Student*. *= diferencias estadísticamente significativas células gliales *versus* neuronas corticales * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

1.6 Análisis de la expresión de la Apolipoproteína D en células SH-SY5Y y HOG en respuesta al tratamiento con cuprizona

Aprovechando nuestra experiencia en el modelo celular de EM inducido por CPZ, y teniendo en cuenta que los resultados descritos en este trabajo demuestran que este compuesto es capaz de inducir un daño citotóxico en las células HOG y SH-SY5Y, nos propusimos analizar el efecto de la CPZ sobre la expresión de la Apo D en estas líneas celulares mediante qRT-PCR e inmunofluorescencia.

Como se muestra en la Figura 21, tanto el análisis de la expresión génica (Figura 21a) como la cuantificación de la señal inmunofluorescente obtenida (Figura 21b-d) revelaron que la CPZ inducía cambios en la expresión de la Apo D en las células HOG sólo a concentraciones altas (1 mM CPZ). De hecho, en el resto de las condiciones se observó una señal fluorescente constante y casi invariable entre las células control y las células tratadas (Figura 21b).

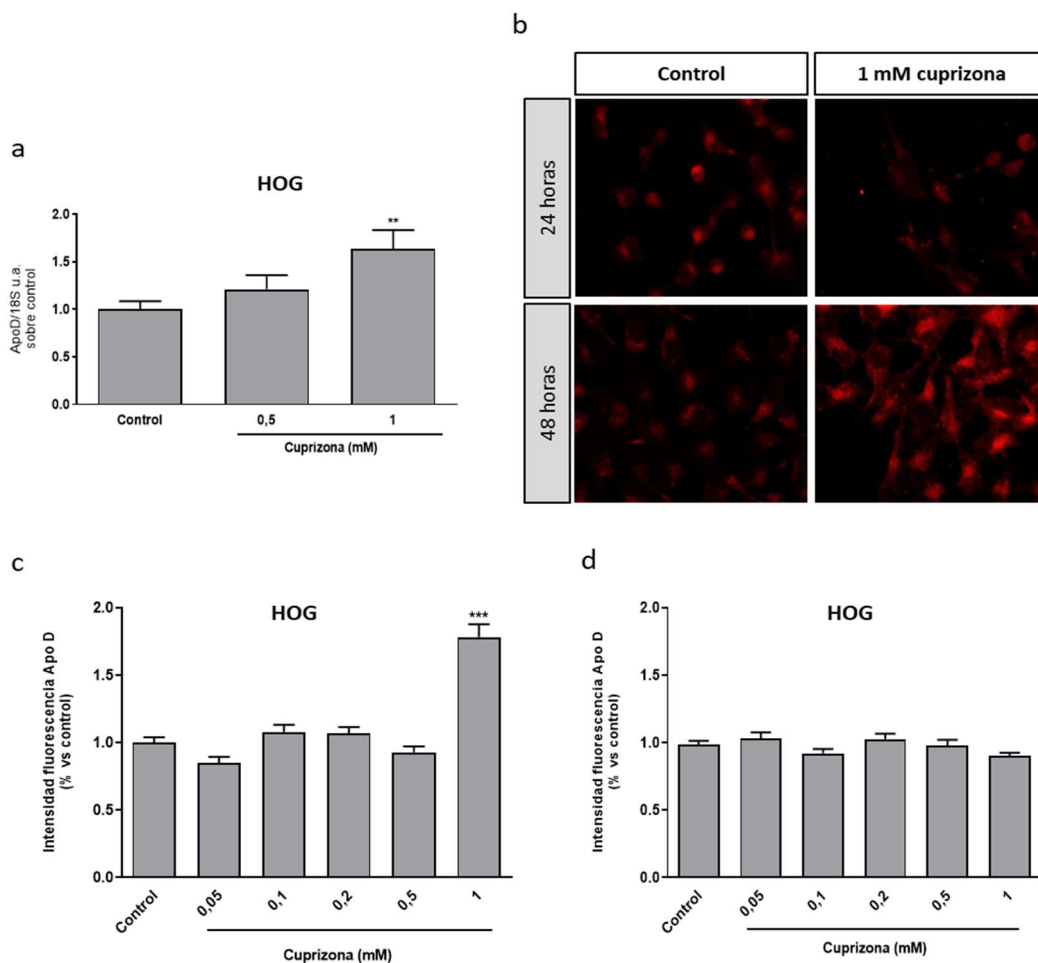


Figura 21. Expresión relativa del gen de la Apo D en células HOG tratadas durante 24 horas con 0,5-1 mM de cuprizona. Los datos representan el cociente entre el gen de interés y la expresión de un gen endógeno no variable ARNr *18S*. Las barras representan la media \pm SEM de todas las mediciones (n=6-8) (a). Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (40X) de la expresión de la Apo D en células HOG en situación control y tratadas con 1 mM de cuprizona durante 24 y 48 horas (b). Cuantificación densitométrica de la señal inmunocitoquímica de la Apo D tras 24 (c) y 48 horas (d) de tratamiento con concentraciones crecientes de cuprizona (0,05-1 mM) en células HOG. Los datos se representan como el porcentaje de intensidad de marcaje medio \pm SEM por célula por campo (40X) respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En el caso de las células de neuroblastoma SH-SY5Y, que según estudios previos muestran unos niveles insignificantes de la Apo D (Pascua-Maestro et al., 2019), observamos una expresión endógena muy escasa de esta apolipoproteína, sólo detectable por inmunocitoquímica, y sobre la que la CPZ no parece ejercer ningún efecto. Como se observa en las imágenes (Figura 22a) y en la cuantificación de la señal fluorescente (Figura 22b,c), la cantidad de la Apo D no se ve alterada con los tratamientos (0,05-1 mM CPZ).

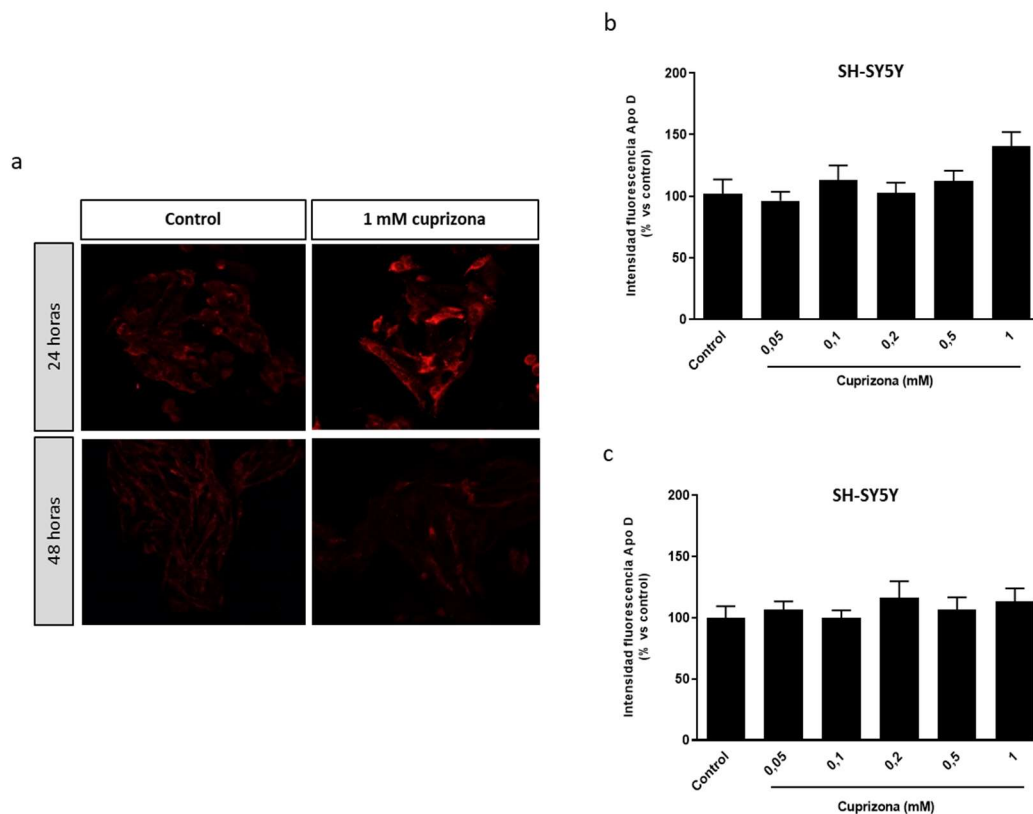


Figura 22. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (40X) de la expresión de la Apo D en células SH-SY5Y en situación control y tratadas con 1 mM de cuprizona durante 24 y 48 horas (a). Cuantificación densitométrica de la señal inmunocitoquímica de la Apo D tras 24 (b) y 48 horas (c) de tratamiento con concentraciones crecientes de cuprizona (0,05-1 mM) en células SH-SY5Y. Los datos se representan como el porcentaje de intensidad de marcaje medio \pm SEM por célula por campo (40X) respecto al control (n=6).

1.7 La clozapina previene la pérdida de viabilidad celular en los modelos celulares de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona

Tomando como base que la CPZ no afectaba a la expresión de la Apo D en las células SH-SY5Y y HOG, nos fijamos como siguiente objetivo analizar si el aumento experimental de los niveles endógenos de esta proteína podría revertir el efecto citotóxico de la CPZ en estos modelos celulares. En este sentido, se ha demostrado que la CLO, un antipsicótico atípico ampliamente utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia y el trastorno bipolar, parece ejercer sus efectos beneficiosos gracias a su capacidad para aumentar los niveles de Apo D cerebrales (Mahadik et al., 2002; Thomas et al., 2001a).

Para evaluar el potencial efecto neuroprotector de la CLO en los modelos de neurotoxicidad inducida por CPZ se trataron, en primer lugar, las células HOG y SH-SY5Y con concentraciones crecientes de CLO (0,1-100 μ M) durante 24 y 48 horas en ausencia de CPZ, observándose que este fármaco aumentaba la viabilidad celular de los cultivos a casi todas las concentraciones ensayadas, a excepción de dosis extremadamente altas y/o exposiciones

prolongadas (Figura 23). Cabe destacar que las dos líneas celulares se vieron afectadas de forma diferencial por la CLO, siendo las neuronas más sensibles que las células gliales a las mismas concentraciones del antipsicótico.

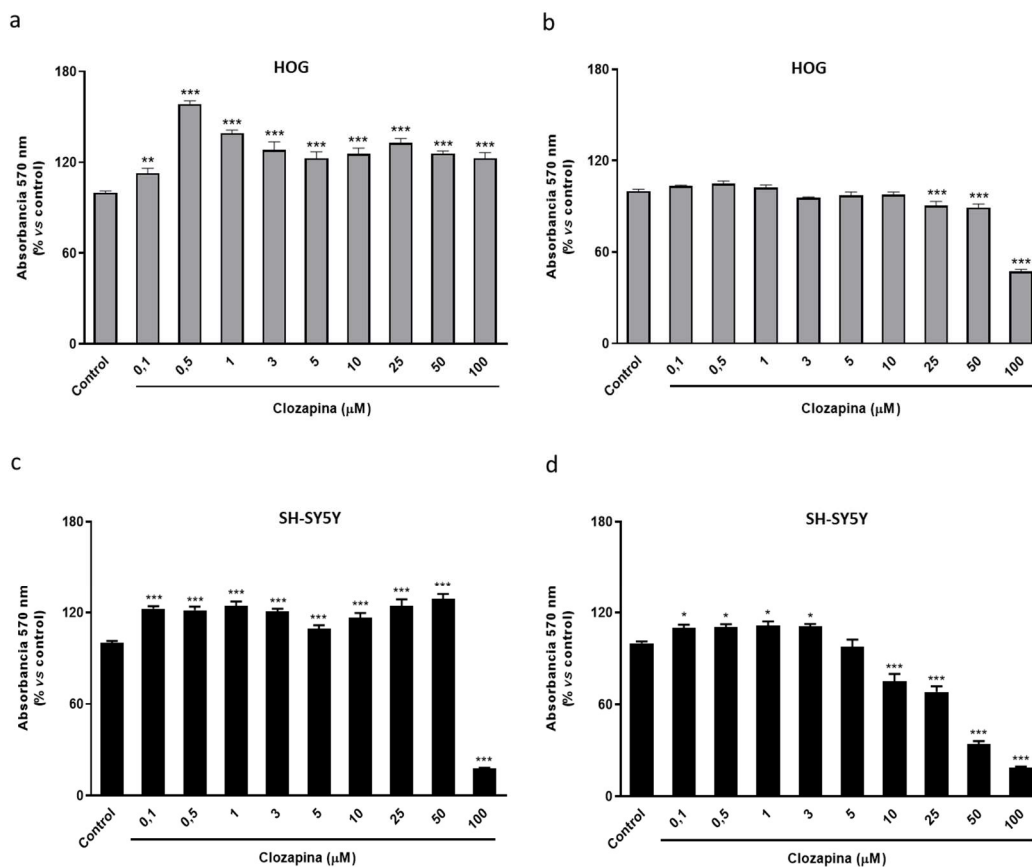


Figura 23. Ensayos MTT en células HOG (a,b) y SH-SY5Y (c,d) tratadas con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-100 μM) durante 24 (a,c) y 48 horas (b,d). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A continuación, comprobamos si la CLO podía evitar la citotoxicidad causada por la CPZ. Nuestros hallazgos demostraron que la CLO (0,1-1 μM), añadida 24 horas antes del tratamiento con 0,5 mM de CPZ, prevenía alrededor del 15-30% de la pérdida de viabilidad celular tanto en células HOG como SH-SY5Y (Figura 24). Cuando las células fueron tratadas con CLO y CPZ al mismo tiempo se obtuvieron resultados similares (Figura S2, Anexos). Por el contrario, este efecto neuroprotector no fue apreciable cuando las células fueron tratadas con CPZ durante 24 horas y, posteriormente, con concentraciones crecientes de CLO durante, al menos, otras 24 horas (Figura S3, Anexos).

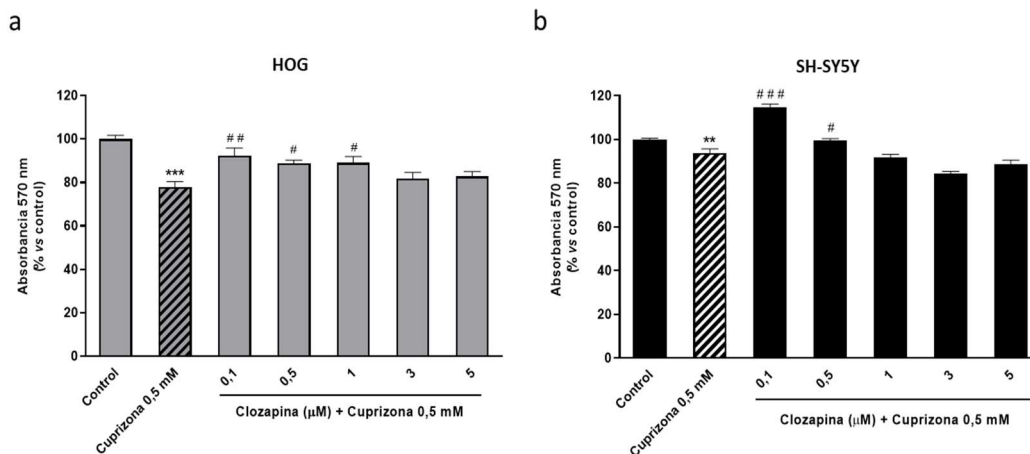


Figura 24. Ensayos MTT en células HOG (a) y SH-SY5Y (b) tratadas con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-5 μM) durante 24 horas seguidas de otras 24 horas con 0,5 mM de cuprizona. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* cuprizona # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

1.8 Las dosis neuroprotectoras de clozapina aumentan la expresión de la Apolipoproteína D en los modelos celulares de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona

De acuerdo con algunos autores, uno de los mecanismos de acción por los que la CLO podría ejercer sus efectos neuroprotectores es el aumento de la expresión endógena de la Apo D (Thomas et al., 2001a). Para confirmar si esto es lo que estaba ocurriendo en nuestros modelos experimentales, se analizó la expresión de la Apo D tras la adición de CLO al cultivo, en presencia o no de CPZ.

En el caso de las células HOG, tanto la qRT-PCR como la inmunocitoquímica demostraron que la CLO no producía cambios en la expresión de la Apo D por sí misma, al menos en las concentraciones y tiempos de tratamiento analizados (0,1-5 μM; 24 o 48 horas) (Figura 25).

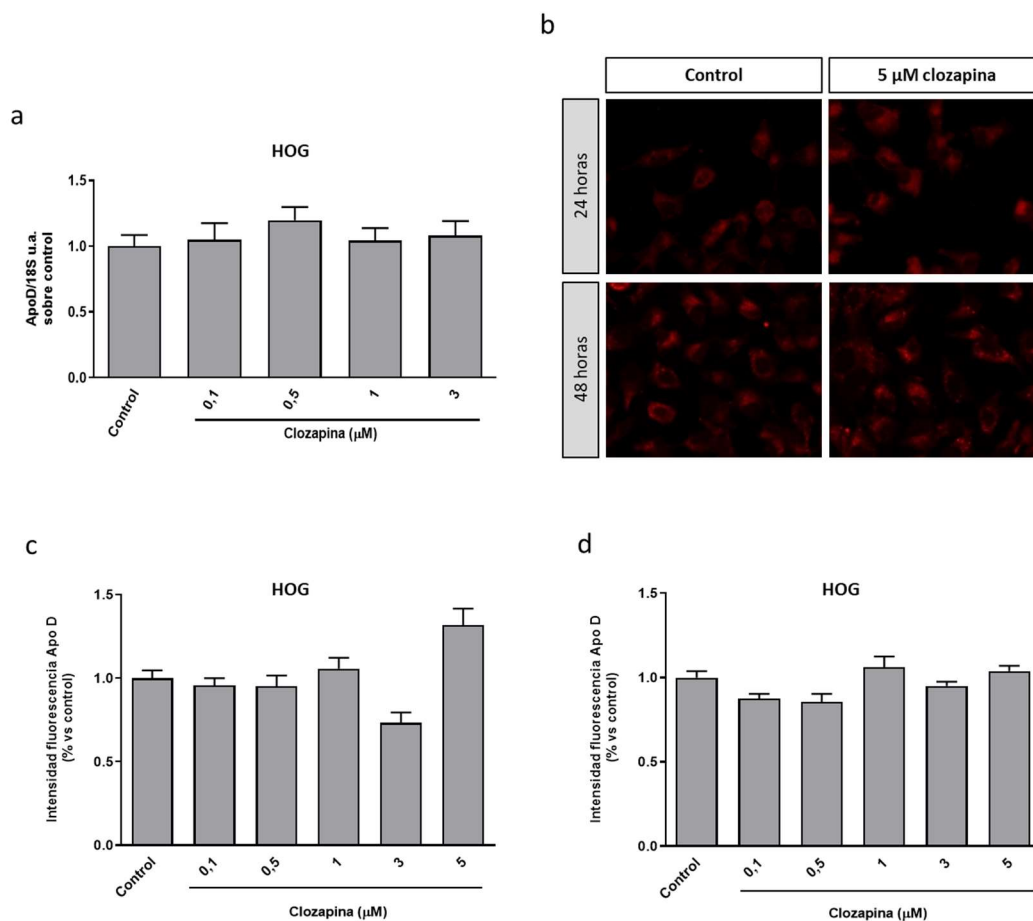


Figura 25. Expresión relativa del gen de la Apo D en células HOG tratadas con 0,1-3 μM de clozapina durante 24 horas. Los datos representan el cociente entre el gen de interés y la expresión de un gen endógeno no variable ARNr *18S*. Las barras representan la media \pm SEM de todas las mediciones (n=6-8) (a). Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (40X) de la expresión de la Apo D en células HOG en situación control y tratadas con 5 μM de clozapina durante 24 y 48 horas (b). Cuantificación densitométrica de la señal inmunocitoquímica de la Apo D tras 24 (c) y 48 horas (d) de tratamiento con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-5 μM) en células HOG. Los datos se representan como el porcentaje de intensidad de marcaje medio \pm SEM por célula por campo (40X) respecto al control (n=6).

Sin embargo, tal y como se puede apreciar en la Figura 26, cuando las células fueron tratadas con concentraciones crecientes del antipsicótico (0,1-3 μM) durante 24 horas, seguidas de otras 24 horas con 0,5 mM de CPZ, se observó un aumento significativo de la expresión de Apo D en las mismas concentraciones de CLO que revertían la pérdida de viabilidad ocasionada por el tratamiento con el tóxico (ver Figura 24a).

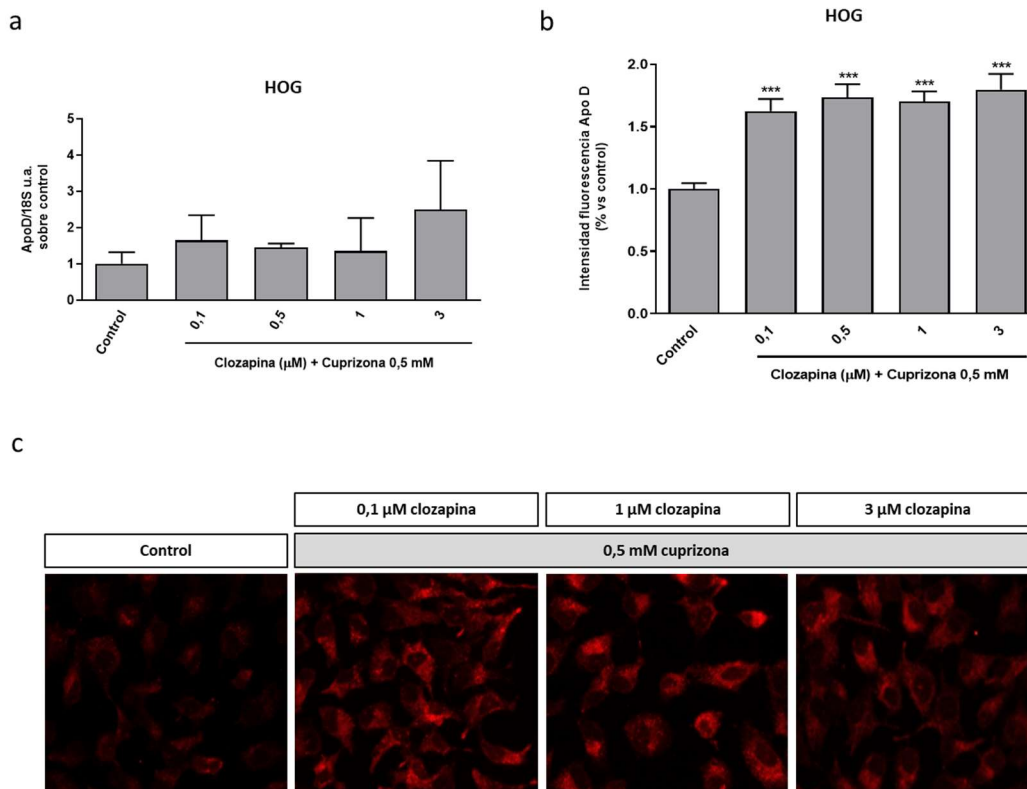


Figura 26. Expresión relativa del gen de la Apo D en células HOG tratadas con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-3 μM) durante 24 horas seguidas de 24 horas con 0,5 mM de cuprizona. Los datos representan el cociente entre el gen de interés y la expresión de un gen endógeno no variable ARNr *18S*. Las barras representan la media ± SEM de todas las mediciones (n=6-8) (a). Cuantificación densitométrica de la señal inmunocitoquímica de la Apo D tras 24 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-3 μM) seguidas de 24 horas con 0,5 mM de cuprizona en células HOG. Los datos se representan como el porcentaje de intensidad de marcaje medio ± SEM por célula por campo (40X) respecto al control (n=6) (b). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (40X) de la expresión de la Apo D en células HOG tratadas con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-3 μM) durante 24 horas seguidas de 24 horas con 0,5 mM de cuprizona (c).

En lo que respecta a las células SH-SY5Y, se obtuvieron resultados similares, aunque con algunos matices. Como se observa en las imágenes y en la cuantificación de la señal fluorescente (Figura 27), la CLO indujo cambios significativos en la expresión de la Apo D en las células SH-SY5Y, pero sólo a la concentración más alta (5 μM), tanto a las 24 como a las 48 horas de tratamiento.

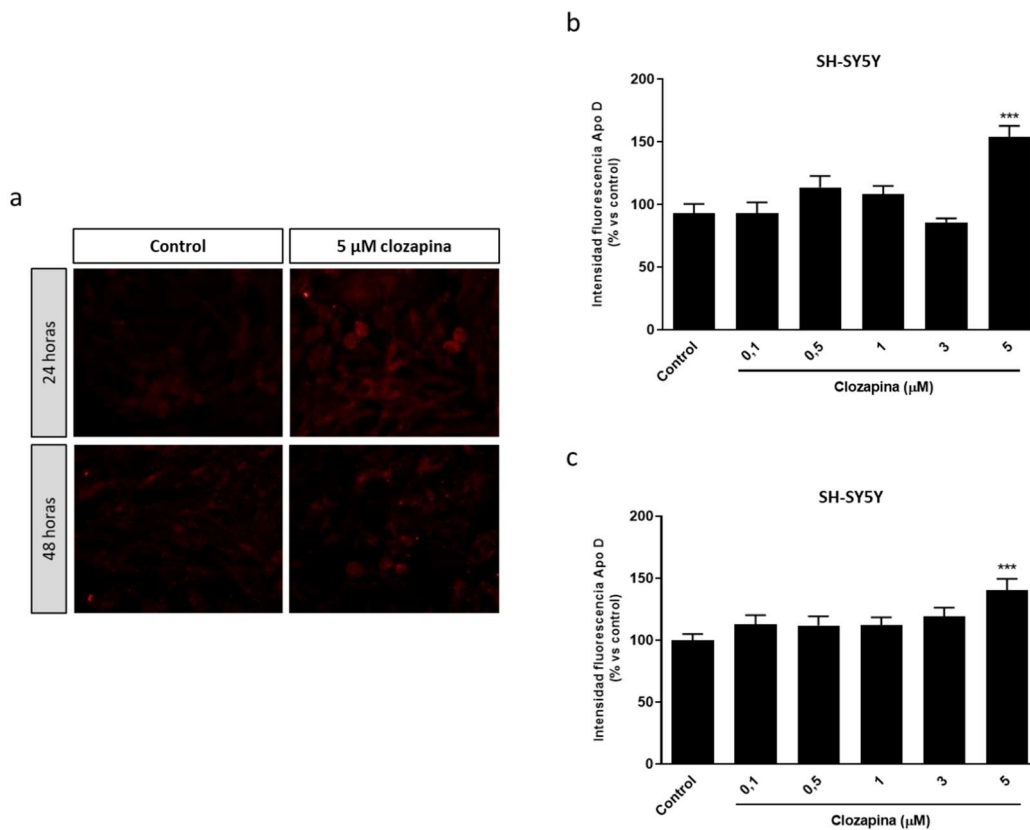


Figura 27. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (40X) de la expresión de la Apo D en células SH-SY5Y en situación control y tratadas con 5 μM de clozapina durante 24 y 48 horas (a). Cuantificación densitométrica de la señal inmunocitoquímica de la Apo D tras 24 (b) y 48 horas (c) de tratamiento con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-5 μM) en células SH-SY5Y. Los datos se representan como el porcentaje de intensidad de marcaje medio ± SEM por célula por campo (40X) respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$.

Curiosamente, si tras el tratamiento con CLO se añadía CPZ (0,5 mM) al medio de cultivo durante otras 24 horas la intensidad de marcaje para Apo D aumentaba de 1,5 a 2 veces respecto al control (Figura 28), justamente en las concentraciones responsables de los efectos neuroprotectores de la CLO (Figura 24b). Sin embargo, el tratamiento con 5 μM de CLO, que casi duplicaba los niveles de Apo D en las células SH-SY5Y (Figura 28), fue incapaz de prevenir el efecto citotóxico de la CPZ (Figura 24b).

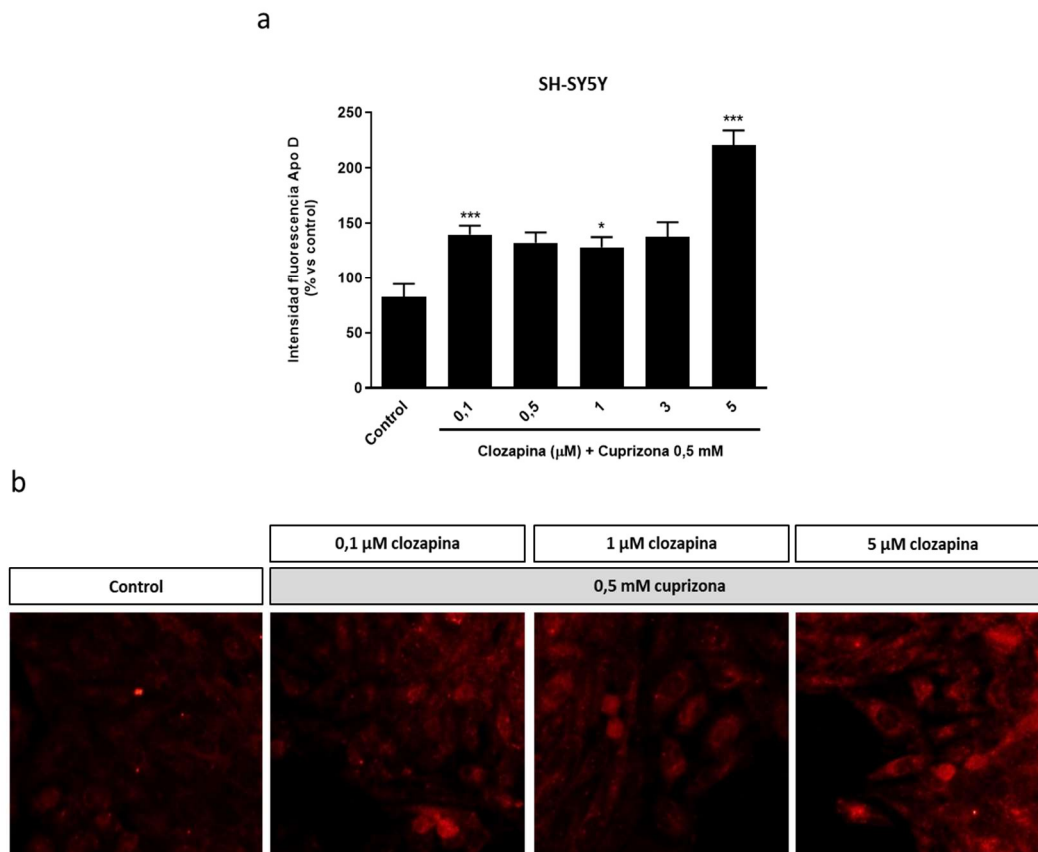


Figura 28. Cuantificación densitométrica de la señal inmunocitoquímica de la Apo D tras 24 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-5 µM) seguidas de 24 horas con 0,5 mM de cuprizona en células SH-SY5Y. Los datos se representan como el porcentaje de intensidad de marcaje medio ± SEM por célula por campo (40X) respecto al control (n=6) (a). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (40X) de la expresión de la Apo D en células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-5 µM) durante 24 horas seguidas de 24 horas con 0,5 mM de cuprizona (b).

1.9 La Apolipoproteína D, añadida de manera exógena, es capaz de incrementar la viabilidad celular y revertir el efecto citotóxico de la cuprizona tras ser internalizada mediante un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina

El siguiente paso para evaluar el potencial neuroprotector de la Apo D fue comprobar el impacto de la adición exógena, tanto de la Apo D humana purificada de fluido quístico mamario (hApo D) como de la Apo D humana recombinante comercial (hrApo D), en los modelos celulares de citotoxicidad inducida por CPZ. Por un lado, demostramos que ambas apolipoproteínas inducían un aumento significativo de la viabilidad de las células HOG en condiciones normales, es decir, cuando estas células eran tratadas con concentraciones crecientes de hApo D o hrApo D (0,05-1.000 nM) durante 24 horas (Figura 29a,b). Por otro lado, el análisis reveló que la hApo D prevenía de manera significativa la pérdida de viabilidad causada por la CPZ (0,5 mM) cuando ésta era añadida al

medio de cultivo 24 horas antes del tóxico (Figura 29c). Un efecto similar, aunque de menor magnitud, se observó en las células pretratadas con hrApo D (Figura 29d).

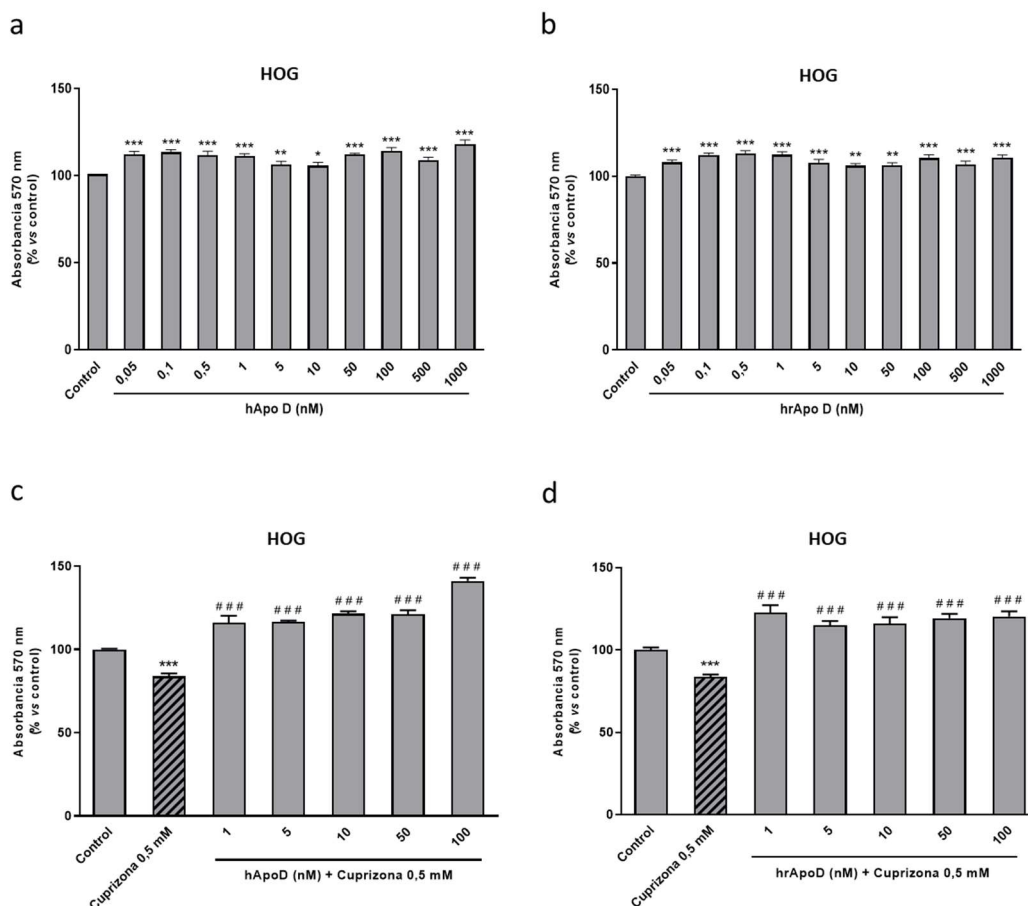


Figura 29. Panel superior: Ensayos MTT en células HOG tratadas con concentraciones crecientes (0,05-1.000 nM) de hApo D (a) o hrApo D (b) durante 24 horas. Panel inferior: Ensayos MTT en células HOG tratadas con concentraciones crecientes (1-100 nM) de hApo D (c) o de hrApo D (d) durante 24 horas seguidas de otras 24 horas de tratamiento con cuprizona (0,5 mM). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* cuprizona ### $p < 0,001$.

Estos hallazgos fueron confirmados en las células de neuroblastoma SH-SY5Y que carecen de expresión endógena de la Apo D (Figura 30). En este caso, todas las concentraciones de hApo D y hrApo D (1-5 nM) fueron capaces de prevenir el efecto tóxico de la CPZ tras 24 horas de tratamiento (Figura 30c,d).

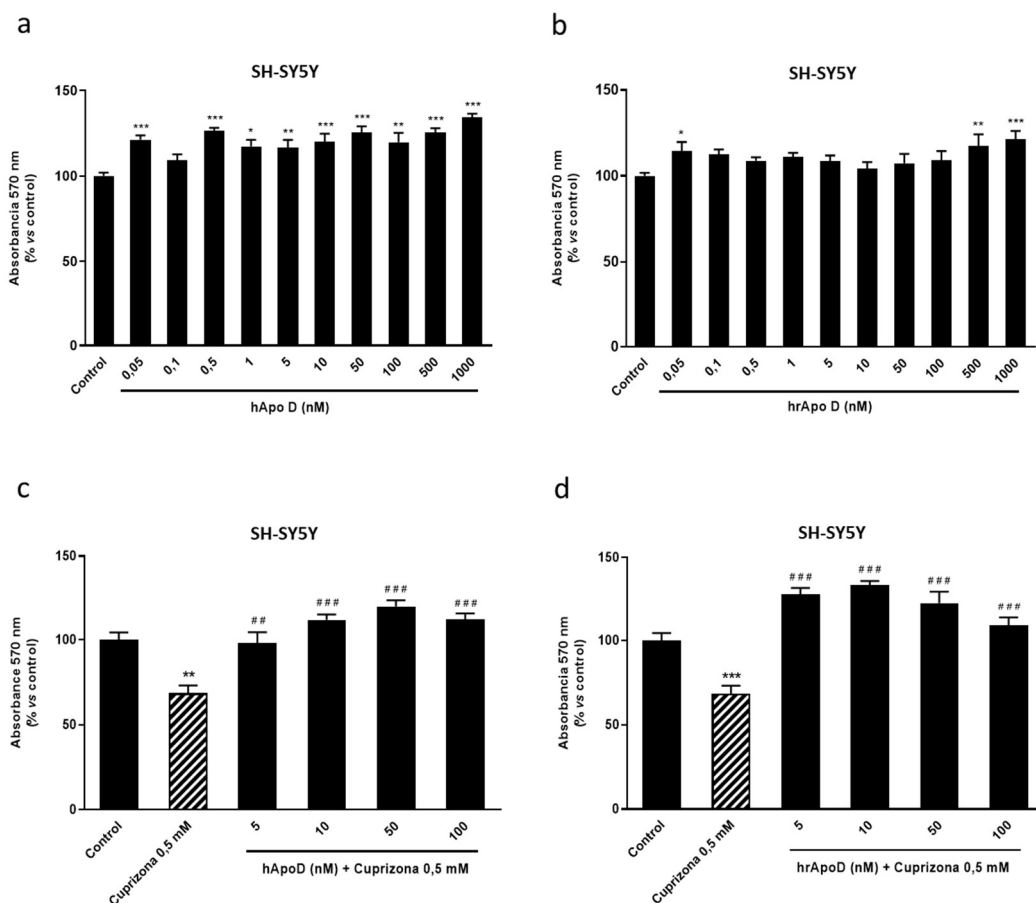


Figura 30. Panel superior: Ensayos MTT en células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes (0,05-1.000 nM) de hApo D (a) o hrApo D (b) durante 24 horas. Panel inferior: Ensayos MTT en células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes (1-100 nM) de hApo D (c) o de hrApo D (d) durante 24 horas seguidas de otras 24 horas de tratamiento con cuprizona (0,5 mM). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* cuprizona ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Por último, y para comprobar si la Apo D ejerce su actividad intra o extracelularmente mediante el secuestro o bloqueo directo de la CPZ o, en su defecto, de mediadores de estrés oxidativo, estudiamos el efecto neuroprotector de la Apo D frente a la pérdida de viabilidad causada por la CPZ en las células SH-SY5Y en presencia de diferentes inhibidores farmacológicos de la endocitosis. En primer lugar, se inhibió la endocitosis mediada por clatrina, así como la fagocitosis y micropinocitosis dependiente de actina mediante el pretratamiento de las células con clorhidrato clorpromazina (5 $\mu\text{g/ml}$) y citocalasina D (8 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente. Estos compuestos se añadieron al cultivo 24 horas antes de la hApo D; 24 horas después las células fueron tratadas con CPZ 0,5 mM. Como se muestra en la Figura 31, estas condiciones no parecen influir en el efecto ejercido por la hApo D (50-100 nM), incluso lo potenciaron. Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con dinasore (80 μM), un compuesto que bloquea la actividad GTPasa de la dinamina y la escisión de vesículas (endocitosis independiente

de clatrina), la hApo D no fue capaz de prevenir la pérdida de la viabilidad celular (20-25%) causada por la CPZ (Figura 31). No obstante, cabe señalar que dinasore aumenta, en cierto modo, el efecto citotóxico de la CPZ.

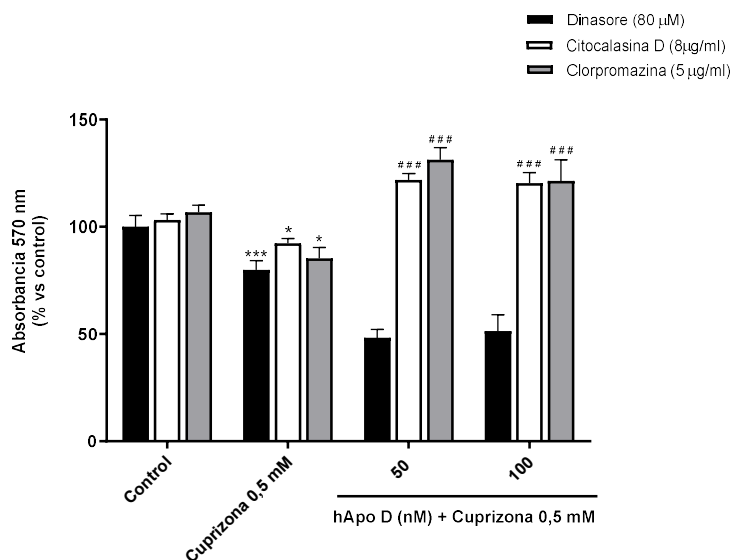


Figura 31. Ensayo MTT en células SH-SY5Y tratadas con dinastore (80 μM), citocalasina D (8 μg/mL) o clorhidrato de clorpromazina (5 μg/mL) previamente a la adición de hApo D en concentraciones crecientes (50-100 nM) durante 24 horas, seguidas de otras 24 horas de tratamiento con 0,5 mM de cuprizona. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de uno o dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* cuprizona ### $p < 0,001$.

1.10 El efecto neuroprotector de la Apolipoproteína D humana no está relacionado con una disminución de los niveles de estrés oxidativo inducidos por la cuprizona

En este trabajo hemos demostrado que la CPZ afecta a la función mitocondrial y a la respiración celular aeróbica en neuronas y células gliales y, consecuentemente, a la producción intracelular de ERO, tal y como se observa en la Figura 32. Efectivamente, los datos muestran que el tratamiento de las células HOG y SH-SY5Y con 0,5 y 1 mM de CPZ durante 24 horas aumentaba los niveles intracelulares de ERO de manera significativa. Como control del experimento se utilizó un pro-oxidante de efecto conocido como es el H₂O₂. Teniendo todo esto en cuenta y que el aumento de los niveles de la Apo D, bien sea de manera endógena o exógena, previene la pérdida de viabilidad causada por CPZ quisimos determinar si el efecto neuroprotector de la Apo D estaba relacionado con una disminución de los niveles de intracelulares de ERO. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la cantidad de estas especies reactivas entre las células SH-SY5Y pretratadas o no con hApo D (Figura 32).

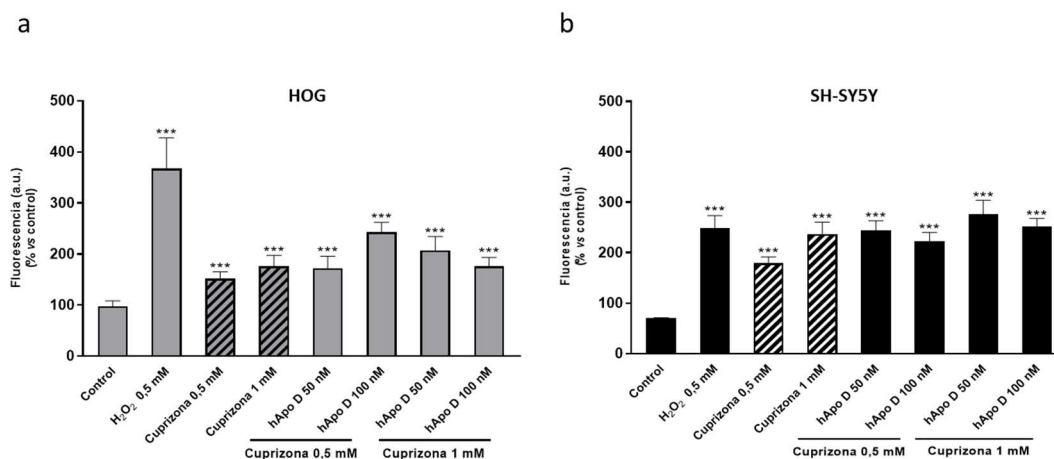


Figura 32. Producción de especies reactivas de oxígeno en células HOG (a) y SH-SY5Y (b) tratadas con concentraciones crecientes (50-100 nM) de hApo D durante 24 horas seguidas de otras 24 horas de tratamiento con 0,5 o 1 mM de cuprizona. Los cambios en los niveles de especies reactivas de oxígeno, medidos con la sonda fluorescente sensible oxidación, se representan como el porcentaje de emisión de fluorescencia respecto al control. Como control positivo se utilizó H₂O₂ 0,5 mM. Los datos se representan como la media ± SEM de 6 experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * = diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. u.a.: unidades arbitrarias de fluorescencia.

2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN UN MODELO MURINO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

2.1 La administración de cuprizona causa cambios a nivel sistémico y conductual que se revierten tras la suspensión del tratamiento

Para llevar a cabo esta parte de la Tesis Doctoral se procedió, en primer lugar, a la puesta a punto de un modelo murino de EM de citotoxicidad inducida por CPZ desarrollado con anterioridad por otros autores (Kipp et al., 2009; Vega-Riquer et al., 2019). Para ello, y tal y como se describe en el apartado Material y Métodos, ratones de la cepa C57BL/6 fueron alimentados con una dieta que contenía 0,25% (p/p) de CPZ durante 3 y 6 semanas, seguidas de otras 3 o 6 semanas sin CPZ en el caso de los animales con recuperación. Los ratones control fueron alimentados con el mismo pienso, pero sin el tóxico. Con el fin de evaluar los efectos de la CPZ a nivel sistémico se realizó un seguimiento del peso corporal de cada animal, se supervisó su conducta, y se valoró su coordinación motora en busca de algún signo distintivo.

Los resultados demostraron que la CPZ provocaba una disminución significativa del peso corporal de los ratones que alcanzaba su máximo a las 3 semanas de tratamiento (CPZ3), con un descenso del 32% respecto a los ratones control. En los animales sometidos a una dieta con CPZ durante 6 semanas (CPZ6), la pérdida de peso era un poco menor, situándose en torno al 17,7%. Además, se observó que este menor peso era revertido en los ratones

CPZ3 tras un periodo recuperación de 3 semanas (CPZ3+R3), mostrando valores similares a los del grupo control (Figura 33).

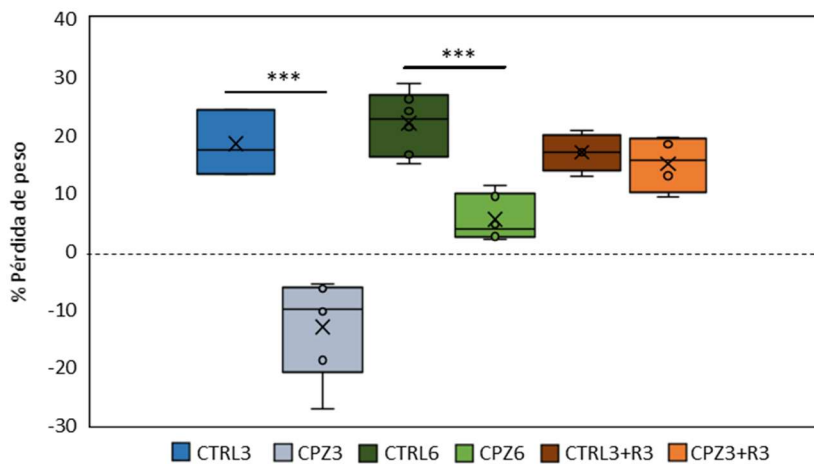


Figura 33. Variación del peso corporal de los ratones tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 6 semanas (CPZ6) y 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), así como sus controles. El peso se expresa como el porcentaje de variación del peso corporal, en gramos, respecto al inicio del tratamiento. Los datos se representan como la media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$.

En cuanto al comportamiento de los animales, tanto a observación del investigador como del cuidador los ratones CPZ3 presentaban una mayor hiperactividad con una conducta errática, saltarina y trepadora, que se redujo a medida que pasaban las semanas de tratamiento así como tras la fase de recuperación. Los resultados de la prueba de *Rota-rod*, por su parte, no evidenciaron diferencias significativas ni entre los distintos grupos experimentales ni entre éstos y sus controles, si bien es cierto que se percibía una tendencia a una mayor latencia a la caída en los ratones CPZ6, lo que podría relacionarse con la habituación al entrenamiento o con una mayor capacidad de concentración (Figura 34).

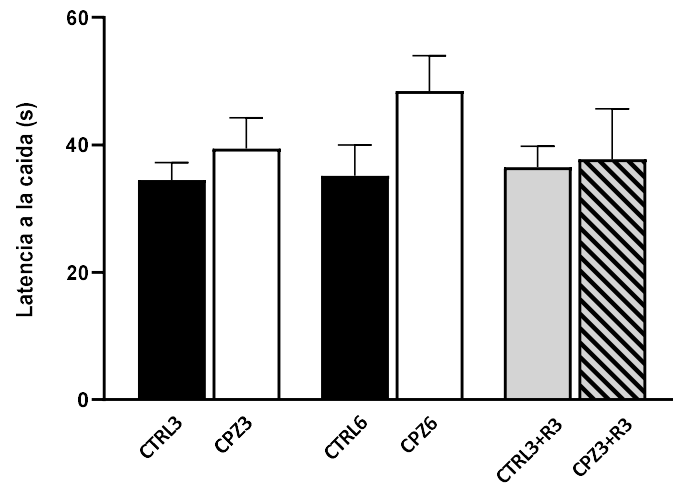


Figura 34. Tiempo de latencia a la caída en el *Rota-rod* de los ratones tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 6 semanas (CPZ6) y 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), así como sus controles. Los datos se representan como la media \pm SEM; n=6 para cada grupo. s: segundos

2.2 La administración de cuprizona induce desmielinización y otras alteraciones cerebrales que se revierten tras la suspensión del tratamiento

El siguiente paso fue estudiar el efecto de la CPZ en el cerebro de los ratones mediante la evaluación de diferentes parámetros como el grado de hidrocefalia, el espesor de la corteza motora, el peso cerebral y la cantidad de mielina. Para ello, se realizó un análisis mediante RM al inicio y al final del tratamiento.

Las imágenes ponderadas en T2 de las RM fueron utilizadas principalmente para estudiar el grado de desmielinización, como se mostrará más adelante, pero también permitieron detectar la presencia de hidrocefalia en los cerebros de los ratones tratados con CPZ (Figura 35). Las zonas hiperdensas observadas en las imágenes y el achatamiento del cerebro sugieren un mayor contenido de agua en el parénquima cerebral. Esta mayor densidad se observó a nivel de los ventrículos, que incrementaron su volumen, y del tejido nervioso circundante en los cerebros de ratones CPZ3, en comparación con sus controles, e independientemente del tiempo de recuperación (Figura 35; flechas), pero se hizo mucho más evidente en los ratones CPZ6.

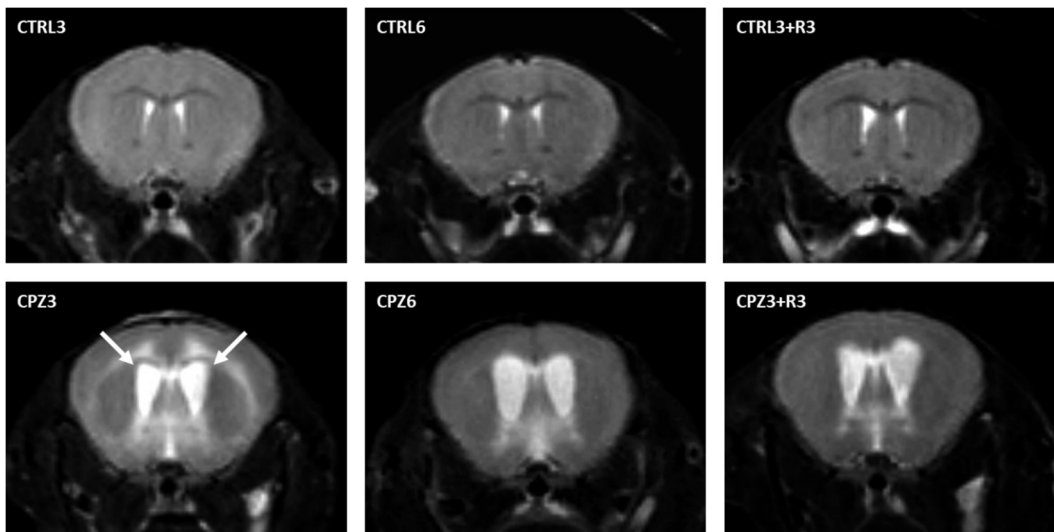


Figura 35. Resonancias magnéticas de cerebros de ratones control y tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 6 semanas (CPZ6) y 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3); cada imagen corresponde a un corte coronal (a nivel de la comisura anterior) ponderado en T2. Flechas: zonas hiperdensas.

La presencia de hidrocefalia también fue demostrada a través de la ratio de Evans, calculada como el cociente entre el diámetro cerebral y la distancia entre los ventrículos. En este caso, los ratones CPZ6 y CPZ3+R3 presentaban ratios de Evans con valores superiores a 0,3 que, además, resultaron ser significativamente superiores a los de sus controles (Figura 36).

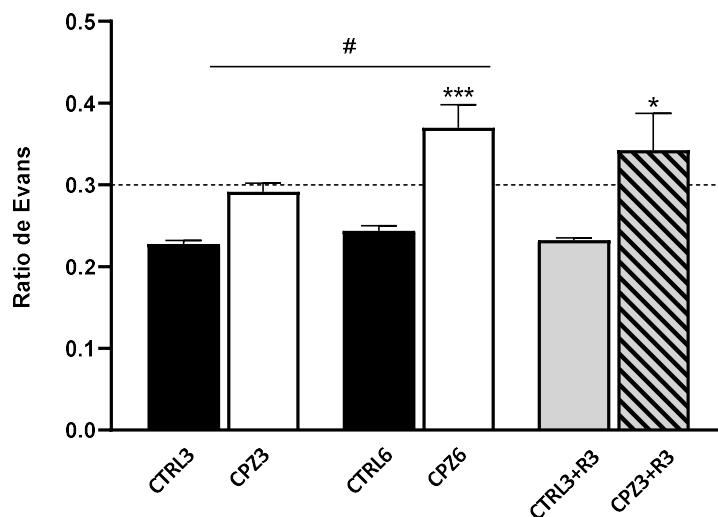


Figura 36. Grado de hidrocefalia (ratio Evans) de los ratones tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 6 semanas (CPZ6) y 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), así como sus controles. Los datos se representan como la media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ3 # $p < 0,05$.

RESULTADOS

A continuación, y en base a lo observado en las imágenes de RM, se consideró de interés estudiar si el tratamiento con CPZ también afectaba al espesor de la corteza motora y al peso cerebral de los animales. Tal y como se observa en la Figura 37a, los ratones CPZ3 y CPZ6 experimentaron una disminución significativa del grosor de su corteza motora respecto a los ratones no tratados. Cabe destacar que esta disminución fue mayor en el caso de los ratones CPZ6 (0,5 mm) que en los CPZ3 (0,3 mm). De manera interesante, los ratones CPZ3+R3 mostraron un grosor de la corteza similar al de los controles, lo que sugiere que los cambios inducidos por la CPZ se recuperan tras el cese del tratamiento. En cuanto al peso cerebral *post-mortem*, éste fue significativamente superior en los ratones CPZ3 y CPZ6 respecto a sus controles; incluso el peso del cerebro de los ratones CPZ3 fue significativamente mayor al de los CPZ6. En el caso de los ratones sometidos a un periodo de recuperación de 3 semanas no se apreciaron diferencias (Figura 37b).

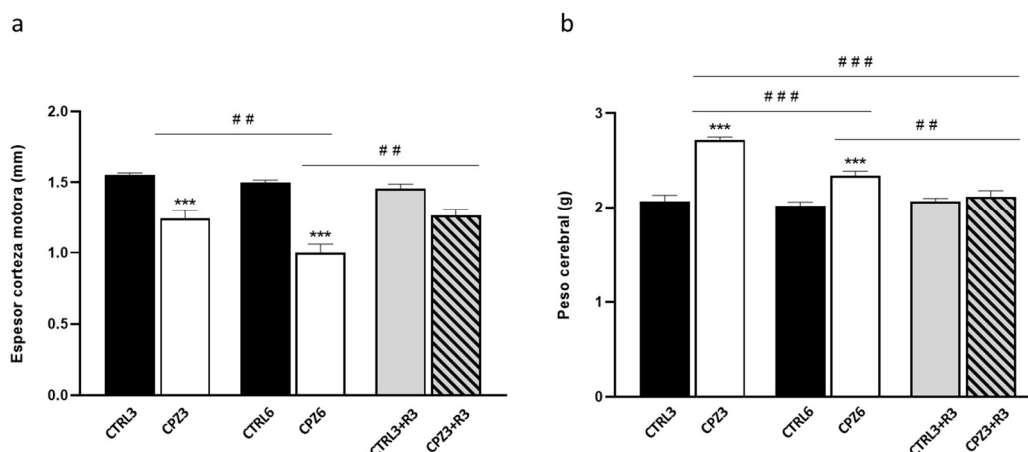


Figura 37. Espesor de la corteza motora (a) y peso cerebral (b) de los ratones tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 6 semanas (CPZ6) y 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), así como sus controles. Los datos se representan como la media \pm SEM; $n=6$ para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * = diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$. g: gramos; mm: milímetros

Por último, se analizó el grado de desmielinización causado por la CPZ, un efecto previamente descrito en este modelo murino de citotoxicidad (Xu et al., 2009). A medida que avanzaba la administración de CPZ, la inversión del contraste fue evidente en el cuerpo caloso de los ratones. Basándonos en que los haces mielínicos de la sustancia blanca son muchos más hiperdensos que la sustancia gris se cuantificó la señal de hiperdensidad detectada en el cuerpo caloso (a nivel de la comisura anterior) en las imágenes ponderadas en T2 de las RM (ver Figura 35). Los resultados revelaron que la CPZ causaba una disminución significativa del contenido de mielina tanto en los ratones CP3 como CPZ6 (Figura 38). Sin embargo, las RM no mostraron cambios de densidad óptica

a las 3 semanas de suspensión del tratamiento con CPZ, en comparación con sus controles, lo que sugiere que a la desmielinización inducida de manera experimental en este modelo animal le sigue un proceso de remielinización.

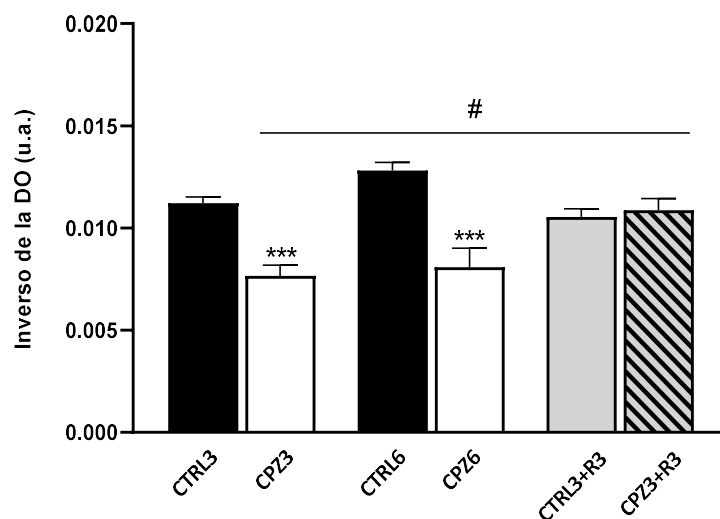


Figura 38. Cuantificación del grado de desmielinización del cuerpo calloso de los ratones tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 6 semanas (CPZ6) y 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), así como sus controles. Los datos se representan como la media \pm SEM de la densidad óptica de las imágenes T2 de las RM; $n=6$ para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. #= diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ3 # $p < 0,05$. DO: densidad óptica; u.a.: unidades arbitrarias de medida.

Por otro lado, y para confirmar la desmielinización observada en las imágenes de RM, se llevó a cabo un análisis histológico en secciones cerebrales de ratón teñidas con LFB (ver Material y Métodos). Como se puede apreciar, la intensidad del marcaje azul correspondiente a la mielina, disminuyó en el cuerpo calloso de los cerebros de ratones tratados con CPZ, lo cual se hizo mucho más evidente en los ratones CPZ6 (Figura 39). Al igual que en el caso de las RM, la interrupción del tratamiento con el tóxico indujo un proceso de remielinización que alcanzó su máximo a las 6 semanas de recuperación, tanto en los ratones CPZ3 como CPZ6. En las imágenes se observa como la intensidad del marcaje azul aumentó hasta niveles similares a los controles (Figura 39). La cuantificación densitométrica de la señal histoquímica de LFB confirmó las observaciones descritas anteriormente. Así, la cantidad de mielina del cuerpo calloso de los ratones disminuyó de manera significativa tanto a las 3 (Figura 40a) como a las 6 semanas de tratamiento con CPZ (Figura 40b). Nuevamente, los datos revelaron que la pérdida de mielina era revertida de manera significativa cuando los ratones eran sometidos a un periodo de recuperación de 3 o 6 semanas sin el tóxico, volviendo a alcanzar incluso los valores control (Figura 40).

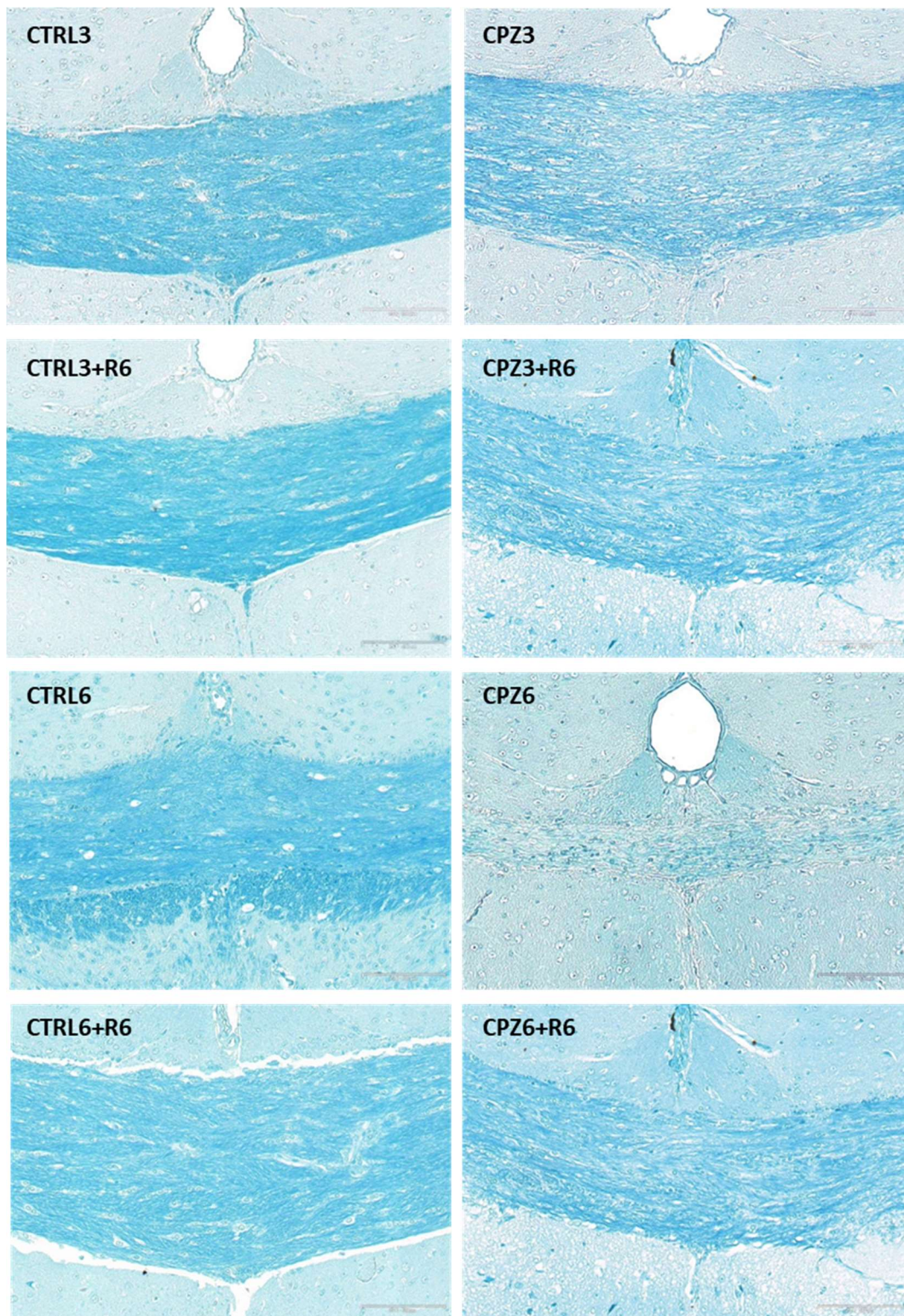


Figura 39. Imágenes representativas de secciones coronales de la zona central del cuerpo caloso (nivel de 0-0,3 Bregma), teñidas con *Luxol Fast Blue*, de cerebros de ratones control y tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 3 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ3+R6), 6 semanas (CPZ6), y 6 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ6+R6). Aumento 25X; barra calibración: 10 μ m.

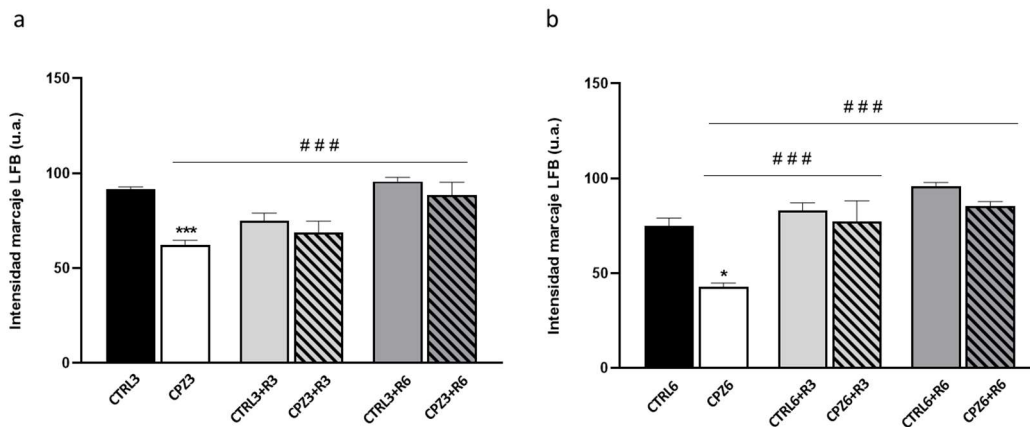


Figura 40. Cuantificación densitométrica del marcaje de la mielina con *Luxol Fast Blue* (LFB) en el cuerpo calloso de los ratones tratados con cuprizona durante a) 3 semanas (CPZ3), 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), 3 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ3+R6), así como sus controles, y b) 6 semanas (CPZ6), 6 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ6+R3), 6 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ6+R6), así como sus controles. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ ### $p < 0,001$. u.a.: unidades arbitrarias de medida.

2.3 La administración de cuprizona induce una disminución en la expresión de la Apolipoproteína D a nivel del cuerpo calloso que se revierte tras la suspensión del tratamiento

Una vez caracterizado el efecto de la CPZ a nivel cerebral en el modelo murino de EM inducida por citotoxicidad, el siguiente paso fue analizar la expresión de la Apo D en el cuerpo calloso de estos ratones mediante inmunohistoquímica. Como se observa en las imágenes, los ratones control mostraron un marcaje claro para la Apo D a nivel del citoplasma de los OLGs (Figura 41; flechas); éste parecía más intenso alrededor del núcleo, aunque también se extendía a sus prolongaciones. También se apreció una señal nítida para esta apolipoproteína en algunos pericitos próximos a los vasos sanguíneos (Figura 41; cabeza de flecha). De manera interesante, la presencia de la Apo D disminuyó hasta casi su total desaparición en el cuerpo calloso de los ratones tratados con CPZ durante 3 y 6 semanas. No obstante, la supresión del tratamiento con el tóxico supuso una recuperación de la expresión oligodendrocítica de la Apo D hasta los niveles de los controles (Figura 41).

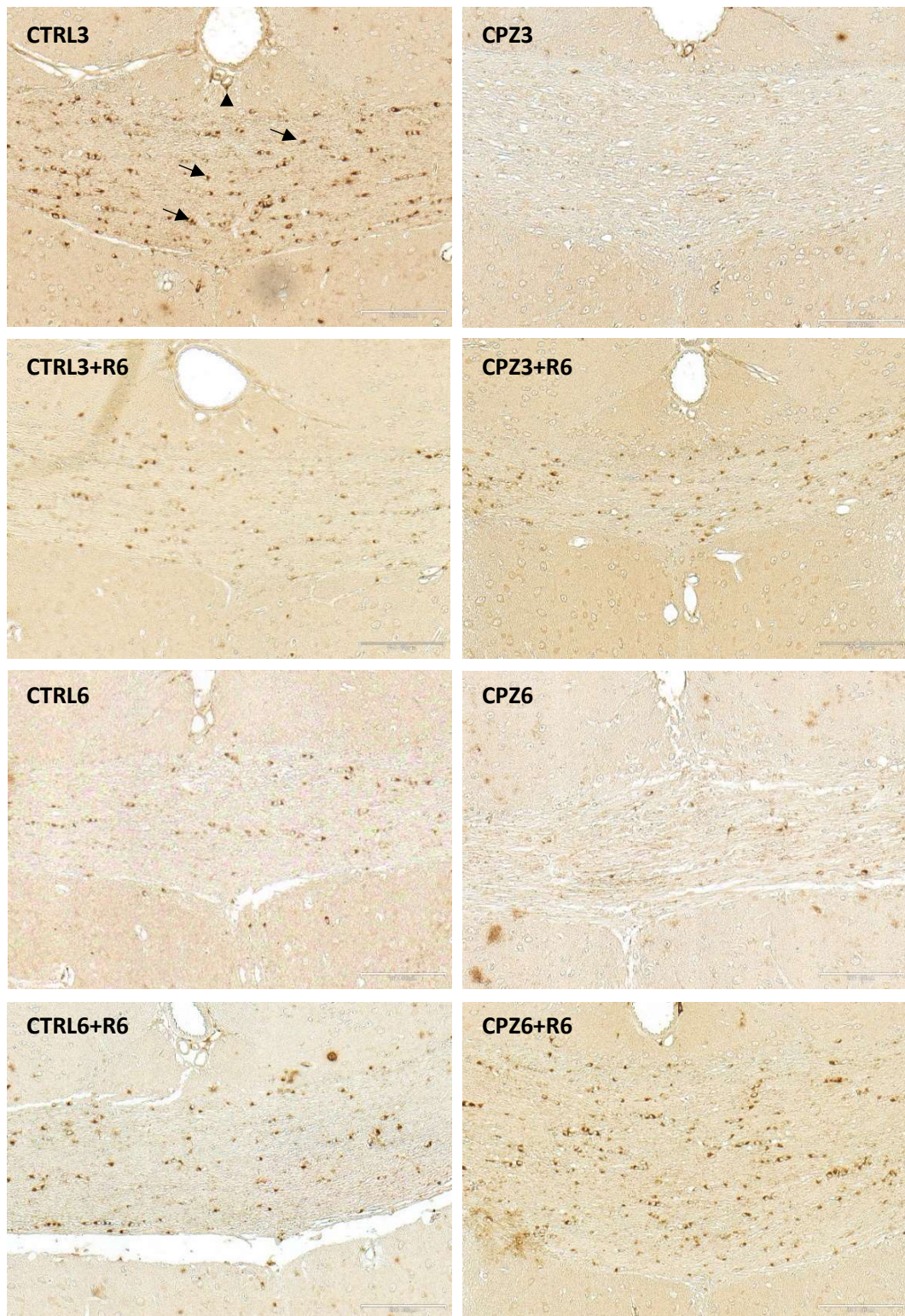


Figura 41. Imágenes representativas de la expresión de la Apo D secciones coronales de la zona central del cuerpo calloso (nivel de 0-0,3 Bregma) de cerebros de ratones control y tratados con cuprizona durante 3 semanas (CPZ3), 3 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ3+R6), 6 semanas (CPZ6), y 6 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ6+R6). Flechas: oligodendrocitos. Cabezas de flecha: pericitos. Aumento 25X; barra calibración: 10 μ m.

De la misma manera, la cuantificación de la señal inmunohistoquímica demostró que la intensidad de marcaje para la Apo D disminuía de manera significativa tras el tratamiento de los ratones con CPZ durante 3 y 6 semanas. Sin embargo, el inmunomarcaje se recuperaba, e incluso superaba los niveles control, en todos los ratones sometidos a un periodo de recuperación (Figura 42).

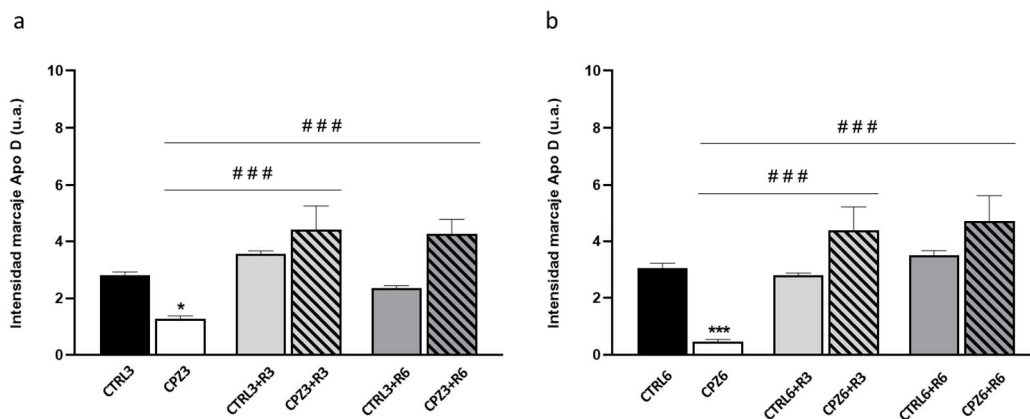


Figura 42. Cuantificación densitométrica del marcaje para la Apo D en el cuerpo calloso de los ratones tratados con cuprizona durante a) 3 semanas (CPZ3), 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), 3 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ3+R6), así como sus controles, y b) 6 semanas (CPZ6), 6 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ6+R3), 6 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ6+R6), así como sus controles. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ ### $p < 0,001$. u.a.: unidades arbitrarias de medida.

Para caracterizar en mayor profundidad el efecto de la CPZ sobre el patrón de expresión de la Apo D también se realizó un recuento del número de células (OLGs) inmunorreactivas para la misma en el cuerpo calloso de los ratones sometidos a las distintas situaciones experimentales. La Figura 43 muestra que el número de células positivas para Apo D, a nivel del cuerpo calloso, disminuía de manera significativa en los ratones CPZ3 y CPZ6 respecto a sus controles. En línea con los resultados previamente descritos, se observó una recuperación del número de células positivas para la Apo D en esta zona cerebral en los ratones tras 3 y 6 semanas de recuperación.

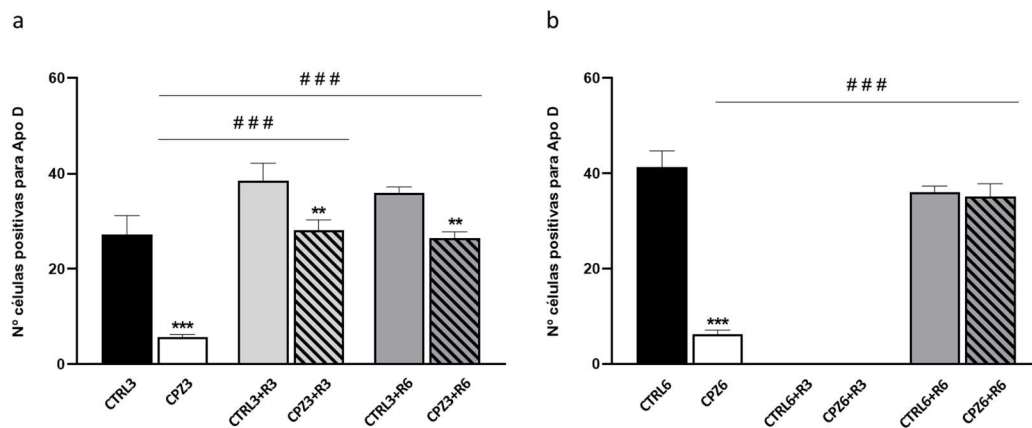


Figura 43. Cuantificación del número de células inmunopositivas para la Apo D (oligodendrocitos) en el cuerpo calloso de los ratones tratados con cuprizona durante a) 3 semanas (CPZ3), 3 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ3+R3), 3 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ3+R6), así como sus controles, y b) 6 semanas (CPZ6), 6 semanas seguidas de otras 3 semanas de recuperación (CPZ6+R3), 6 semanas seguidas de otras 6 semanas de recuperación (CPZ6+R6), así como sus controles. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ ### $p < 0,001$.

2.4 La clozapina no ejerce ningún efecto sobre la pérdida de mielina causada por el tratamiento con cuprizona a nivel del cuerpo calloso

Al igual que con el modelo celular de EM de citotoxicidad inducida por CPZ, el siguiente paso en nuestra investigación fue evaluar el efecto neuroprotector potencial de la CLO en el modelo murino de EM. Para ello, los animales fueron tratados con CLO, sola o en combinación con CPZ, durante 3 o 6 semanas. En este caso, tal y como se observa en las imágenes de las secciones cerebrales de ratón teñidas con LFB así como en sus respectivas cuantificaciones densitométricas, la CLO no parece ejercer ningún efecto sobre la pérdida de mielina causada por la CPZ en el cuerpo calloso de los animales objeto de estudio (Figura 44 y Figura 45).

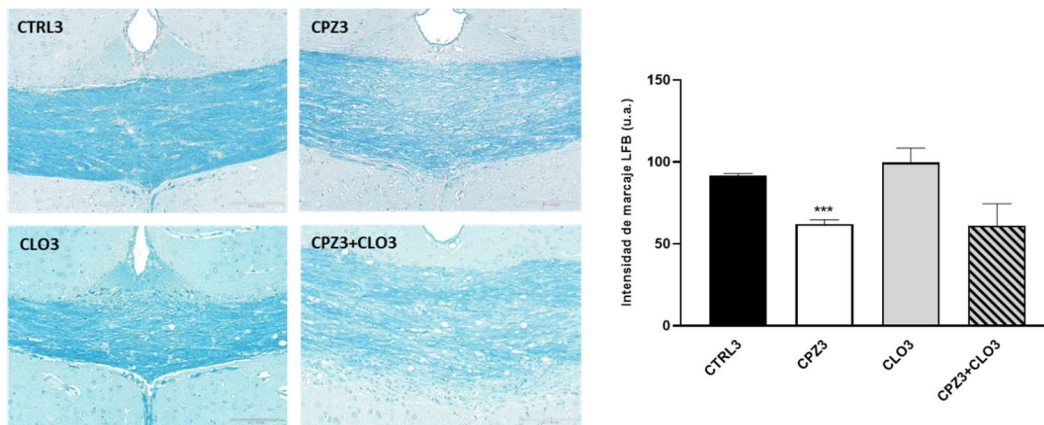


Figura 44. Izquierda: Imágenes representativas de secciones coronales de la zona central del cuerpo calloso (nivel de 0-0,3 Bregma), teñidas con *Luxol Fast Blue* (LFB), de cerebros de ratones control, tratados con cuprizona, con clozapina o con ambas durante 3 semanas. Aumento 25X; barra calibración: 10 μ m. Derecha: Cuantificación densitométrica del marcaje de la mielina con LFB. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. u.a.: unidades arbitrarias de medida.

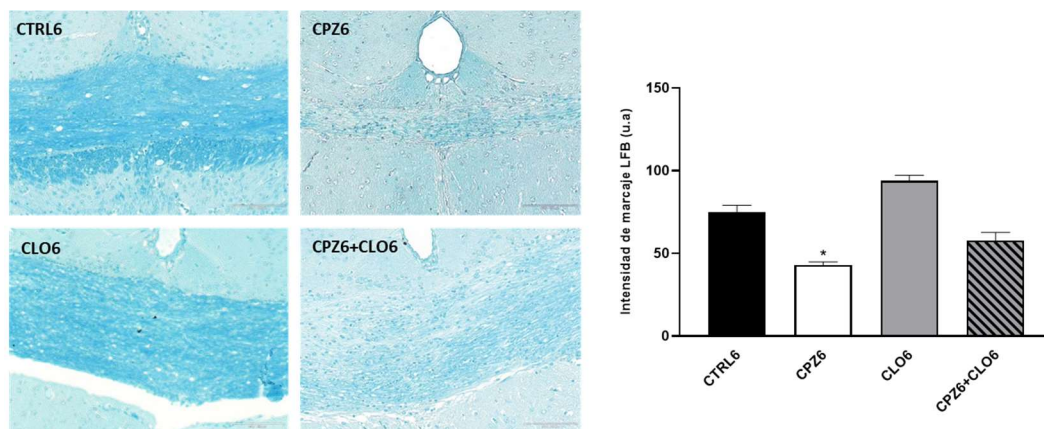


Figura 45. Izquierda: Imágenes representativas de secciones coronales de la zona central del cuerpo calloso (nivel de 0-0,3 Bregma), teñidas con *Luxol Fast Blue* (LFB), de cerebros de ratones control, tratados con cuprizona, con clozapina o con ambas durante 6 semanas. Aumento 25X; barra calibración: 10 μ m. Derecha: Cuantificación densitométrica del marcaje de la mielina con LFB. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$. u.a.: unidades arbitrarias de medida.

2.5 La clozapina contrarresta la disminución de la expresión de la Apolipoproteína D causada por el tratamiento con cuprizona a nivel del cuerpo caloso

A pesar de que la CLO, al menos en la dosis y tiempos de tratamiento ensayados, no fue capaz de revertir la pérdida de mielina causada por la CPZ, quisimos comprobar cuál era el efecto de este antipsicótico sobre los niveles de expresión de la Apo D en nuestro modelo. Las imágenes de las pruebas inmunohistoquímicas para la Apo D realizadas en secciones cerebrales de ratones tratados con CPZ, CLO, o con ambos compuestos al mismo tiempo durante 3 o 6 semanas, demostraron que la CLO no influía en la expresión oligodendrocítica de esta apolipoproteína en condiciones normales. Sin embargo, cuando la CLO era administrada al mismo tiempo que la CPZ atenuaba la pérdida de expresión de la Apo D causada por el tratamiento con CPZ; la intensidad de la señal en los ratones CPZ3 y CPZ6 era similar a la de los controles (Figura 46 y Figura 47 izquierda).

En esta misma línea, la cuantificación de la señal inmunohistoquímica reveló una disminución significativa en la intensidad del marcaje para la Apo D después del tratamiento de los ratones con CPZ durante 3 y 6 semanas. No obstante, cuando la CLO era administrada junto con el tóxico se observó una recuperación del inmunomarcaje que llegó a ser incluso similar al de los ratones control (Figura 46 y Figura 47 derecha).

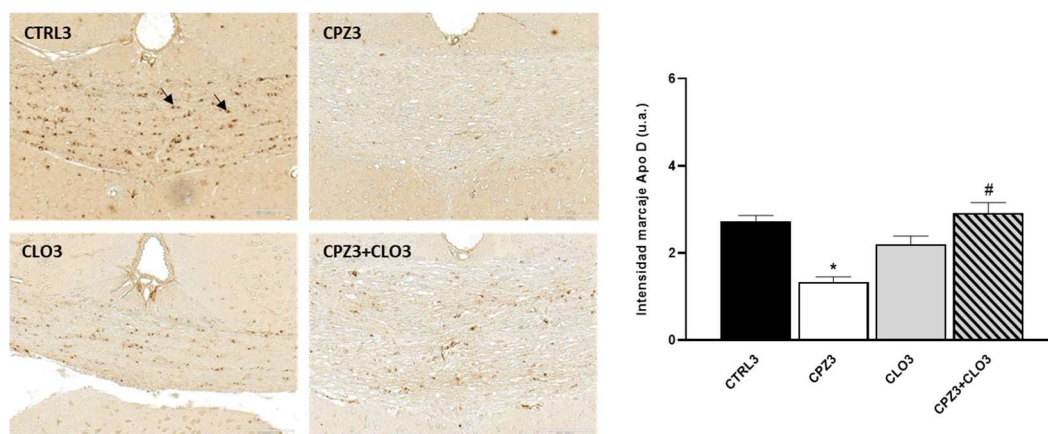


Figura 46. Izquierda: Imágenes representativas de la expresión de la Apo D secciones coronales de la zona central del cuerpo caloso (nivel de 0-0,3 Bregma) de cerebros de ratones control, tratados con cuprizona, con clozapina o con ambas durante 3 semanas. Flechas: oligodendrocitos. Aumento 25X; barra calibración: 10 μ m. Derecha: Cuantificación densitométrica del marcaje para la Apo D. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ3 # $p < 0,05$. u.a.: unidades arbitrarias de medida.

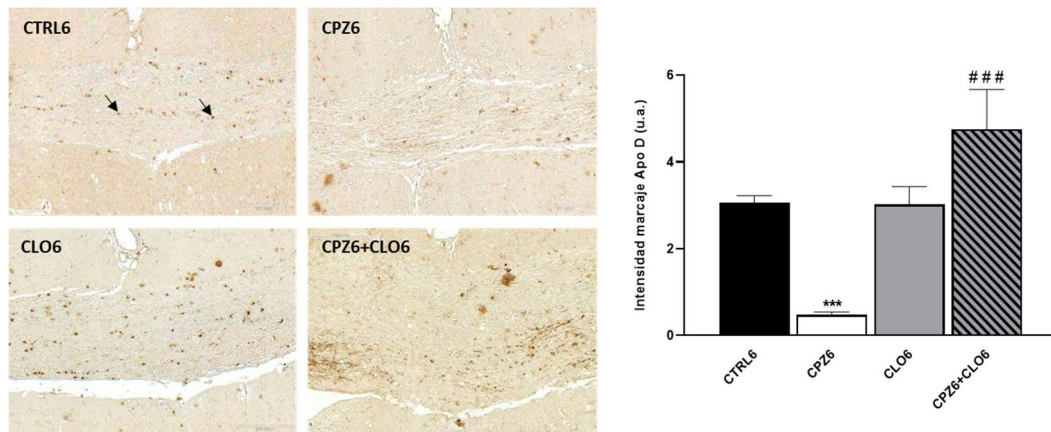


Figura 47. Izquierda: Imágenes representativas de la expresión de la Apo D secciones coronales de la zona central del cuerpo calloso (nivel de 0-0,3 Bregma) de cerebros de ratones control, tratados con cuprizona, con clozapina o con ambas durante 6 semanas. Flechas: oligodendrocitos. Aumento 25X; barra calibración: 10 μ m. Derecha: Cuantificación densitométrica del marcaje para la Apo D. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; n=6 para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. ### = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ6 # $p < 0,001$. u.a.: unidades arbitrarias de medida.

Finalmente, se llevó a cabo un recuento del número de OLGs que expresaban la Apo D. Los datos demostraron una disminución significativa en el número de células positivas para esta apolipoproteína en el cuerpo calloso de los ratones tratados con CPZ durante 3 y 6 semanas, en comparación con sus respectivos controles. En consonancia con los resultados descritos anteriormente, se observó que los ratones co-tratados con CPZ y CLO mantenían constante el número de células positivas para la Apo D en esta región cerebral (Figura 48). Todo parece indicar que la CLO es capaz de mantener los niveles de expresión normales de la Apo D en los OLGs a pesar del efecto negativo que ejerce la CPZ.

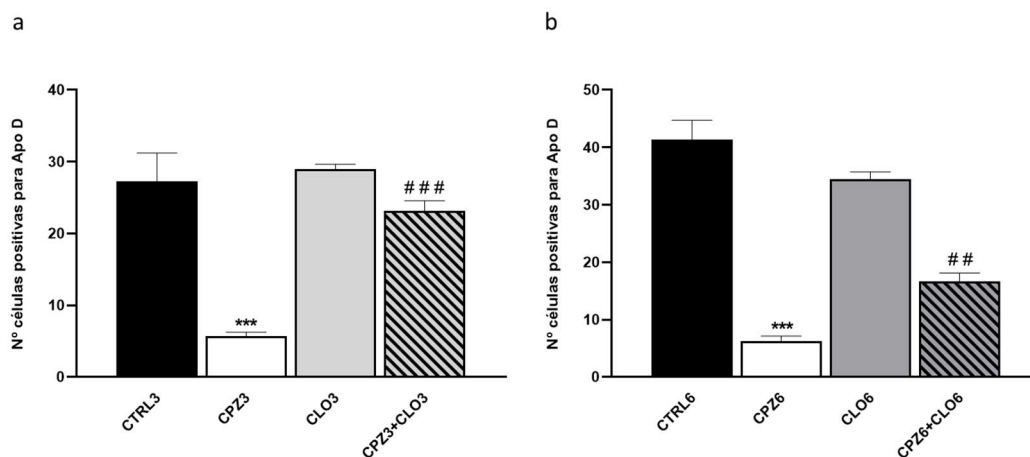


Figura 48. Cuantificación del número de células inmunopositivas para la Apo D (oligodendrocitos) en el cuerpo caloso de los ratones a) control, tratados con cuprizona, con clozapina o con ambas durante 3 semanas, y b) control, tratados con cuprizona, con clozapina o con ambas durante 6 semanas. Los datos se representan como la intensidad de marcaje media \pm SEM; $n=6$ para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * = diferencias estadísticamente significativas *versus* control *** $p < 0,001$. # = diferencias estadísticamente significativas *versus* CPZ ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Discusión

1 DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE UN MODELO CELULAR REVERSIBLE DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

Desde que en 1868 Jean-Martin Charcot realizase la primera descripción clínica de la EM, atribuyendo sus signos y síntomas a unas lesiones cerebrales distintivas en forma de placas (*la sclérose en plaques*), mucho se ha estudiado e investigado sobre esta enfermedad (Murray, 2009; Orrell, 2005). A pesar de los avances científicos efectuados en la comprensión de los mecanismos celulares, genéticos, fisiopatológicos y epidemiológicos implicados en la EM, hoy en día sigue sin conocerse su causa exacta, lo que dificulta su diagnóstico, así como su cura definitiva. Lo que sí está claro, a estas alturas, es que el uso de modelos *in vivo* e *in vitro* es fundamental para el estudio de una patología tan compleja como ésta, caracterizada por una etiología multifactorial, una gran variabilidad interindividual en las manifestaciones clínicas, y un curso prolongado en el tiempo. Todo ello hace que la investigación traslacional de la EM cuente con importantes limitaciones, máxime si añadimos el hecho del difícil acceso al tejido cerebral humano y que las muestras de pacientes sólo se pueden obtener *post-mortem* (Barkhof et al., 2010; Palumbo, 2017).

Actualmente, existen distintos modelos experimentales que mimetizan y reproducen aspectos específicos de la sintomatología y fisiopatología de la EM y que están enfocados al estudio de los procesos relacionados con la patogénesis, la evolución de la enfermedad, los mecanismos de des/remielinización, e incluso a la evaluación de las intervenciones terapéuticas (Sanabria-Castro et al., 2020). En este sentido, promover la regeneración y remielinización tempranas del SNC parece ser el enfoque más prometedor en el tratamiento de esta patología. Entre las moléculas que podrían cumplir dicho propósito destaca, por su papel neuroprotector, la Apo D; molécula cuya sobreexpresión en células gliales durante procesos des/remielinizantes en pacientes de EM ha sido constatada por nuestro grupo de investigación (Navarro et al., 2018). Además, la aparición de la hipótesis de “dentro hacia afuera” para explicar la fisiopatología de la enfermedad, que postula la neurodegeneración como la causa primaria de la EM, en vez de un evento de carácter autoinmune (hipótesis de “fuera hacia adentro”), hace necesario el uso de modelos que reflejen el daño glial y neuronal en ausencia de inflamación manifiesta. En este contexto, el modelo de ratón de EM de desmielinización inducido por CPZ aparece como el más apropiado a tal fin (Kipp et al., 2012; Procaccini et al., 2015; van der Star et al., 2012), representando una herramienta útil para desarrollar terapias novedosas que protejan las células del SN y estimulen la remielinización (Palumbo & Pellegrini, 2017). No obstante, pese a sus ventajas, se necesita un análisis más profundo para determinar adecuadamente los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la EM como, por ejemplo, las vías intracelulares que conducen al daño neuronal y a la muerte apoptótica de los OLGs (Buntinx et al., 2003; van der Star et al., 2012). Para ello, se requiere un modelo más simple, de mayor reproducibilidad y menor dificultad técnica, como el modelo celular de EM de citotoxicidad inducida por CPZ.

En esta Tesis Doctoral nos propusimos, en primer lugar, el desarrollo y puesta a punto de un modelo celular de EM de citotoxicidad inducida por CPZ en dos líneas celulares, una de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y otra de oligodendrocitos humanos (HOG), así como en su co-cultivo (SH-SY5Y/HOG). Además, y ya que la CPZ como quelante de iones de cobre afecta a la función mitocondrial, evaluamos el efecto ejercido por el tóxico sobre la viabilidad de estas células. Nuestros resultados mostraron no sólo que la CPZ altera el estado funcional de las mitocondrias y la respiración celular aeróbica, comprometiendo el metabolismo de ambas líneas, sino que el tiempo de exposición incrementa este daño. En realidad, existen pocos trabajos en la literatura que analicen el efecto de la CPZ en modelos celulares y, además, los que hay presentan resultados contradictorios. Benetti y cols., (2010) observaron que el tratamiento con CPZ, a una concentración de 200 μM , durante 3 semanas no producía una pérdida de viabilidad en neuronas SH-SY5Y y GN11 (Benetti et al., 2010). Un estudio posterior reveló que las tasas de proliferación y supervivencia de las células SH-SY5Y, microglía, astrocitos y células precursoras de OLGs no se veían afectadas por el tratamiento a corto plazo con diferentes concentraciones de este tóxico (Bénardais et al., 2013b). Por el contrario, otros autores demostraron que la CPZ induce una disminución en la función metabólica en la línea oligodendroglial MO3.13 (Taraboletti et al., 2017). Por un lado, estas discrepancias entre estudios pueden deberse a las distintas condiciones experimentales utilizadas, por ejemplo, concentraciones más bajas del quelante o tiempos de exposición más cortos. Por otro lado, la ausencia de cambios observables en la viabilidad celular, tras el tratamiento con CPZ, podría tener su origen en la metodología utilizada. En concreto, se han descrito problemas importantes de sensibilidad y especificidad en el ensayo de reducción de resazurina, comercialmente conocida como alamarBlue®, para evaluar la viabilidad celular en comparación con el ensayo MTT (Chen et al., 2018; O'Brien et al., 2000; Uzarski et al., 2017).

Como ya hemos mencionado, a pesar de que el modelo murino de CPZ ha constituido, durante más de 50 años, uno de los mejores modelos para el estudio de enfermedades desmielinizantes como la EM, el mecanismo de acción de la CPZ no se conoce exactamente. En la actualidad, la principal hipótesis es que la CPZ podría pasar a través de las membranas biológicas y comprometer la función mitocondrial actuando directamente sobre los niveles intracelulares de iones de cobre (II), afectando a la actividad de la enzima mitocondrial citocromo C oxidasa (complejo IV) de la cadena transportadora de electrones provocando una disfunción metabólica (Benetti et al., 2010; Gudi et al., 2014; Pasquini et al., 2007; Vega-Riquer et al., 2019). Los resultados de los ensayos MTT mostrados en este trabajo respaldarían esta posibilidad. Algo similar ocurre con la enzima antioxidante superóxido dismutasa $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (SOD1) a nivel del espacio intermembrana mitocondrial (Praet et al., 2014; Xu et al., 2013). Además, la CPZ también reduciría los niveles de glutatión (GSH), sustrato de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en la reacción de reducción de las ERO producidas de manera fisiológica por las células en condiciones normales (Praet et al., 2014). Al final, la disminución en la producción de energía y el aumento del estrés oxidativo conducirían al daño mitocondrial y a la aparición de megamitocondrias disfuncionales y, eventualmente, a la muerte celular, como ya ha sido demostrado *in vivo* tanto en hepatocitos como en OLGs (Matsushima & Morell, 2001; Pasquini et al., 2007;

Patergnani et al., 2017). Sin embargo, algunos autores han sugerido que la CPZ también podría actuar de manera independientemente a su función como quelante de cobre (Moldovan et al., 2015; Taraboletti et al., 2017). En este sentido, un trabajo reciente de Taraboletti y colaboradores (2017), indica que la CPZ compromete la supervivencia de los OLGs al causar alteraciones importantes en el metabolismo de los ácidos grasos (Taraboletti et al., 2017). También es relevante la relación descrita entre la intoxicación con CPZ, el estrés oxidativo y la apoptosis en OLGs maduros (Hesse et al., 2010; Praet et al., 2014; Vega-Riquer et al., 2019).

Ya sea como quelante de cobre o no, un dato interesante a destacar de este trabajo es la diferente sensibilidad de las líneas celulares a la CPZ, siendo las células gliales más sensibles que las neuronas. Así, los resultados de los ensayos de OCR confirmaron que la CPZ puede afectar, teóricamente, a todos los tipos celulares pero que la sensibilidad de cada célula depende de múltiples factores como la especie o el tejido del que procedan (Torkildsen et al., 2008). Bénardais y colaboradores, (2013b) demostraron que la principal diana tóxica de la CPZ, a nivel del SNC, son los OLGs lo que explicaría la desmielinización selectiva inducida por el neurotóxico *in vivo* (Bénardais et al., 2013b). Por el contrario, el tratamiento con diferentes concentraciones de CPZ afecta mínimamente a la proliferación y supervivencia de las neuronas, células de microglía, astrocitos y OPCs (Bénardais et al., 2013b). La susceptibilidad de neuronas y glía frente al daño oxidativo o mitocondrial en los cerebros envejecidos o enfermos ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años (Fünfschilling et al., 2012; Lassmann & van Horssen, 2016). En un estudio reciente, Luo y colaboradores, (2020) demostraron una vulnerabilidad diferencial, en términos de disfunción mitocondrial, de las células nerviosas de ratones C57BL/6 sometidos a un tratamiento con CPZ a corto plazo. Un sistema REDOX más eficiente, en el caso de las neuronas, sería uno de los factores que explicaría su mayor resistencia al estrés oxidativo y al daño en las mitocondrias respecto a los OLGs (Luo et al., 2020). Efectivamente, los OLGs presentan un nivel más bajo de enzimas antioxidantes como la SOD, y una GPx menos activa que el resto de células del SN (Witherick et al., 2011). Por otro lado, los peroxisomas, orgánulos clave en la β -oxidación y la síntesis de lípidos, producen grandes cantidades de H_2O_2 que son eliminadas normalmente por la GPx y la catalasa, cuya actividad se ve alterada en presencia de CPZ (Xu et al., 2013). Otra desventaja que presentan los OLGs es que cuentan con altos niveles de hierro (Fe) intracelular, debido a su elevada síntesis lipídica, el cual es secuestrado en forma de Fe^{3+} por la ferritina. El exceso de algunas ERO puede reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual es liberado a la matriz mitocondrial o al citosol iniciando y/o propagando la peroxidación lipídica. Este efecto se ve reflejado en un aumento de los niveles celulares de MDA, subproducto de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, tras el tratamiento de cultivos de OLGs con CPZ (Xu et al., 2013). Otra posible explicación al diferente efecto de la CPZ sobre neuronas y OLGs se basa en los altos requerimientos energéticos que precisan los segundos para sintetizar y mantener las vainas de mielina (Gudi et al., 2014).

Como ya hemos descrito, la CPZ compromete la viabilidad de las líneas celulares utilizadas, pero, curiosamente, el daño no parecer ser suficiente para inducir la muerte de éstas. Algunos estudios previos han

mencionado que mientras que los OLGs de cultivos primarios experimentan una muerte celular apoptótica mediada por caspasa 3 frente al tratamiento conjunto con TNF- α y CPZ, el tóxico no es capaz de inducir por sí solo la muerte de estas células gliales (Cammer, 1999; Pasquini et al., 2007). Este hecho cobra especial relevancia por lo sugerido en algunos experimentos *in vivo* (Vega-Riquer et al., 2019). En este sentido, se ha observado que las lesiones desmielinizantes presentes en el cerebro de ratones intoxicados con CPZ son consecuencia de la muerte de los OLGs, lo cual a su vez se correlaciona con un ambiente altamente oxidativo e inflamatorio caracterizado por una activación microglial y astrocitaria, la acumulación de macrófagos, y niveles elevados de citocinas proinflamatorias (Buschmann et al., 2012; Liu et al., 2010; Messori et al., 2007; Taraboletti et al., 2017). Esto sugiere que la toxicidad celular específica de la CPZ no sería capaz, por sí sola, de inducir la muerte de los OLGs y que este modelo necesitaría de un componente inmune (van der Star et al., 2012). En cuanto a las neuronas, no se ha demostrado una pérdida significativa de estas células en el modelo de ratón de EM inducido por CPZ (Praet et al., 2014), un hallazgo que concuerda con nuestros resultados en cultivos primarios de neuronas corticales. Además, el tratamiento de células neuronales en cultivo con reactivos neurotóxicos como el MPP⁺ (Martínez-Pinilla et al., 2019), el H₂O₂ (Kappos et al., 2018), el paraquat (Pascua-Maestro et al., 2019) o el péptido β -amiloide (Martínez et al., 2012) produce pérdida de viabilidad, dosis y tiempo dependiente, en ausencia de muerte celular.

A pesar de la utilidad de los modelos de estudio basados en líneas celulares, una de sus mayores desventajas es que las células individuales no reflejan el microentorno del tejido del que proceden. En este contexto, el uso de cultivos mixtos constituye un enfoque simple para imitar, parcialmente, las respuestas celulares que tienen lugar en las complejas redes neurona-glía del SN (Hyung et al., 2015; van der Star et al., 2012). De hecho, Hyung y colaboradores (2015), observaron que las neuronas motoras mostraban una mayor viabilidad y crecimiento axonal cuando se crecían junto con células de Schwann, en comparación con su monocultivo (Hyung et al., 2015). Otros sistemas de co-cultivos compuestos por neuronas y glía mielinizante (células de Schwann y OLGs) han proporcionado una valiosa información sobre la interacción entre estas células y los procesos de mielinización/des/remielinización tanto en el SNC como en el SNP (De Kleijn et al., 2019; Stangel & Hartung, 2002). No obstante, el cultivo de diferentes tipos celulares en contacto directo es difícil de obtener, especialmente cuando se utilizan cultivos primarios o tridimensionales (van der Star et al., 2012). Incluso en el cultivo de dos líneas celulares de manera conjunta deben tenerse en cuenta los diferentes requerimientos nutricionales o la tasa de crecimiento de cada una de ellas, lo que complica el análisis de las interacciones intra e inter-poblacionales así como la interpretación de los resultados. En este trabajo, desarrollamos un co-cultivo de células SH-SY5Y/HOG para analizar los efectos del tratamiento con CPZ en unas condiciones fisiológicas más parecidas a las del SNC. En nuestro caso, tras determinar la proporción óptima de ambas líneas celulares y el medio más adecuado para su crecimiento, se consiguió un co-cultivo en el que la proliferación y viabilidad celular se mantenían constantes en el tiempo. En cuanto a los resultados, a diferencia de lo que se podría esperar, el efecto de la CPZ en los cultivos mixtos fue cualitativamente similar al obtenido utilizando las líneas celulares individuales, es decir, una disminución de la

viabilidad celular dosis y tiempo dependiente que no se traducía en un aumento de la mortalidad. Estos datos son novedosos ya que nuestro sistema constituye, hasta el momento, el primer modelo de co-cultivo neurona/oligodendroglía de intoxicación por CPZ para el estudio de la EM y sus procesos patológicos a nivel celular.

Una de las características más llamativas del modelo murino de desmielinización inducida por CPZ es la remielinización y recuperación espontánea que experimentan los ratones una vez concluido el tratamiento, lo cual ha supuesto un avance exponencial en la investigación de nuevas terapias para la EM, especialmente aquellas destinadas a abordar los fenómenos de des/remielinización presentes en la patología (Kolahdouzan et al., 2019). En este sentido, y con el fin de optimizar nuestro modelo celular, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue analizar si el efecto citotóxico de la CPZ se revertía tras un periodo de recuperación, tanto en las líneas celulares como en los co-cultivos neurona-glía. Los resultados de estos ensayos, nunca antes realizados *in vitro*, concuerdan con lo descrito *in vivo*, es decir, que la pérdida de viabilidad celular debida a la adición de diferentes concentraciones del quelante de cobre se restituye al interrumpir el tratamiento de una forma tiempo dependiente. Estudios anteriores han demostrado una remielinización endógena espontánea en ratones a los que se les retiraba el tóxico tras ser sometidos a una dieta con 0,2% de CPZ durante 3-6 semanas (Hillis et al., 2016). Esto podría ser debido a que los OPCs no morían con el tratamiento y podían diferenciarse posteriormente a OLGs maduros (Glezer et al., 2006; Rhodes et al., 2006). En esta línea, Gudi y colaboradores (2014), argumentaron que el fenómeno de remielinización en los modelos murinos era debido a la proliferación, migración y diferenciación de OPCs (Gudi et al., 2014). De acuerdo a nuestros datos, la disminución del rendimiento metabólico de las células SH-SY5Y y HOG, posiblemente debido a la alteración de la función mitocondrial, se restaura espontáneamente cuando se elimina la CPZ del medio. Por lo tanto, el modelo celular citotóxico reversible, aquí implementado, supone una aproximación adecuada para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la EM y otras enfermedades desmielinizantes, a menudo caracterizadas por períodos de exacerbación de los síntomas neurológicos (brotes) seguidos de períodos de recuperación parcial o completa (remisiones), como ocurre en la EMRR.

2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN UN MODELO CELULAR DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

Si bien a lo largo de las últimas décadas ha habido avances significativos acerca de la implicación de la Apo D en el envejecimiento y en algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA o la EP, esto no ha sido así en el caso de la EM (Muffat & Walker, 2010; Rassart et al., 2020; Sanchez et al., 2015). No obstante, el hecho de que la Apo D haya sido postulada como una proteína con efectos antioxidantes, antiinflamatorios y neuroprotectores (Muffat et al., 2008; Najyb et al., 2017; Rickhag et al., 2008), y que su expresión aumente de manera significativa en las células gliales durante los procesos de des/remielinización (Ganfornina et al., 2010;

García-Mateo et al., 2018), fueron razones suficientes para sospechar que ésta podría estar implicada en la patología. Así, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, entre otros, han demostrado un aumento en los niveles de la Apo D en el LCR y suero sanguíneo (Reindl et al., 2001; Stoop et al., 2010), además de en las zonas de remielinización del SNC (Navarro et al., 2018), de los pacientes con EM ya desde fases tempranas de la enfermedad con un propósito aparentemente neuroprotector (Reindl et al., 2001). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de acción por el cual la Apo D podría ejercer su función en el contexto fisiopatológico de la EM. Por ello, una vez puesto a punto el modelo celular de EM de citotoxicidad inducida por CPZ nos propusimos utilizarlo como medio para analizar el posible papel neuroprotector de la Apo D en relación a los procesos celulares que subyacen a estas condiciones patológicas, mediante aproximaciones tanto directas como indirectas.

Nuestro primer objetivo fue analizar si la expresión endógena de la Apo D se veía alterada en las células HOG y SH-SY5Y en respuesta al tratamiento con CPZ. En el caso de los OLGs, los resultados mostraron que el tóxico inducía cambios mínimos en la expresión de la Apo D que no se correlacionaban con la pérdida de viabilidad, dosis y tiempo dependiente, previamente descrita para la CPZ en las mismas condiciones. Como era de esperar, el efecto sobre las células de neuroblastoma fue similar. Hay que recordar que las células SH-SY5Y muestran una expresión de esta proteína insignificante en condiciones no patológicas (Pascua-Maestro et al., 2019). En este caso, encontramos unos niveles de Apo D, sólo detectables por inmunohistoquímica, sobre los cuales la CPZ no parece ejercer ningún tipo de efecto. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de la Apo D puede ser modulada en determinadas situaciones como el cese de la proliferación celular, la senescencia o la privación de suero en el medio de cultivo (Do Carmo et al., 2002; Sarjeant et al., 2003). Algunas condiciones como la temperatura, la presión osmótica, o la exposición a metales o a agentes pro-apoptóticos como la camptotecina no afectan a la transcripción del gen de la Apo D (Do Carmo et al., 2007). Sin embargo, otros compuestos altamente oxidantes como el H₂O₂, el lipopolisacárido o el paraquat inducen un efecto dosis-tiempo dependiente sobre los niveles de la apolipoproteína en distintas líneas celulares, desde células de glía a neuronas (Bajo-Grañeras, et al., 2011a; Do Carmo et al., 2007; Martínez et al., 2013). El ácido kaínico, por ejemplo, provoca la sobreexpresión de la Apo D cuando éste es añadido a cultivos primarios de neuronas hipocámpales de ratón (He et al., 2009). Lo mismo ocurre con el péptido β amiloide, ya que se ha observado un incremento en los niveles de la apolipoproteína en células hipocámpales de ratón (HT22) en respuesta a la detención del crecimiento causada por la exposición al fragmento peptídico β_{25-35} (Martínez et al., 2012). Todo esto estaría en relación con la presencia de elementos de respuesta a estrés y al cese de la proliferación en el promotor del gen de la Apo D, además de otras regiones de unión para el factor nuclear kappa β (Do Carmo et al., 2007; Levros et al., 2010). La expresión de la Apo D también estaría regulada a nivel transcripcional por la vía de señalización JNK en respuesta al estrés en los astrocitos (Bajo-Grañeras et al., 2011a), y por la vía MEK/ERK en fibroblastos tras una parada del crecimiento (Levros et al., 2010). Pero, además de este control transcripcional clásico, se ha observado que la Apo D presenta una gran variabilidad

en la eficiencia de traducción dependiente de 5'UTR (regiones no traducidas) del ARNm en respuesta a estrés oxidativo (Diez-Hermano et al., 2020). Tal y como demostramos en este trabajo, la CPZ induce un aumento del estrés oxidativo celular que compromete la función mitocondrial y el metabolismo celular. Estos fenómenos no son evidentes en el modelo animal de manera inmediata tras el tratamiento con la CPZ. En este sentido, el efecto tóxico/desmielinizante promovido por este quelante de cobre en los ratones no alcanza su máximo hasta la tercera semana de tratamiento (Benetti et al., 2010; Pasquini et al., 2007). De hecho, en un estudio reciente se ha observado que la exposición al tóxico durante un breve periodo de tiempo (7 días) no es capaz de inducir desmielinización en los ratones C57BL/6 pero sí disfunción mitocondrial a nivel cerebral (Luo et al., 2020). En base a todo ello, es razonable suponer que la CPZ podría inducir la expresión de la Apo D, pero a un plazo más largo del que es posible ensayar en nuestro modelo celular.

La neuroprotección ejercida por la Apo D bien sea a través del mantenimiento de la homeostasis lipídica, el control de la magnitud y la duración de la respuesta inflamatoria, o gracias a su capacidad antioxidante puede ser conferida tanto de manera directa como indirecta (Rassart et al., 2020). A lo largo de los últimos años, han sido muchos los autores que, con una finalidad terapéutica, han intentado aumentar de manera experimental la concentración de esta proteína a nivel cerebral mediante la generación de mutantes que la sobreexpresan (Do Carmo et al., 2009; Ganfornina et al., 2008; Muffat et al., 2008), la inducción de su expresión endógena con determinados fármacos (Thomas et al., 2003a), o su adición exógena en modelos *in vivo* e *in vitro* (Do Carmo et al., 2007; Martínez et al., 2012).

Por un lado, se ha demostrado que la CLO, un fármaco antipsicótico atípico utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia y el síndrome bipolar, es capaz de aumentar los niveles de la Apo D tanto en el cerebro de ratones como en el plasma de pacientes con este tipo de trastornos, con una función claramente neuroprotectora (Mahadik et al., 2002; Thomas et al., 2001a). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual este compuesto regula la expresión de la Apo D todavía se desconoce. Nuestros hallazgos demuestran que la CLO induce un aumento en la síntesis de Apo D en OLGs y neuronas, pero sólo en presencia de CPZ, al mismo tiempo que previene la pérdida de viabilidad causada por la toxina. Un aspecto importante a tener en cuenta, que se deduce de los análisis realizados en las células SH-SY5Y, es que son las bajas concentraciones de CLO las que parecen ejercer una neuroprotección mediada por Apo D frente a la CPZ. De esta manera, el aumento en la síntesis de la Apo D inducido por el tratamiento con altas dosis de CLO, incapaz de prevenir el efecto citotóxico de la CPZ, podría ser consecuencia del estrés/daño celular causado por el propio fármaco antipsicótico.

El efecto protector de la CLO está claro desde hace tiempo. Estudios previos han descrito un beneficio de la CLO sobre los OLGs en cultivo al mejorar el suministro de energía mitocondrial a través de una mayor captación de glucosa y producción de lactato, la eficacia de la fosforilación oxidativa, y la síntesis de lípidos de la mielina como el galactocerebrósido (Steiner et al., 2014). De manera análoga, Xu y colaboradores, (2013) observaron que

la inhibición de la proliferación y la maduración de OLGs en cultivo causada por la CPZ era parcialmente revertida por el tratamiento con CLO y quetiapina, otro antipsicótico atípico (Xu et al., 2013). En este sentido, y basándonos en los datos de nuestro modelo celular, parece que la Apo D contribuiría al efecto de la CLO. Esta idea se sustenta también en algunos estudios en animales que postulan que el efecto de la CLO en situaciones patológicas estaría relacionado con la función protectora de la Apo D gracias a su capacidad para (i) unir ligandos hidrofóbicos, (ii) minimizar su liberación, (iii) prevenir su lipoperoxidación, y (iv) estabilizar las membranas plasmáticas (Thomas et al., 2001a; Yao et al., 2005). En particular, algunos autores proponen un mecanismo de acción que dependería del papel de la Apo D en el metabolismo del AA (Thomas et al., 2003a; Thomas & Yao, 2007). Por lo tanto, aumentar la expresión endógena de esta proteína a nivel neuronal/oligodendroglial, como una manera de prevenir la muerte celular causada por fenómenos de estrés oxidativo o procesos inflamatorios, podría representar una opción prometedora en el diseño de terapias modificadoras de la EM. No obstante, es necesario realizar más estudios para conocer las vías intracelulares y moléculas implicadas en el aumento de la expresión de la Apo D mediada por la CLO.

Por otro lado, la posibilidad de que la Apo D pueda ser utilizada como una terapia biológica en el tratamiento de la EM y otras enfermedades desmielinizantes no debe ser descartada. Por ello, un objetivo natural de este trabajo fue testar el efecto neuroprotector de la Apo D en el modelo celular de EM inducido por CPZ mediante su adición exógena. Aunque existe en el mercado Apo D recombinante obtenida en un sistema de expresión en levaduras, pensamos que la mejor opción sería utilizar Apo D humana y, por ello, se procedió a purificarla a partir de fluido quístico de mama, por ser un medio donde esta apolipoproteína aparece de manera fisiológica en altas concentraciones. Los resultados obtenidos fueron interesantes, ya que tanto la hApo D como la hrApo D aumentaron la proliferación celular en condiciones normales, al mismo tiempo que previnieron el daño mitocondrial y la pérdida de viabilidad causada por el tratamiento con dosis altas de CPZ en células oligodendrogliales y, lo que es más importante, en la línea de neuroblastoma que carece de expresión endógena de la Apo D. Además, y con el fin de comprobar si la Apo D ejerce su actividad protectora de manera intra o extracelular, se llevó a cabo un estudio de internalización en las células SH-SY5Y con inhibidores específicos de distintas rutas endocíticas. Nuestros datos mostraron que el efecto preventivo de la Apo D, sobre la pérdida de viabilidad ocasionada por la CPZ, ocurre de manera independiente a la entrada de ésta en la célula mediante fagocitosis, macropinocitosis o endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, su función neuroprotectora se ve reducida cuando se bloquean mecanismos característicos de la endocitosis independiente de la clatrina en los que interviene la dinamina, lo que podría indicar una endocitosis a través de caveolas o dependiente de la GTPasa RhoA (Dutta & Donaldson, 2012; Rioux & Prosser, 2023). Una vez dentro de la célula, y de acuerdo con nuestros hallazgos, el mecanismo protector de la Apo D contra el daño oxidativo inducido por CPZ parece ir dirigido a la función mitocondrial pero no a la modulación de los niveles de ERO.

Todo lo expuesto hasta el momento plantea varias cuestiones. En primer lugar, parece que los OLGs y las neuronas son capaces de captar e internalizar la Apo D del medio aumentando, con ello, su actividad metabólica y/o la tasa de proliferación celular. La captación de la Apo D por algunas células no es un fenómeno desconocido. Estudios anteriores proponen a los astrocitos como las principales células secretoras de la Apo D al medio extracelular en el SNC (Hu et al., 2001; Patel et al., 1995), desde donde sería captada por algunas neuronas en situaciones específicas (Bajo-Grañeras et al., 2011a; Ong et al., 1999; Pascua-Maestro et al., 2017). Además, se ha observado que la hApo D, añadida de manera exógena a cultivos de fibroblastos murinos NIH/3T3, es capaz modular la proliferación celular en condiciones normales (Do Carmo et al., 2007). A pesar de la dificultad técnica, investigaciones innovadoras realizadas en los últimos años han sugerido que la Apo D puede entrar en las células a través de un receptor específico de superficie celular, conocido como basignina o basigina, de manera independiente de endocitosis (Najyb et al., 2015). En este sentido, el descubrimiento de que la Apo D se encuentra dentro del compartimento endosomal (Pascua-Maestro et al., 2017), así como los datos aquí presentados apoyarían esta hipótesis.

En segundo lugar, el efecto neuroprotector de la Apo D parece acentuarse en situaciones patológicas, un hallazgo consistente entre distintos estudios. Najyb y colaboradores, (2017) demostraron que la internalización y acumulación de la Apo D en neuronas hipocámpales se incrementaba tras el tratamiento de los cultivos primarios con ácido kaínico. Una vez en el interior celular, la Apo D llevaría a cabo una función neuroprotectora, según estos autores, disminuyendo los niveles anormalmente elevados de colesterol en las neuronas dañadas (Najyb et al., 2017). En esta línea, He y colaboradores, (2009) ya habían demostrado que la hApo D purificada de fluido quístico de mama era capaz de "secuestrar" AA y colesterol, previniendo su peroxidación lipídica y atenuando, por tanto, el aumento de derivados prooxidantes y proinflamatorios como los F2-isoprostanos y el 7-ceto-colesterol en cultivos organotípicos de hipocampo de rata tratados con ácido kaínico (He et al., 2009). A esto hay que añadir el papel de la Apo D en el mantenimiento de la integridad de la membrana lisosomal, permitiendo la recuperación funcional de los lisosomas de astrocitos y neuronas sometidos a un daño oxidativo (Pascua-Maestro et al., 2017). Esta nueva función implica la participación de la Apo D en un mecanismo celular de reparación en situaciones patológicas que estaría en relación con dos procesos biológicos dependientes de estos orgánulos con los que la apolipoproteína ya había sido vinculada, la fagocitosis de la mielina por parte de los astrocitos y la optimización de la autofagia en respuesta a la neurodegeneración en un modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster* (Del Caño-Espinel et al., 2015; García-Mateo et al., 2014; Ruiz et al., 2014). Estos roles neuroprotectores y antioxidantes descritos para la Apo D también pueden estar estrechamente asociados con su capacidad para reducir los hidroperóxidos lipídicos, evitando la formación de radicales alcoxil lipídicos y compuestos citotóxicos como el MDA o el 4-HNE, a través de sus tres residuos de metionina, Met₄₉, Met₉₃ y Met₁₅₇, altamente conservados en mamíferos (Zhang et al., 2011). Alternativamente, la Apo D también presenta una cisteína adicional, Cys₁₁₆, con un grupo tiol que puede estar implicado en una actividad antioxidante directa (Oakley et al., 2012; Zhang et al., 2011). No

obstante, la explicación más plausible al efecto neuroprotector de la Apo D observado en este trabajo es que esta apolipoproteína actúe como una molécula antioxidante directamente sobre los lípidos, de forma independiente a los niveles de ERO celulares, bien sea evitando la oxidación de los mismos o eliminado los productos de la peroxidación lipídica que conducen a un mayor daño oxidativo y que afectan también a proteínas y ácidos nucleicos (Ayala et al., 2014; Ganfornina et al., 2008).

Por último, es importante destacar que aunque la Apo D se ha descrito generalmente como una proteína monomérica (Åkerstrom et al., 2000; Nasreen et al., 2006), ésta se dimeriza tras reducir lípidos peroxidados (Bhatia et al., 2012; Kielkopf et al., 2018). Análisis de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) revelaron que esta apolipoproteína se encuentra, principalmente, en forma de tetrámero en el fluido quístico de mama y en forma de oligómero en el LCR (Kielkopf et al., 2018). Actualmente, y como regla general, los heterómeros son considerados nuevas entidades moleculares con nuevas características de unión y señalización, y probablemente con diferentes propiedades antioxidantes, lo que podría explicar el mayor efecto neuroprotector de la hApo D en comparación con hrApo D, demostrado en este trabajo. En este sentido, a pesar de que la hrApo D generada en un sistema eucariota es funcional, a diferencia de lo observado anteriormente para las Apo D recombinantes bacterianas (Martínez et al., 2012; Pascua-Maestro et al., 2017), su elevado coste, su menor efecto neuroprotector y el hecho de que haya sido generada en levaduras hacen poco viable su uso en modelos de estudio y, más aún, en ensayos clínicos tanto de EM como de otras enfermedades neurodegenerativas.

3 PUESTA A PUNTO DE UN MODELO MURINO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

Como ya ha sido mencionado en la presente Tesis Doctoral, existe diferentes tipos de modelos de EM *in vivo*: modelos inmunomediados, modelos inducidos por virus, modelos de des/remielinización mediante el uso de toxinas, y modelos transgénicos. La elección de uno u otro depende del objetivo del estudio y de las características del tratamiento a evaluar. El modelo animal inmunomediado de EAE ha resultado ser la herramienta de estudio de la EM por antonomasia. Se ha demostrado su utilidad para investigar los mecanismos autoinmunes implicados en la EM (Krishnamoorthy & Wekerle, 2009), y para la evaluación preclínica de medicamentos como la mitoxantrona, el INF- β y el fingolimod, que actualmente se utilizan como terapias modificadoras de la enfermedad (Vargas & Tyor, 2017). Sin embargo, dado que la EAE sólo imita algunos aspectos de la EM humana, son necesarios otros modelos alternativos para comprender en mayor profundidad la etiología de esta patología y desarrollar terapias más eficaces. Es aquí donde cobra especial relevancia el modelo animal de citotoxicidad inducida por CPZ. Dada su capacidad para reproducir los procesos de des/remielinización en ausencia de una respuesta inmunitaria periférica, este modelo es sustancialmente útil en el estudio de los acontecimientos iniciales asociados a las enfermedades neurodegenerativas como la EM (Sen et al., 2019). Por ello, en este trabajo, tras resolver algunas de las incógnitas acerca de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la EM, así como de la función que

desempeña la Apo D como una molécula neuroprotectora en este contexto, nos propusimos corroborar dichos resultados en un ambiente más complejo, si bien de mayor analogía con la fisiopatología de la EM humana, como es el modelo murino de EM de citotoxicidad inducida por CPZ.

Las primeras observaciones de los efectos perjudiciales de la CPZ en roedores fueron publicadas por Carlton y colaboradores a mediados de la década de 1960; entre éstos se incluyeron espongiosis, edema, hidrocefalia, desmielinización del SNC y lesiones hepáticas (Carlton, 1966, 1967). Posteriormente, en los trabajos realizados entre 1960 y el año 2000, se describieron algunos otros como la formación de megamitocondrias en el hígado y el SNC, la oligodendrocitosis, la inducción de respuestas inflamatorias (especialmente la inmunidad innata), y fenómenos de des/remielinización (Blakemore, 1972; Hiremath et al., 1998; Morell et al., 1998; Suzuki, 1969). Partiendo de esta base conceptual, el modelo de citotoxicidad inducida por CPZ ha ido evolucionando y perfeccionándose a lo largo de los años. El protocolo más utilizado para generar este modelo consiste en alimentar ratones de unas 8 semanas de edad con CPZ al 0,2% (p/p) durante 5-6 semanas, con lo que se consigue una desmielinización extensa con pocos efectos secundarios (Hesse et al., 2010; Matsushima & Morell, 2001; Skripuletz et al., 2011). Aunque Lindner y colaboradores demostraron en 2008 que se podía alcanzar un nivel de desmielinización aguda aumentando la dosis hasta el 0,3% de CPZ (p/p) (Lindner et al., 2008), esto también suponía un incremento de la tasa de mortalidad hasta un 10 % o un 15 % (Torkildsen et al., 2008). Otros estudios se han centrado en determinar la cepa de ratón más apropiada para el modelo de EM inducido por CPZ. En este sentido, Ludwin y colaboradores observaron que las hembras de ratón Swiss y SJL/J no mostraban desmielinización en comparación con los machos, mientras que en la cepa de ratones C57BL/6 no se detectaron diferencias intersexuales significativas (Hiremath et al., 1998). Aun así, han sido empleadas otras especies animales como primates, ratas o cerdos de Guinea (Chen et al., 2015; Valeiras et al., 2014).

En nuestro caso, como ya había sido reportado, la administración de CPZ al 0,2% (p/p) a ratones durante 5-6 semanas produce una desmielinización progresiva, dependiente de la dosis y altamente reproducible en estructuras del SNC, tanto en la sustancia blanca como gris, de regiones como el cuerpo caloso, el hipocampo, el tálamo y el cerebelo (Goldberg et al., 2015; Kipp et al., 2009; Praet et al., 2014; Vega-Riquer et al., 2019). La muerte oligodendrocítica ya es visible entre las semanas 1-3 de alimentación con el tóxico, mientras que la desmielinización no se agudiza hasta las 4-5 semanas de tratamiento, acompañada de una activación de la microglía y los astrocitos (Gudi et al., 2014; Hiremath et al., 1998). Tras el cese de la alimentación con CPZ, se atenúa la respuesta glial y comienza el proceso de remielinización espontánea, en el cual nuevos OLGs maduros se regeneran a partir de OPCs, simulando los periodos de recuperación que siguen a los brotes característicos de la EMRR en humanos (Gudi et al., 2014; Hiremath et al., 1998; Ransohoff, 2012). Por otro lado, el tratamiento prolongado con CPZ durante 12-14 semanas produce una desmielinización crónica, análoga a la fase secundaria progresiva de la EM. También se observa una marcada gliosis, una disminución del peso corporal y un aumento de la mortalidad (Kipp et al., 2009; Lindner et al., 2008; Skripuletz et al., 2011). Por todo ello, el modelo resulta útil en el estudio de inhibidores

de la desmielinización, compuestos farmacéuticos que aceleren el proceso endógeno de remielinización (Xiao et al., 2012) o, en el caso de la variante de desmielinización crónica, que activen dichos mecanismos de regeneración (Harsan et al., 2008).

La desmielinización inducida en el modelo murino de EM es el principal efecto de la CPZ, estudiado mediante RM y técnicas inmuistoquímicas (Franco-Pons et al., 2007; Remington et al., 2007; Selvaraju et al., 2004; Xiao et al., 2008). Sin embargo, también existen otros parámetros monitorizables que son indicativos de la intoxicación por este quelante de cobre como el peso corporal, ciertos rasgos conductuales, el grado de hidrocefalia, el peso cerebral y el grosor de la corteza motora (Hånell & Marklund, 2014; Puzzo et al., 2014; Taylor et al., 2010). Dichas variables ya han sido estudiadas por otros autores, desde hace muchos años, pero nunca de forma conjunta hasta el presente trabajo (Carlton, 1967; Fallier-Becker et al., 2022; Kesterson & Carlton, 1972; Leopold et al., 2019; Zhan et al., 2020).

En esta Tesis Doctoral llevamos a cabo una caracterización exhaustiva de los efectos de la CPZ en todos los grupos experimentales utilizados, tanto a nivel sistémico y conductual como a nivel cerebral. A nivel sistémico, la CPZ provocó una pérdida de peso corporal en los ratones alimentados con este tóxico durante 3 y 6 semanas, lo cual ya había sido descrito en otros estudios (Chandran et al., 2012; Chang et al., 2019; Templeton et al., 2019). Este hecho podría deberse a una menor ingesta de alimentos y/o a que la CPZ tendría efectos nocivos sobre otros órganos corporales como el hígado, donde se ha descrito la formación de megamitocondrias (Praet et al., 2014). Se sabe que la alteración de estos orgánulos provoca una escasez de ATP y un aumento de la concentración de ERO/ERN, lo que acaba afectando al correcto funcionamiento del retículo endoplasmático y, en consecuencia, a la síntesis de proteínas y lípidos (Praet et al., 2014). En nuestro caso, no observamos diferencias en la ingesta de pienso entre los ratones tratados con CPZ y sus controles, aunque sí un mayor tamaño del hígado en los primeros. También identificamos lo que, en nuestra opinión, podría ser una cierta tolerancia al tóxico ya que la pérdida de peso fue menor a medida que avanzaban las semanas de tratamiento con CPZ.

A nivel de comportamiento, la conducta hiperactiva y trepadora de los grupos bajo tratamiento, descrita en este trabajo, sugiere un aumento de la actividad del SNC y ha sido corroborada por otros autores (Xu et al., 2009). Este fenómeno de excitación parece deberse a que la CPZ aumenta la concentración de dopamina y la expresión de su transportador en la corteza prefrontal de los animales (Chang et al., 2017; Valeiras et al., 2014; Xu et al., 2010), así como la concentración de corticosterona en sangre (Serra-de-Oliveira et al., 2015; Yu et al., 2018). Este sería un efecto “no deseado” de la CPZ, ya que la fatiga a menudo coexiste con la depresión en la EM (Sen et al., 2019). Otro de los síntomas más comunes en los pacientes con EM, detectado en aproximadamente el 80% de los casos, es el déficit motor que se traduce en la dificultad para mantener el equilibrio, la reducción de la velocidad de la marcha o el entorpecimiento de los movimientos (Sen et al., 2019). Nuestros resultados de la prueba de *Rota-rod* no evidenciaron diferencias entre los grupos de ratones tratados con CPZ y sus controles. A pesar de

que esta prueba es una de las herramientas más utilizadas para detectar alteraciones motoras en ratones alimentados con CPZ (Elbaz et al., 2018; Faizi et al., 2016; Hashimoto et al., 2017), existe variabilidad entre los datos obtenidos por diferentes grupos. Mientras que algunos autores observan una disminución en la latencia a la caída (Kumar et al., 2018; Sanadgol et al., 2017; Yamamoto et al., 2017), otros no detectan de ningún cambio en el rendimiento de la prueba, como es nuestro caso (Bölskei et al., 2018; Chang et al., 2017; Kondo et al., 2016). Sen y colaboradores (2020) sugieren que esto es debido a que el test de *Rota-rod* no cuenta con la suficiente precisión para detectar cambios sutiles en el nivel de mielinización que repercutan en la actividad motora. De hecho, comprueban como los déficits motores provocados por la alimentación de ratones con CPZ al 0,2% durante 5 semanas sólo eran perceptibles cuando se sometían a pruebas conductuales más complejas (Sen et al., 2020). Estos test, consistentes en hacer pasar a los animales a través de una viga en pendiente o caminar por una escalera, permiten evaluar diferentes aspectos de la locomoción como la precisión a la hora de colocar las patas, la coordinación de las extremidades y el equilibrio, aportando una mayor sensibilidad a la detección de cualquier cambio asociado al nivel de mielinización (Sen et al., 2020). Por tanto, buscar pruebas alternativas y/o completarias, a las ya realizadas, sería uno de los puntos de mejora en los que continuar trabajando en la presente línea de investigación.

En cuanto a los efectos de la CPZ a nivel cerebral, la monitorización de los cerebros de nuestros ratones mediante RM demostraron la presencia de zonas hiperdensas, ya durante la tercera semana de tratamiento con CPZ, que sugerían la existencia de un edema en el parénquima cerebral posiblemente por acumulación y salida de LCR de los ventrículos, pero también como consecuencia de un aumento del espacio extracelular causado por el daño oligodendrocítico, la desintegración de la mielina mediante vacuolización, y el adelgazamiento de los axones (Praet et al., 2014; Torkildsen et al., 2008). A las 6 semanas de tratamiento, el incremento del LCR parenquimal condujo a la estenosis u oclusión total del acueducto de Silvio, el conducto de paso de LCR más estrecho del SNC, provocando, finalmente, una hidrocefalia que diagnosticamos mediante la ratio de Evans (Evans, 1942; Kesterson & Carlton, 1972). Curiosamente, otros investigadores sólo han descrito hidrocefalia para el modelo murino de desmielinización crónica inducida tras la administración de dosis elevadas de CPZ, de hasta 0,75% (p/p), y que actualmente ya no se utilizan (Hemm et al., 1971; Kesterson & Carlton, 1970). Tal y como cabría esperar, el peso cerebral de los ratones tratados con CPZ aumentó respecto a sus controles, tanto a las tres como a las seis semanas. De todas maneras, en este punto es necesario recordar que la hidrocefalia no siempre se traduce en un mayor peso cerebral, ya que el LCR tiene un peso específico bajo en comparación con el tejido cerebral. Además, la hidrocefalia puede estar asociada con la pérdida de tejido o daño en las estructuras cerebrales debido a un aumento de la presión, lo que puede contrarrestar cualquier incremento en el peso debido al líquido adicional (Pong et al., 2017).

Aunque tradicionalmente la EM se ha considerado una enfermedad de la sustancia blanca, se han encontrado pruebas que indican que la sustancia gris del cerebro también se ve afectada a nivel cortical e

hipocampal. Este evento es más grave en las fases progresivas de la EM y es una fuente importante de discapacidad permanente (Stys et al., 2012; Zirngibl et al., 2022). Afortunadamente, el modelo murino de desmielinización inducida por CPZ, como herramienta de estudio de las lesiones de la EM aquí planteado, es uno de los pocos en los que la sustancia gris cortical también se ve afectada por el tóxico, específicamente el córtex, el hipocampo y los núcleos profundos en torno a las 4 semanas de tratamiento (Carassiti et al., 2018; Cerina et al., 2020; Radetz et al., 2021; Zhang et al., 2019). En este trabajo, se han puesto de manifiesto estos signos patológicos mediante el análisis comparativo del grosor de la corteza motora entre ratones silvestres y tratados con CPZ, evidenciando una disminución del mismo a las 3 semanas de tratamiento, que se agudizaba cuando éste se prolongaba hasta las 6 semanas. Dado que en el modelo murino de citotoxicidad inducida por CPZ no se observa pérdida neuronal (Sen et al., 2020), la disminución del grosor de la corteza motora, sólo podría deberse a la propia desmielinización de la sustancia gris cortical (Skripuletz et al., 2011). Para confirmar este resultado, la cuantificación del contenido en mielina de la corteza motora de los animales tratados con CPZ sería uno de los próximos pasos a tratar. No obstante, hay que tener en cuenta que, aunque la tinción histoquímica con LFB proporciona excelentes resultados a nivel de la sustancia blanca, su sensibilidad no es suficiente para detectar estos cambios en la sustancia gris (Skripuletz et al., 2008). Por lo tanto, para analizar la des/remielinización corticales se recomienda utilizar pruebas específicas para detectar proteínas de la mielina como la MBP o la proteína proteolípida de la mielina (PLP, de sus siglas en inglés *proteolipid protein*) (Skripuletz et al., 2011).

En este trabajo, tanto las imágenes de RM como las pruebas histoquímicas realizadas, corroboraron que la ingesta de CPZ provocaba una disminución del contenido de mielina, dependiente del tiempo de exposición al tóxico, en el cuerpo caloso de los ratones. Nuestros hallazgos concuerdan con otros estudios en el modelo murino de citotoxicidad inducida por CPZ en los que la desmielinización se manifiesta ya a las 3 semanas de administración de CPZ 0,2% (p/p) (Xu et al., 2009), pero no se hace evidente hasta las 6 semanas (Brousse et al., 2016; Dedoni et al., 2023). En concreto, se ha visto que el efecto tóxico/desmielinizante de la CPZ tiene especial incidencia en regiones del SNC como el cuerpo caloso, a la altura de la comisura anterior y del hipocampo, y la corteza motora (Heckers et al., 2017), las cuales han sido definidas como regiones de interés para este estudio. Además, la desmielinización del cuerpo caloso también es detectable mediante técnicas histológicas y RM en pacientes con EM (Zirngibl et al., 2022).

Aunque la desmielinización es el signo patológico más característico de la EM, en los últimos años se está haciendo especial hincapié en el estudio de los procesos de remielinización, presentes durante las recaídas y sobre todo en los periodos de recuperación posteriores que tienen lugar en el caso de la EMRR humana (Matsushima & Morell, 2001). La regeneración ineficiente o nula de las vainas de mielina es la que acaba causando el daño axonal y neuronal y, por tanto, los déficits neurológicos permanentes en los pacientes de esta variante de EM (Rossi et al., 2012). Sin embargo, debido a que el potencial de la remielinización endógena viene determinado por numerosos y muy diversos factores como la edad y el sexo, la evolución y duración de la enfermedad y la localización

anatómica de las lesiones, aún no se ha atajado el origen de esta cuestión (Zendedel et al., 2013). Para la identificación de los factores que orquestan una remielinización adecuada, pero también de aquellos que son responsables del fracaso de ésta durante la EMRR, el modelo animal de citotoxicidad inducida por CPZ resulta indispensable. En nuestro caso, la interrupción de la alimentación con el tóxico produjo una remielinización endógena efectiva, observada en el cuerpo caloso a la altura de la comisura anterior, hasta niveles equiparables a los de los ratones control. Esta recuperación no se manifestó únicamente con un incremento del contenido en mielina, si no que el resto de los parámetros estudiados como el peso corporal, el volumen cerebral y el grosor de la corteza motora también se restauraron hasta valores fisiológicos; a excepción del grado de hidrocefalia que sólo se revirtió parcialmente. (Zhan et al., 2020). Por un lado, Steelman y colaboradores (2012) ya detectaron la recuperación del contenido de mielina en el cuerpo caloso, no sólo mediante técnicas inmunohistoquímicas si no también mediante microscopía electrónica, tras la suspensión del tratamiento de ratones con CPZ 0,2% durante 5 semanas. Además, la remielinización del SNC se manifestó en la mejora de la ejecución de test de evaluación de la función motora (Steelman et al., 2012). Por otro lado, Skripuletz y colaboradores (2008) observaron que, al eliminar el tóxico de la dieta de los animales, el proceso de remielinización también tenía lugar en la sustancia gris, lo que explicaría la recuperación del grosor de la corteza motora descrita en esta Tesis Doctoral. No hemos encontrado estudios, sin embargo, que analicen el nivel de hidrocefalia tras suspender la administración de CPZ. Si bien Fallier-Becker y colaboradores (2022) observaron, recientemente, que el edema parenquimatoso inducido en el cuerpo caloso murino tras el tratamiento durante 5 semanas con CPZ 0,2% (p/p) persiste aun después de un periodo de recuperación de 5 semanas sin el tóxico. Esto sugiere que los procesos edematosos e hidrocefálicos inducidos por el tóxico son efectos irreversibles e independientes de la desmielinización (Fallier-Becker et al., 2022) En este trabajo nos hemos centrado en la reproducción y el estudio de las características de la EMRR la variante más frecuente de EM (Titus et al., 2020). Aun así este modelo puede perfeccionarse, tomando como ejemplo otros en los se trata de evaluar, simultáneamente, los procesos de des/remielinización que coexisten en el curso de la EMRR; se ha observado que los OPCs son capaces de iniciar la remielinización parcial del cuerpo caloso aún en presencia de la CPZ (Matsushima & Morell, 2001).

A pesar del uso extendido de la CPZ en los modelos animales de des/remielinización, el modo de acción de este tóxico a nivel del SNC sigue siendo un misterio. Algunos autores sugieren que la CPZ, ingerida junto con el pienso, es capaz de atravesar barreras biológicas como el epitelio intestinal y la BHE, y alcanzar el SNC para ejercer su efecto neurotóxico en el interior de los OLGs (Messori et al., 2007; Zatta et al., 2005). Otros, por el contrario, postulan que los efectos de la CPZ se deben simplemente a su acción como quelante de cobre, generando deficiencias en este metal que conducen, por ejemplo, a la disminución de la actividad de enzimas dependientes de cobre como la monoaminooxidasa y la citocromo C oxidasa, ambas esenciales para el correcto funcionamiento mitocondrial (Benetti et al., 2010; Zatta et al., 2005). Recientemente, Zirngibl y colaboradores (2022) han propuesto dos mecanismos de acción de la CPZ en el SNC: i) el denominado "daño celular intrínseco" que

tendría su origen en el interior de los OLGs a causa de una disfunción mitocondrial o síntesis reducida de proteínas de mielina, y ii) el denominado “daño celular extrínseco” por el cual la CPZ provoca la activación de células residentes en el SNC como microglía o células inmunitarias periféricas como linfocitos T, lo que desencadena un ambiente inflamatorio que perjudica a los OLGs (Zirngibl et al., 2022). Independientemente de las cuestiones que quedan por resolver, los resultados aquí mostrados ponen de manifiesto que la ingesta de CPZ provoca una desmielinización significativa en el SNC de los ratones, además de otros efectos tanto a nivel cerebral, como sistémico y conductual que se agudizan de una forma tiempo-dependiente, y se restituyen cuando se interrumpe la exposición al tóxico. Por lo tanto, al igual que en el caso del modelo celular, en esta Tesis Doctoral hemos validado un modelo animal de EM reversible de citotoxicidad inducida por CPZ como vehículo de estudio de la fisiopatología de la EM y otras enfermedades desmielinizantes.

4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y PAPEL DE LA APOLIPOPROTEÍNA D EN UN MODELO MURINO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR CUPRIZONA

Como hemos mencionado a lo largo de este trabajo, los estudios realizados por distintos grupos de investigación, a nivel mundial, han destacado la relevancia de la Apo D en diversas enfermedades neurodegenerativas, sugiriendo que esta apolipoproteína posee propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes (Li et al., 2015; Reindl et al., 2001; Thomas & Yao, 2007; Waldner et al., 2018). En este sentido, la Apo D es capaz, según se ha demostrado, de reducir el estrés oxidativo, proteger contra la apoptosis glial y neuronal, y facilitar la reparación de los tejidos nerviosos dañados (Do Carmo et al., 2008; García-Mateo et al., 2014; Martínez-Pinilla et al., 2015; Najyb et al., 2017). Estas funciones son particularmente relevantes en la fisiopatología de la EM, pues contribuyen significativamente a la progresión de la misma. Pero, además, la sobreexpresión de la Apo D en células gliales durante los procesos de des/remielinización, como los que acontecen en la EM, ha sido documentada en estudios preclínicos y clínicos (Navarro et al., 2018; Reindl et al., 2001). Con el fin de avanzar y profundizar en la implicación de la Apo D en este contexto, decidimos estudiar la expresión de esta apolipoproteína en el modelo murino de EM de citotoxicidad inducida por CPZ.

Los resultados de este trabajo pusieron de manifiesto que la CPZ induce una disminución en la expresión de la Apo D a nivel del cuerpo calloso, paralela a la desmielinización observada en los ratones tras 3 y 6 semanas de tratamiento, y que coincide, además, con un descenso en el número de OLGs inmunoreactivos para la misma. De manera interesante, estos efectos se revierten tras la suspensión del tratamiento. Por un lado, estos datos revelan una relación entre los OLGs, la mielina y la expresión de la Apo D. La pérdida del recubrimiento que rodea los axones de las fibras nerviosas mielinizadas está estrechamente relacionada con la degeneración de los OLGs, consecuencia del efecto de la CPZ, lo cual es común también a la fisiopatología de la EM (Popescu et al., 2013; Zindler & Zipp, 2010). A diferencia de lo descrito para los modelos *in vitro* (Pasquini et al., 2007; van der Star et al., 2012), la ingesta de CPZ generaría un ambiente inflamatorio y un estrés oxidativo a nivel del SN capaz de provocar

muerte oligodendrocítica y fagocitosis de las vainas de mielina dañadas (Taraboletti et al., 2017; Zhan et al., 2020). Teniendo en cuenta que los OLGs maduros y los OPCs son las principales células responsables de la síntesis de la Apo D, tanto en el cerebro adulto como durante su embriogénesis (Hu et al., 2001; Navarro et al., 2018), todo apunta a que el daño de los OLGs causado por la CPZ es el responsable de la disminución del nivel de la Apo D en el SNC, así como del contenido en mielina. Por otro lado, el hecho de que tras la suspensión del tratamiento con CPZ se observe una recuperación de la cantidad de mielina, del nivel de expresión de la Apo D y del número de OLGs positivos para la misma, da pie a pensar que los OPCs resistentes al efecto del tóxico pueden estar diferenciándose a OLGs maduros capaces de sintetizar Apo D y formar nuevas vainas de mielina, tal y como ya ha sido descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación (Rickhag et al., 2008). En este sentido, se encontró un patrón de expresión de la Apo D, similar al observado en este trabajo, en las placas escleróticas características de la EM, incluidas las placas de desmielinización activas e inactivas, así como aquellas en proceso de remielinización, en muestras cerebrales *post-mortem* de pacientes aquejados de esta patología. En este caso, la expresión de la Apo D disminuía en todas las lesiones, más en las áreas inactivas que en las activas, pero se recuperaba en las áreas de remielinización; la apolipoproteína era producida principalmente por los OLGs maduros de la sustancia blanca y se localizaba en los procesos celulares que rodeaban la vaina de mielina (Navarro et al., 2018). Aunque se necesitan más estudios al respecto, una explicación plausible podría situar a la Apo D en el mecanismo molecular y celular que controla la remielinización espontánea después del daño. Estos datos están en consonancia con los encontrados en la literatura respecto a la función de la Apo D en los procesos de mielinización y remielinización (García-Mateo et al., 2018; Gudi et al., 2014; Matsushima & Morell, 2001). Dado el papel de la Apo D como una molécula clave en el transporte selectivo de pequeños ligandos hidrofóbicos, se ha visto implicada en varios mecanismos fisiopatológicos del SNC y SNP (García-Mateo et al., 2014; Kosacka et al., 2009; Rickhag et al., 2008). Por ejemplo, la expresión de la Apo D es regulada al alza en células de Schwann y macrófagos en el nervio ciático de rata tras su lesión, promoviendo la recuperación de la función locomotora después del daño, y controlando la magnitud y el tiempo de la respuesta inflamatoria (Boyles et al., 1990; Spreyer et al., 1990). En este contexto inflamatorio, se ha demostrado que la Apo D regula el número de células inmunitarias reclutadas en el área dañada (Ganfornina et al., 2010; García-Mateo et al., 2014). De hecho, la falta de la Apo D parece comprometer la compactación de la mielina, pero, más importante aún, la eliminación de ésta después de una lesión, lo que resulta en una regeneración/remielinización axonal retrasada (Ganfornina et al., 2010; García-Mateo et al., 2018). A esto hay que añadir que el gen de la Apo D se encuentra entre los genes que se sobreexpresan en los ganglios de la raíz dorsal de la rata tras una constricción crónica del nervio ciático (Kim et al., 2001). A pesar de que la función de la Apo D en la homeostasis de la mielina en el SNP es bien conocida, su función exacta durante los procesos de des/remielinización del SNC, sigue siendo incierta. Se sabe que esta apolipoproteína se expresa en el desarrollo del SNC y aumenta durante el envejecimiento y en algunas enfermedades neurodegenerativas (Muffat & Walker, 2010; Navarro et al., 2004; Sanchez et al., 2015). Análisis de expresión génica en tejidos cerebrales de ratas con isquemia e ictus mostraron una mayor cantidad de ARNm de Apo D en OLGs maduros y astrocitos reactivos, principalmente

a nivel de la sustancia blanca y las zonas alrededor del daño (Rickhag et al., 2008). Se ha sugerido que la Apo D puede ejercer aquí una función neuroprotectora promoviendo la regeneración neuronal y la remielinización en la fase de recuperación (Rickhag et al., 2008).

La desmielinización, la regeneración axonal y la remielinización son algunos de eventos que ocurren en los cerebros con EM, y que requieren una síntesis y reclutamiento de lípidos para formar nuevas membranas plasmáticas y vainas de mielina. Es importante destacar que la expresión de la Apo D, una de las proteínas gliales más importantes en la dinámica de la mielina, disminuye en el modelo murino de EM inducida por CPZ. En concreto, parece que la reducción del contenido de la Apo no sólo se debe a un menor número de OLGs en el cuerpo caloso de los ratones, sino que algunos de éstos no son capaces de expresarla ya que su función y viabilidad estaría comprometida por el efecto de la CPZ (Patel & Balabanov, 2012). En este sentido, se ha demostrado que algunos mediadores inflamatorios como las citocinas de tipo interleucina (IL) IL-1 o IL-12 liberadas por la microglía/macrófagos y los astrocitos podrían alterar la expresión de la Apo D en OLGs maduros (Clausen et al., 2005; Rassart et al., 2000). Sin embargo, parece que los OPCs reaccionan al daño y son capaces de proliferar, migrar y diferenciarse en respuesta a mitógenos y factores promigratorios secretados por astrocitos y células microgliales para reemplazar los OLGs perdidos (Clemente et al., 2013). Algunas de las funciones neuroprotectoras de la Apo D, en este contexto, podrían estar relacionadas con su capacidad para regular el comportamiento migratorio de diferentes células móviles en asociación con factores de crecimiento (Dentelli et al., 1999; Elo et al., 2012; Leung et al., 2004; Pajaniappan et al., 2011). La implicación de la Apo D en la diferenciación celular también ha sido evaluada en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Kosacka et al., 2009; López-Boado et al., 1994), demostrándose que ésta puede actuar como un factor neurotrófico que promueve el crecimiento de neuritas y la sinaptogénesis en neuronas de ganglios de la raíz dorsal (Kosacka et al., 2009).

Las evidencias parecen indicar un importante papel de la Apo D en los procesos de mielinización y remielinización como una molécula con potencial neuroprotector. Por ello, y con el objetivo de corroborar este hecho, al menos de manera preliminar, se evaluó el efecto del antipsicótico atípico CLO en el modelo murino de EM de citotoxicidad inducida por CPZ. Los análisis realizados demostraron que este fármaco, co-administrado junto con la CPZ, fue incapaz de revertir la pérdida de mielina ocasionada por el tóxico en el cuerpo caloso de los animales. A pesar de la escasez de estudios sobre el tema, algunos autores ya habían observado que cuando la CLO se administraba después del tratamiento con CPZ, los animales experimentaban una mejoría a nivel de coordinación motora, lo que se relacionó con un menor nivel de activación astrocitaria y microglial (Chang et al., 2019; Templeton et al., 2019; Xu et al., 2010). Sin embargo, bajo esas condiciones, el contenido en mielina seguía sin recuperarse (Chang et al., 2019; Templeton et al., 2019). En cuanto a la expresión de la Apo D, ésta no se vio alterada por el tratamiento con CLO en condiciones normales, de forma análoga a lo observado en el modelo *in vitro*. No obstante, otros autores como Thomas (2003b), sí han descrito un incremento de la expresión de la Apo D en respuesta al tratamiento crónico con CLO, si bien es cierto que con una metodología totalmente distinta ya

que los ratones recibían la dosis del antipsicótico mediante su inyección en regiones del SN murino como el núcleo estriado (Thomas et al., 2003b). Curiosamente, la CLO sí contrarrestaba la pérdida de expresión de la Apo D a nivel oligodendrocítico causada por el tratamiento con CPZ, sin que ello tuviese repercusión alguna sobre los niveles de mielina, como cabría esperar en un principio. Aunque son varios los estudios que proponen que el efecto de la CLO estaría relacionado con la función protectora de la Apo D, el *link* funcional no está claro (Rassart et al., 2020). La Apo D parece desempeñar un amplio abanico de acciones, como parte de un mecanismo de respuesta celular frente al estrés oxidativo, la peroxidación lipídica, la excitotoxicidad, la alteración de la mielina, el desequilibrio del colesterol o incluso fenómenos apoptóticos (Bajo-Grañeras et al., 2011b; del Valle et al., 2023; He et al., 2009; Montpied et al., 1999; Muffat et al., 2008). Es posible que la acción de la Apo D, en un determinado momento, dependa del contexto patológico existente. Otra opción es que se necesite un tiempo mayor de tratamiento para que la CLO y, por ende, la Apo D ejerzan algún efecto sobre los procesos de des/remielinización causados por la CPZ. En este sentido sería interesante aumentar los grupos experimentales, incluyendo ratones sometidos a un tratamiento con CLO previo o posterior a la CPZ.

Los modelos *in vitro* e *in vivo* desarrollados en esta Tesis Doctoral constituyen una herramienta primordial en la investigación de la EM, una enfermedad de alta complejidad, que se manifiesta en forma de variantes diversas, y cuya investigación cuenta con importantes limitaciones. El uso de líneas celulares inmortalizadas, el co-cultivo de ambas, así como el uso de cultivos celulares primarios han permitido realizar un estudio exhaustivo sobre los mecanismos que podrían estar detrás de los efectos de la CPZ en el modelo animal. Además, los resultados previos de nuestro grupo de investigación, y los obtenidos en la presente Tesis Doctoral, sugieren a la Apo D como molécula neuroprotectora de importancia en la remielinización endógena, la cual podría desempeñar un papel crucial en la EM y en otras patologías desmielinizantes. No obstante, se requieren más estudios para determinar los mecanismos específicos de acción y las posibles aplicaciones terapéuticas. La caracterización detallada de la expresión de la Apo D en la EM y la exploración de sus funciones en modelos experimentales son pasos esenciales para avanzar en esta prometedora área de investigación.

Conclusiones

1. La cuprizona induce una pérdida de viabilidad dosis y tiempo dependiente en las células SH-SY5Y y HOG, el co-cultivo de ambas, y los cultivos primarios neuronales. Dicho efecto no se traduce en muerte celular y se revierte una vez que se suspende el tratamiento.
2. La cuprizona ejerce un efecto citotóxico diferencial en las líneas celulares analizadas, siendo más sensibles los oligodendrocitos que las neuronas, lo cual coincide con la fisiopatología de la Esclerosis Múltiple.
3. El efecto neurotóxico de la cuprizona, mediado por una disfunción mitocondrial reversible, no es capaz de inducir la expresión de la Apolipoproteína D ni en las células SH-SY5Y ni en las células HOG, al menos en las dosis y tiempos analizados.
4. La clozapina induce un aumento de la expresión de la Apolipoproteína D en las células SH-SY5Y y HOG a ciertas concentraciones, las cuales también protegen del efecto citotóxico de la cuprizona.
5. Tanto la Apolipoproteína D humana purificada como, en menor medida, la Apolipoproteína D recombinante, añadidas de forma exógena, son captadas por las células mediante mecanismos de endocitosis independientes de clatrina, previniendo el daño mitocondrial y la pérdida de viabilidad causada por la cuprizona.
6. El modelo celular citotóxico reversible, aquí implementado, supone una aproximación adecuada para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la Esclerosis Múltiple, caracterizada por brotes y remisiones.
7. La cuprizona ejerce un efecto citotóxico en el modelo murino de Esclerosis Múltiple, provocando cambios a nivel sistémico y de sistema nervioso que se recuperan tras la suspensión del tratamiento.
8. La cuprizona provoca, específicamente, desmielinización en el cuerpo calloso y otras alteraciones cerebrales como hidrocefalia y adelgazamiento de la corteza motora en los ratones, que se recuperan tras la suspensión del tratamiento. Estos efectos coinciden con una disminución de la expresión de la Apolipoproteína D, debida al daño de los oligodendrocitos, la cual se recupera junto con la mielina en ausencia del tóxico.
9. La clozapina evita la disminución de la expresión de la Apolipoproteína D causada por la cuprizona en el modelo murino de Esclerosis Múltiple, pero no ejerce ningún efecto sobre la pérdida de mielina.
10. Tanto el modelo celular como el modelo animal de Esclerosis Múltiple de citotoxicidad inducida por cuprizona, han resultado ser adecuados para el estudio, tanto de la expresión de la Apolipoproteína D como de su efecto neuroprotector, abriendo una nueva vía de investigación acerca de sus posibles aplicaciones terapéuticas en la Esclerosis Múltiple y en otras enfermedades desmielinizantes.

Anexos

Figura suplementaria 1.

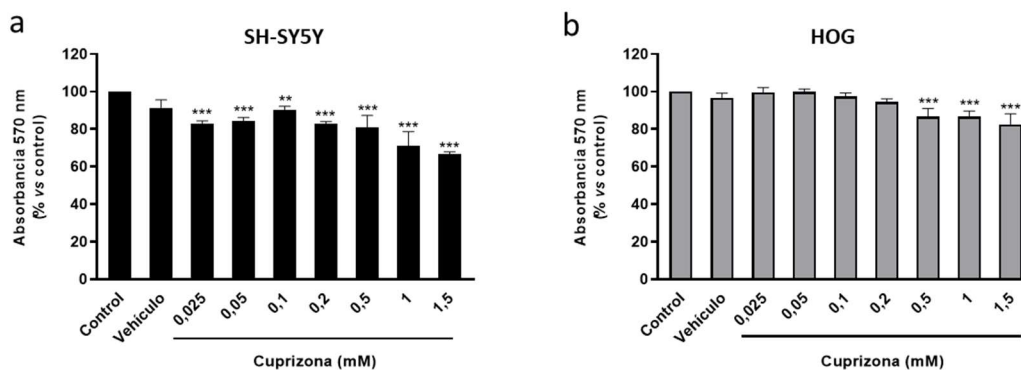


Figura S1. Ensayos MTT en células SH-SY5Y (a) y HOG (b) tratadas con concentraciones crecientes de cuprizona (0,025-1,5 mM) durante 72 horas. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura suplementaria 2.

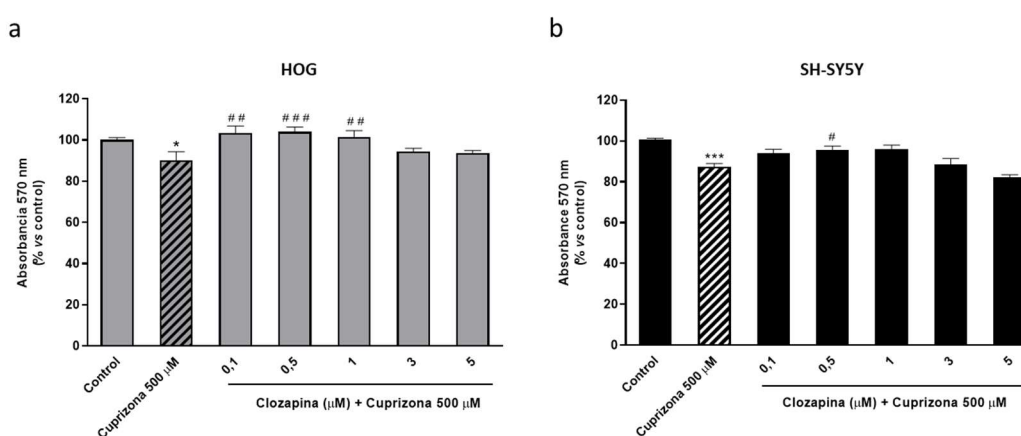


Figura S2. Ensayos MTT en células HOG (a) y SH-SY5Y (b) tratadas con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-5 µM) y 0,5 mM de cuprizona durante 24 horas. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; # = diferencias estadísticamente significativas *versus* cuprizona # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Figura suplementaria 3.

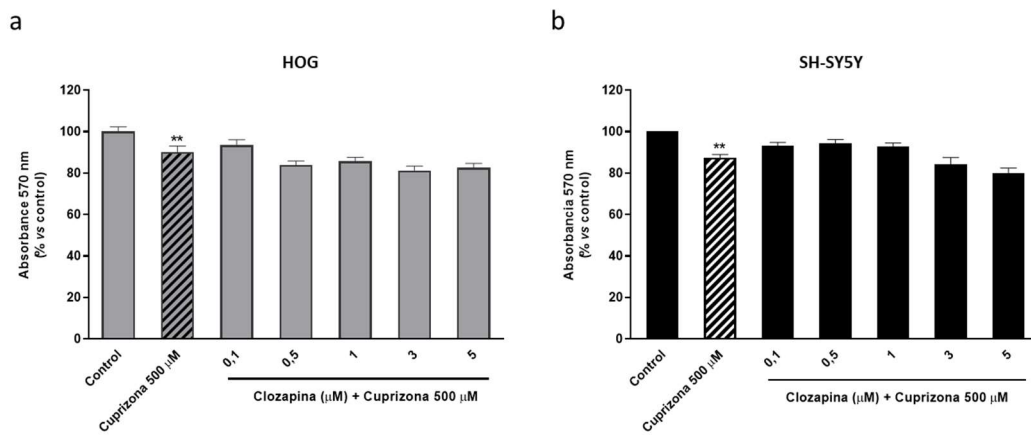


Figura S3. Ensayos MTT en células HOG (a) y SH-SY5Y (b) tratadas con 0,5 mM de cuprizona durante 24 horas seguidas de otras 24 horas con concentraciones crecientes de clozapina (0,1-5 μ M). La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de reducción de MTT respecto al control (n=6). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *= diferencias estadísticamente significativas *versus* control ** $p < 0,01$.

Bibliografía

- Abdanipour, A., Tiraihi, T., Noori-Zadeh, A., Majdi, A., & Gosaili, R. (2014). Evaluation of Lovastatin Effects on Expression of Anti-apoptotic Nrf2 and PGC-1 α Genes in Neural Stem Cells Treated with Hydrogen Peroxide. *Molecular Neurobiology*, *49*(3), 1364-1372.
- Åkerstrom, B., Flower, D. R., & Salier, J. P. (2000). Lipocalins: unity in diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1482*(1-2), 1-8.
- Ali, K., Abo-Ali, E. M., Kabir, M. D., Riggins, B., Nguy, S., Li, L., Srivastava, U., & Mya Mya Thinn, S. (2014). A Western-Fed Diet Increases Plasma HDL and LDL-Cholesterol Levels in ApoD^{-/-}Mice. *PLoS ONE*, *9*(12), 1-16.
- Amedoro, A., Berardi, A., Conte, A., Pelosin, E., Valente, D., Maggi, G., Tofani, M., & Galeoto, G. (2020). The effect of aquatic physical therapy on patients with multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *41*(102022), 1-7.
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & Van Der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, *129*(2), 154-169.
- Aung, L. L., Mouradian, M. M., Dhib-Jalbut, S., & Balashov, K. E. (2015). MMP-9 expression is increased in B lymphocytes during multiple sclerosis exacerbation and is regulated by microRNA-320a. *Journal of neuroimmunology*, *0*, 185-189.
- Axisa, P.-P., & Hafler, D. A. (2016). Multiple sclerosis: Genetics, biomarkers, treatments. *Current Opinion in Neurology*, *29*(3), 345-353.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 1-31.
- Bai, R., Guo, J., Ye, X.-Y., Xie, Y., & Xie, T. (2022). Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, *77*.
- Bajo-Grañeras, R., Ganfornina, M. D., Martín-Tejedor, E., & Sanchez, D. (2011a). Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia*, *59*, 1551-1566.
- Bajo-Grañeras, R., Sanchez, D., Gutierrez, G., González, C., Do Carmo, S., Rassart, E., & Ganfornina, M. D. (2011b). Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. *Journal of Neurochemistry*, *117*(6), 949-960.

- Barkhof, F., Hulst, H. E., Drulović, J., Uitdehaag, B. M. J., Matsuda, K., & Landin, R. (2010). Ibudilast in relapsing-remitting multiple sclerosis: A neuroprotectant? *Neurology*, *74*(13), 1033-1040.
- Bello-Morales, R., Crespillo, A. J., García, B., Dorado, L. Á., Martín, B., Tabarés, E., Krummenacher, C., De Castro, F., & López-Guerrero, J. A. (2014). The effect of cellular differentiation on HSV-1 infection of oligodendrocytic cells. *PLoS ONE*, *9*(2), 1-14.
- Belloir, B., Kövari, E., Surini-Demiri, M., & Savioz, A. (2001). Altered Apolipoprotein D expression in the brain of patients with Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience Research*, *64*(1), 61-69.
- Bénardais, K., Kotsiari, A., Škuljec, J., Koutsoudaki, P. N., Gudi, V., Singh, V., Vulinović, F., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2013a). Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotoxicity Research*, *24*(2), 244-250. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9380-9>
- Bénardais, K., Kotsiari, A., Škuljec, J., Koutsoudaki, P. N., Gudi, V., Singh, V., Vulinović, F., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2013b). Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotoxicity Research*, *24*(2), 244-250.
- Bender, S. J., & Weiss, S. R. (2010). Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *5*(3), 336-354.
- Benetti, F., Ventura, M., Salmini, B., Ceola, S., Carbonera, D., Mammi, S., Zitolo, A., D'Angelo, P., Urso, E., Maffia, M., Salvato, B., & Spisni, E. (2010). Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *NeuroToxicology*, *31*(5), 509-517.
- Bhatia, S., Jenner, A. M., Li, H., Ruberu, K., Spiro, A. S., Shepherd, C. E., Kril, J. J., Kain, N., Don, A., & Garner, B. (2013). Increased Apolipoprotein D Dimer Formation in Alzheimer's Disease Hippocampus is Associated with Lipid Conjugated Diene Levels. *Journal of Alzheimer's Disease*, *35*(3), 475-486.
- Bhatia, S., Kim, W. S., Shepherd, C. E., & Halliday, G. M. (2019). Apolipoprotein D Upregulation in Alzheimer's Disease but Not Frontotemporal Dementia. *Journal of Molecular Neuroscience*, *67*(1), 125-132.
- Bhatia, S., Knoch, B., Wong, J., Kim, W. S., Else, P. L., Oakley, A. J., & Garner, B. (2012). Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by Apolipoprotein D: Implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. *Biochemical Journal*, *442*(3), 713-721.
- Bjartmar, C., Wujek, J. ., & Trapp, B. . (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *206*(2), 165-171.

- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, *375*(6578), 296-301.
- Blais, Y., Sugimoto, K., Carriere, M., Haagensen, D. E., Labrie, F., & Simard, J. (1994). Potent stimulatory effect of interleukin-1 α on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast-cancer cells. *International Journal of Cancer*, *59*(3), 400-407.
- Blakemore, W. F. (1972). Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *Journal of Neurocytology*, *1*, 413-426.
- Boer, S., Sanchez, D., Reinieren, I., van den Boom, T., Udawela, M., Scarr, E., Ganfornina, M. D., & Dean, B. (2010). Decreased kainate receptors in the hippocampus of apolipoprotein D knockout mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *34*(2), 271-278.
- Bölskei, K., Kriszta, G., Sághy, É., Payrits, M., Sipos, É., Vranesics, A., Berente, Z., Ábrahám, H., Ács, P., Komoly, S., & Pintér, E. (2018). Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *Journal of Neuroimmunology*, *320*, 1-10.
- Boneschi, F. M., Vacchi, L., Rovaris, M., Capra, R., & Comi, G. (2013). Mitoxantrone for multiple sclerosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, *2013*(5), CD002127.
- Boyles, J. K., Notterpek, L. M., & Anderson, L. J. (1990). Accumulation of Apolipoproteins in the Regenerating Mammalian Peripheral Nerve. *The Journal of biological chemistry*, *265*(29), 17805-17815.
- Bradford, C. M., Ramos, I., Cross, A. K., Haddock, G., McQuaid, S., Nicholas, A. P., & Woodroffe, M. N. (2014). Localisation of citrullinated proteins in normal appearing white matter and lesions in the central nervous system in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *273*(1-2), 85-95.
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2009). Progressive multiple sclerosis. *Seminars in immunopathology*, *31*(4), 455-465.
- Briken, S., Gold, S., Patra, S., Vettorazzi, E., Harbs, D., Tallner, A., Ketels, G., Schulz, K., & Heesen, C. (2013). Effects of exercise on fitness and cognition in progressive MS: a randomized, controlled pilot trial. *Multiple Sclerosis*, *20*(3), 382-390.
- Brousse, B., Magalon, K., Durbec, P., & Cayre, M. (2016). Region and dynamic specificities of adult neural stem cells and oligodendrocyte precursors in myelin regeneration in the mouse brain. *Biology Open*, *5*(204), 980-992.

- Buntinx, M., Vanderlocht, J., Hellings, N., Vandenabeele, F., Lambrichts, I., Raus, J., Ameloot, M., Stinissen, P., & Steels, P. (2003). Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: Morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *Journal of Neurocytology*, 32(1), 25-38.
- Buntinx, Mieke, Moreels, M., Vandenabeele, F., Lambrichts, I., Raus, J., Steels, P., Stinissen, P., & Ameloot, M. (2004). Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, 76(6), 834-845.
- Buschmann, J. P., Berger, K., Awad, H., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2012). Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(1), 66-76.
- Cammer, W. (1999). The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. *Journal of the Neurological Sciences*, 168(2), 116-120.
- Caprariello, A. V., Rogers, J. A., Morgan, M. L., Hoghooghi, V., Plemel, J. R., Koebel, A., Tsutsui, S., Dunn, J. F., Kotra, L. P., Ousman, S. S., Wee Yong, V., & Stys, P. K. (2018). Biochemically altered myelin triggers autoimmune demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21), 5528-5533.
- Carassiti, D., Altmann, D. R., Petrova, N., Pakkenberg, B., Scaravilli, F., & Schmierer, K. (2018). Neuronal loss, demyelination and volume change in the multiple sclerosis neocortex. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(4), 377-390.
- Carlton, W. W. (1966). Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, α -benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 8(3), 512-521.
- Carlton, W. W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sciences*, 6(1), 11-19.
- Cavone, L., Peruzzi, B., Caporale, R., & Chiarugi, A. (2014). Long-term suppression of EAE relapses by pharmacological impairment of epitope spreading. *British Journal of Pharmacology*, 171(6), 1509.
- Centonze, D., Leocani, L., & Feys, P. (2020). Advances in physical rehabilitation of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, 33(3), 255-261.

- Cerina, M., Muthuraman, M., Gallus, M., Koirala, N., Dik, A., Wachsmuth, L., Hundehage, P., Schiffler, P., Tenberge, J. G., Fleischer, V., Gonzalez-Escamilla, G., Narayanan, V., Krämer, J., Faber, C., Budde, T., Groppa, S., & Meuth, S. G. (2020). Myelination- and immune-mediated MR-based brain network correlates. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(186), 1-16.
- Chandran, P., Upadhyay, J., Markosyan, S., Lisowski, A., Buck, W., Chin, C. L., Fox, G., Luo, F., & Day, M. (2012). Magnetic resonance imaging and histological evidence for the blockade of cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuroscience*, *202*, 446-453.
- Chang, H., Liu, J., Zhang, Y., Wang, F., Wu, Y., Zhang, L., Ai, H., Chen, G., & Yin, L. (2017). Increased central dopaminergic activity might be involved in the behavioral abnormality of cuprizone exposure mice. *Behavioural Brain Research*, *331*, 143-150.
- Chang, H. X., Wei, Y. Z., Chen, Y. J., Du, L., Cong, H. R., Zhang, X. H., Geng, X. C., & Yin, L. L. (2019). The antipsychotic-like effects of clozapine in C57BL/6 mice exposed to cuprizone: Decreased glial activation. *Behavioural Brain Research*, *364*, 157-161.
- Chen, J. L., Steele, T. W. J., & Stuckey, D. C. (2018). Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnology and Bioengineering*, *115*(2), 351-358.
- Chen, Z., Chen, J. T., Johnson, M., Gossman, Z. C., Hendrickson, M., Sakaie, K., Martinez-Rubio, C., Gale, J. T., & Trapp, B. D. (2015). Cuprizone does not induce CNS demyelination in nonhuman primates. *Annals of clinical and translational neurology*, *2*(2), 208-213.
- Ciapparelli, A., Dell'Osso, L., Pini, S., Chiavacci, M. C., & Cassano, G. B. (2000). Clozapine for Treatment-Refractory Schizophrenia, Schizoaffective Disorder, and Psychotic Bipolar Disorder: A 24-Month Naturalistic Study. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *61*(5), 329-334.
- Clausen, B. H., Lambertsen, K. L., Meldgaard, M., & Finsen, B. (2005). A quantitative in situ hybridization and polymerase chain reaction study of microglial-macrophage expression of interleukin-1 β mRNA following permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience*, *132*(4), 879-892.
- Clemente, D., Ortega, M. C., Melero-Jerez, C., & de Castro, F. (2013). The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(268), 1-15.

BIBLIOGRAFÍA

- Cohen, J. A., Coles, A. J., Arnold, D. L., Confavreux, C., Fox, E. J., Hartung, H.-P., Havrdova, E., Selmaj, K. W., Weiner, H. L., Fisher, E., Brinar, V. V., Giovannoni, G., Stojanovic, M., Ertik, B. I., Lake, S. L., Margolin, D. H., Panzara, M. A., & Compston, D. A. S. (2012). Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*, *380*(9856), 1819-1828.
- Colacurcio, D. J., & Nixon, R. A. (2016). Disorders of lysosomal acidification—The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing Research Reviews*, *32*, 75-88.
- Confavreux, C., O'Connor, P., Comi, G., Freedman, M. S., Miller, A. E., Olsson, T. P., Wolinsky, J. S., Bagulho, T., Delhay, J.-L., Dukovic, D., Truffinet, P., & Kappos, L. (2014). Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology*, *13*(3), 247-256.
- Conte, A., & Silván, C. V. (2021). Review of Available Data for the Efficacy and Effectiveness of Nabiximols Oromucosal Spray (Sativex®) in Multiple Sclerosis Patients with Moderate to Severe Spasticity. *Neurodegenerative Diseases*, *21*(3-4), 55-62.
- Correale, J., Hohlfeld, R., & Baranzini, S. E. (2022). The role of the gut microbiota in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, *18*(9), 544-558.
- Costa, L., Amaral, C., Teixeira, N., Correia-Da-Silva, G., & Fonseca, B. M. (2016). Cannabinoid-induced autophagy: Protective or death role? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *122*, 54-63.
- Cotsapas, C., Mitrovic, M., & Hafler, D. (2018). Multiple sclerosis. En *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 148, pp. 723-730).
- Coyne, K. S., Boscoe, A. N., Currie, B. M., Landrian, A. S., & Wandstrat, T. L. (2015). Understanding drivers of employment changes in a multiple sclerosis population. *International Journal of MS Care*, *17*(5), 245-252.
- Cross, A. H., Trotter, J. L., & Lyons, J.-A. (2001). B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *Journal of Neuroimmunology*, *112*(1-2), 1-14.
- Dassati, S., Waldner, A., & Schweigreiter, R. (2014). Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiology of Aging*, *35*(7), 1632-1642.
- Dawson, J. W. (1916). The Histology of Disseminated Sclerosis. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, *50*(3), 517-740.

- De Kleijn, K. M. A., Zuure, W. A., Peijnenborg, J., Heuvelmans, J. M., & Martens, G. J. M. (2019). Reappraisal of Human HOG and MO3.13 Cell Lines as a Model to Study Oligodendrocyte Functioning. *Cells*, *8*(1096), 1-23.
- de Magalhães, J. P., Curado, J., & Church, G. M. (2009). Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*, *25*(7), 875-881.
- Dedoni, S., Scherma, M., Camoglio, C., Siddi, C., Dazzi, L., Puliga, R., Frau, J., Cocco, E., & Fadda, P. (2023). An overall view of the most common experimental models for multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *184*, 1-21.
- Del Caño-Espinel, M., Acebes, J. R., Sanchez, D., & Ganfornina, M. D. (2015). Lazarillo-related Lipocalins confer long-term protection against type 1 Spinocerebellar Ataxia degeneration contributing to optimize selective autophagy. *Molecular Neurodegeneration*, *10*(1).
- del Valle, E., Navarro, A., Astudillo, A., & Tolvía, J. (2003). Apolipoprotein D Expression in Human Brain Reactive Astrocytes. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *51*(10), 1285-1290.
- del Valle, E., Rubio-Sardón, N., Menéndez-Pérez, C., Martínez-Pinilla, E., & Navarro, A. (2023). Apolipoprotein D as a Potential Biomarker in Neuropsychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(21), 1-16.
- Dentelli, P., Del Sorbo, L., Rosso, A., Molinar, A., Garbarino, G., Camussi, G., Pegoraro, L., & Brizzi, M. F. (1999). Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation. *Journal of Immunology*, *163*(4), 2151-2159.
- DePaula-Silva, A. B., Hanak, T. J., Libbey, J. E., & Fujinami, R. S. (2017). Theiler's murine encephalomyelitis virus infection of SJL/J and C57BL/6J mice: Models for multiple sclerosis and epilepsy. *Journal of Neuroimmunology*, *308*, 30-42.
- Desai, P. P., Ikonovic, M. D., Abrahamson, E. E., Hamilton, R. L., Isanski, B. A., Hope, C. E., Klunk, W. E., DeKosky, S. T., & Kamboh, M. I. (2005). Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiology of Disease*, *20*(2), 574-582.
- Deshmukh, V. A., Tardif, V., Lyssiotis, C. A., Green, C. C., Kerman, B., Kim, H. J., Padmanabhan, K., Swoboda, J. G., Ahmad, I., Kondo, T., Gage, F. H., Theofilopoulos, A. N., Lawson, B. R., Schultz, P. G., & Lairson, L. L. (2013). A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature*, *502*(7471), 332.
- Desmarais, F., Bergeron, K. F., Rassart, E., & Mounier, C. (2019). Apolipoprotein D overexpression alters hepatic prostaglandin and omega fatty acid metabolism during the development of a non-inflammatory hepatic steatosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1864*(4), 522-531.

- Didonna, A., & Oksenberg, J. R. (2015). Genetic determinants of risk and progression in multiple sclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 449, 16-22.
- Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of Lipid research*, 45(8), 1375-1397.
- Diez-Hermano, S., Mejias, A., Sanchez, D., Gutierrez, G., & Ganfornina, M. D. (2020). Control of the neuroprotective Lipocalin Apolipoprotein D expression by alternative promoter regions and differentially expressed mRNA 5' UTR variants. *PLoS ONE*, 15(6), 1-19.
- Díez-Itza, I., Vizoso, F., Merino, A. M., Sánchez, L. M., Tolivia, J., Fernández, J., Ruibal, A., & López-Otín, C. (1994). Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *The American Journal of Pathology*, 144(2), 310-320.
- Disanto, G., Morahan, J. M., Barnett, M. H., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2012). The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology*, 78, 823-832.
- Do Carmo, S., Fournier, D., Mounier, C., & Rassart, E. (2009). Human apolipoprotein D overexpression in transgenic mice induces insulin resistance and alters lipid metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(4), 802-811.
- Do Carmo, S., Jacomy, H., Talbot, P. J., & Rassart, E. (2008). Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10330-10338.
- Do Carmo, S., Levros, L.-C., & Rassart, E. (2007). Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(6), 954-969.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5514-5523.
- Dutta, D., & Donaldson, J. G. (2012). Search for inhibitors of endocytosis. *Cellular Logistics*, 2(4), 203-208.
- Ebers, G. C. (1998). Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *The Lancet*, 352(9139), 1498-1504.
- Edlow, A. G., Vora, N. L., Hui, L., Wick, H. C., Cowan, J. M., & Bianchi, D. W. (2014). Maternal Obesity Affects Fetal Neurodevelopmental and Metabolic Gene Expression: A Pilot Study. *PLoS ONE*, 9(2), 1-11.

- Eichinger, A., Nasreen, A., Hyun, J. K., & Skerra, A. (2007). Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(42), 31068-31075.
- Eigeliene, N., Elo, T., Linhala, M., Hurme, S., Erkkola, R., & Härkönen, P. (2012). Androgens Inhibit the Stimulatory Action of 17 β -Estradiol on Normal Human Breast Tissue in Explant Cultures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *97*(7), E1116-E1127.
- El-Darzi, N., Mast, N., Petrov, A. M., Dao, T., Astafev, A. A., Saadane, A., Prendergast, E., Schwarz, E., Bederman, I., & Pikuleva, I. A. (2021). Studies of ApoD $-/-$ and ApoD $-/-$ ApoE $-/-$ mice uncover the APOD significance for retinal metabolism, function, and status of chorioretinal blood vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(3), 963-983.
- Elbaz, E. M., Senousy, M. A., El-Tanbouly, D. M., & Sayed, R. H. (2018). Neuroprotective effect of linagliptin against cuprizone-induced demyelination and behavioural dysfunction in mice: A pivotal role of AMPK/SIRT1 and JAK2/STAT3/NF- κ B signalling pathway modulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *352*, 153-161.
- Elliott, D. A., Weickert, C. S., & Garner, B. (2010). Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clinical Lipidology*, *5*(4), 555-573.
- Elo, T., Sipilä, P., Valve, E., Kujala, P., Toppari, J., Poutanen, M., & Härkönen, P. (2012). Fibroblast growth factor 8b causes progressive stromal and epithelial changes in the epididymis and degeneration of the seminiferous epithelium in the testis of transgenic mice. *Biology of reproduction*, *86*(5), 1-12.
- Ermakov, E. A., Dmitrieva, E. M., Parshukova, D. A., Kazantseva, D. V., Vasilieva, A. R., & Smirnova, L. P. (2021). Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*, 1-37.
- Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G. I., Latina, V., de Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M. R., Iuvone, T., & Steardo, L. (2011). Cannabidiol Reduces A β -Induced Neuroinflammation and Promotes Hippocampal Neurogenesis through PPAR γ Involvement. *PLOS ONE*, *6*(12), e28668.
- Evans, W. A. (1942). An encephalographic ratio for estimating ventricular enlargement and cerebral atrophy. *Archives of Neurology & Psychiatry*, *47*(6), 931-937.
- Faizi, M., Salimi, A., Seydi, E., Naserzadeh, P., Kouhnavard, M., Rahimi, A., & Pourahmad, J. (2016). Toxicity of cuprizone a Cu $^{2+}$ chelating agent on isolated mouse brain mitochondria: a justification for demyelination and subsequent behavioral dysfunction. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *26*(4), 276-283.

- Fallier-Becker, P., Bonzheim, I., & Pfeiffer, F. (2022). Cuprizone feeding induces swollen astrocyte endfeet. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *474*(12), 1275-1283.
- Fancy, S. P. J., Harrington, E. P., Yuen, T. J., Silbereis, J. C., Zhao, C., Baranzini, S. E., Bruce, C. C., Otero, J. J., Huang, E. J., Nusse, R., Franklin, R. J. M., & Rowitch, D. H. (2011). Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nature Neuroscience*, *14*(8), 1016.
- Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M. S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W. J., Dorsey, E. R., Elbaz, A., Ellenbogen, R. G., Fisher, J. L., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S. L., Johnson, C. O., Kassebaum, N. J., Logroscino, G., Marin, B., ... Vos, T. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(5), 459-480.
- Fernández-Ruiz, J., Gómez-Ruiz, M., García, C., Hernández, M., & Ramos, J. A. (2017). Modeling Neurodegenerative Disorders for Developing Cannabinoid-Based Neuroprotective Therapies. *Methods in Enzymology*, *593*, 175-198.
- Fernández-Ruiz, J., Sagredo, O., Pazos, M. R., García, C., Pertwee, R., Mechoulam, R., & Martínez-Orgado, J. (2013). Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*(2), 323-333.
- Fox, E. J., Alroughani, R., Brassat, D., Broadley, S., Cohen, J. A., Hartung, H. P., Havrdova, E., Oreja-Guevara, C., Selmaj, K. W., Singer, B., Vermersch, P., Wray, S., Margolin, D. H., Thangavelu, K., Chiriac, M., & Coles, A. J. (2016). Efficacy of alemtuzumab is durable over 6 years in patients with with active relapsing-remitting multiple sclerosis and an inadequate response to prior therapy in the absence of continuous treatment (CARE-MS II). *Multiple Sclerosis*, *22*(S3), 596.
- Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M. T., & Vilella, E. (2007). Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology Letters*, *169*(3), 205-213.
- Franklin, R. J.M., Crang, A. J., & Blakemore, W. F. (1993). The reconstruction of an astrocytic environment in glia-deficient areas of white matter. *Journal of Neurocytology*, *22*(5), 382-396.
- Franklin, Robin J. M., & Goldman, S. A. (2015). Glia Disease and Repair—Remyelination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(7), 1-28.
- Franz, G., Reindl, M., Patel, S. C., Beer, R., Unterrichter, I., Berger, T., Schmutzhard, E., Poewe, W., & Kampfl, A. (1999). Increased Expression of Apolipoprotein D Following Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurochemistry*, *73*(4), 1615-1625.

- Fridkis-Hareli, M., Teitelbaum, D., Gurevich, E., Pecht, I., Brautbar, C., Kwon, O. J., Brenner, T., Arnon, R., & Sela, M. (1994). Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(11), 4876.
- Fuller, G. N., & Goodman, J. C. (2001). *Practical review of neuropathology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., Kassmann, C. M., Tzvetanova, I. D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M. W., Moraes, C. T., Frahm, J., Goebbels, S., & Nave, K. A. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, *485*(7399), 517-521.
- Fyfe-Desmarais, G., Desmarais, F., Rassart, É., & Mounier, C. (2023). Apolipoprotein D in Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants*, *12*(5).
- Ganfornina, M. D., Do Carmo, S., Lora, J. M., Torres-Schumann, S., Vogel, M., Allhorn, M., González, C., Bastiani, M. J., Rassart, E., & Sanchez, D. (2008). Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell*, *7*, 506-515.
- Ganfornina, M. D., Do Carmo, S., Martínez, E., Tolia, J., Navarro, A., Rassart, E., & Sanchez, D. (2010). ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia*, *58*(11), 1320-1334.
- García-Mateo, N., Ganfornina, M. D., Montero, O., Gijón, M. A., Murphy, R. C., & Sanchez, D. (2014). Schwann cell-derived Apolipoprotein D controls the dynamics of post-injury myelin recognition and degradation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 1-19.
- García-Mateo, N., Pascua-Maestro, R., Pérez-Castellanos, A., Lillo, C., Sanchez, D., & Ganfornina, M. D. (2018). Myelin extracellular leaflet compaction requires apolipoprotein D membrane management to optimize lysosomal-dependent recycling and glyocalyx removal. *Glia*, *66*(3), 670-687.
- García López, F. J., García-Merino, A., Alcalde-Cabero, E., & de Pedro-Cuesta, J. (2022). Incidencia y prevalencia de la esclerosis múltiple en España. Una revisión sistemática. *Neurología*, 1-12.
- Germeyer, A., Capp, E., Schlicksupp, F., Jauckus, J., Von Rango, U., Von Wolff, M., & Strowitzki, T. (2013). Cell-type specific expression and regulation of apolipoprotein D and E in human endometrium. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, *170*(2), 487-491.

- Gitto, L. (2017). Living with Multiple Sclerosis in Europe: Pharmacological Treatments, Cost of Illness, and Health-Related Quality of Life Across Countries. En *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis* (pp. 17-37). Codon Publications.
- Glezer, I., Lapointe, A., & Rivest, S. (2006). Innate immunity triggers oligodendrocyte progenitor reactivity and confines damages to brain injuries. *The FASEB Journal*, *20*(6), 750-752.
- Goldberg, J., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2015). Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, *57*(2), 166-175.
- Gonsette, R. E. (2008). Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity. *Journal of the Neurological Sciences*, *274*(1-2), 48-53.
- Goodin, D. S., Reder, A. T., Ebers, G. C., Cutter, G., Kremenchutzky, M., Oger, J., Langdon, D., Rametta, M., Beckmann, K., DeSimone, T. M., & Knappertz, V. (2012). Survival in MS: A randomized cohort study 21 years after the start of the pivotal IFN β -1b trial. *Neurology*, *78*(17), 1322.
- Grimm, M. O. W., Blümel, T., Lauer, A. A., Janitschke, D., Stahlmann, C., Mett, J., Hauptenthal, V. J., Miederer, A.-M., Niemeyer, B. A., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2020). The impact of capsaicinoids on APP processing in Alzheimer's disease in SH-SY5Y cells. *Nature*, *10*(9164), 1-16.
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: Lessons learned. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(73), 1-24.
- Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., Daly, M. J., De Jager, P. L., de Bakker, P. I., Gabriel, S. B., Mirel, D. B., Ivinson, A. J., Pericak-Vance, M. A., Gregory, S. G., Rioux, J. D., McCauley, J. L., Haines, J. L., Barcellos, L. F., Cree, B., Oksenberg, J. R., & Hauser, S. L. (2007). Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *The New England Journal of Medicine*, *357*(9), 851-862.
- Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., & Reshi, M. S. (2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, *11*(3), 1-27.
- Hånell, A., & Marklund, N. (2014). Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*(252), 1-13.
- Harsan, L. A., Steibel, J., Zaremba, A., Agin, A., Sapin, R., Poulet, P., Guignard, B., Parizel, N., Grucker, D., Boehm, N., Miller, R. H., & Ghandour, M. S. (2008). Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(52), 14189-14201.

- Hashimoto, M., Yamamoto, S., Iwasa, K., Yamashina, K., Ishikawa, M., Maruyama, K., Bosetti, F., & Yoshikawa, K. (2017). The flavonoid Baicalein attenuates cuprizone-induced demyelination via suppression of neuroinflammation. *Brain Research Bulletin*, *135*, 47-52.
- Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., & Rodgers, R. J. (2015). Transcriptome Comparisons Identify New Cell Markers for Theca Interna and Granulosa Cells from Small and Large Antral Ovarian Follicles. *PLoS ONE*, *10*(3), 1-13.
- Hauser, S. L., Bar-Or, A., Comi, G., Giovannoni, G., Hartung, H.-P., Hemmer, B., Lublin, F., Montalban, X., Rammohan, K. W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Wolinsky, J. S., Arnold, D. L., Klingenschmitt, G., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Chin, P., Mairon, N., ... Kappos, L. (2017). Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine*, *376*(3), 221-234.
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *American Journal of Medicine*, *133*(12), 1380-1390.
- He, X., Jittiwat, J., Kim, J.-H., Jenner, A. M., Farooqui, A. A., Patel, S. C., & Ong, W.-Y. (2009). Apolipoprotein D modulates F2-isoprostane and 7-ketocholesterol formation and has a neuroprotective effect on organotypic hippocampal cultures after kainate-induced excitotoxic injury. *Neuroscience Letters*, *455*, 183-186.
- Heckers, S., Held, N., Kronenberg, J., Skripuletz, T., Bleich, A., Gudi, V., & Stangel, M. (2017). Investigation of Cuprizone Inactivation by Temperature. *Neurotoxicity Research*, *31*(4), 570-577.
- Hemm, R. D., Carlton, W. W., & Welser, J. R. (1971). Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *18*(4), 869-882.
- Herz, J., & Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*(11), 850-859.
- Hesse, A., Wagner, M., Held, J., Brück, W., Salinas-Riester, G., Hao, Z., Waisman, A., & Kuhlmann, T. (2010). In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiology of Disease*, *37*(2), 362-369.
- Hillis, J. M., Davies, J., Mundim, M. V., Al-Dalahmah, O., & Szele, F. G. (2016). Cuprizone demyelination induces a unique inflammatory response in the subventricular zone. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 190.
- Hiremath, M. M., Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J. P. Y., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (1998). Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, *92*(1-2), 38-49.

- Hradsky, J., Mikhaylova, M., Karpova, A., Kreutz, M. R., & Zuschratter, W. (2013). Super-resolution microscopy of the neuronal calcium-binding proteins calneuron-1 and caldendrin. *Methods in Molecular Biology*, *963*, 147-169.
- Hu, B.-Y., Du, Z.-W., & Zhang, S.-C. (2009). Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *4*(11), 1622.
- Hu, C.-Y., Ong, W.-Y., Sundaram, R. K., Chan, C., & Patel, S. C. (2001). Immunocytochemical localization of apolipoprotein D in oligodendrocyte precursor-like cells, perivascular cells, and pericytes in the human cerebral cortex. *Journal of Neurocytology*, *30*(3), 209-218.
- Huang, J. K., Jarjour, A. A., Oumesmar, B. N., Kerninon, C., Williams, A., Krezel, W., Kagechika, H., Bauer, J., Zhao, C., Evercooren, A. B.-V., Chambon, P., Ffrench-Constant, C., & Franklin, R. J. M. (2011). Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nature Neuroscience*, *14*(1), 53.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., & Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological reviews*, *87*(4), 1175-1213.
- Hynes, J., Floyd, S., Soini, A. E., O'connor, R., & Papkovsky, D. B. (2003). Fluorescence-Based Cell Viability Screening Assays Using Water-Soluble Oxygen Probes. *Journal of Biomolecular Screening*, *8*(3), 264-272.
- Hyung, S., Yoon Lee, B., Park, J. C., Kim, J., Hur, E. M., & Francis Suh, J. K. (2015). Coculture of Primary Motor Neurons and Schwann Cells as a Model for in Vitro Myelination. *Scientific Reports*, *5*, 15122.
- Jersild, C., Hansen, G. S., Svejgaard, A., Fog, T., Thomsen, M., & Dupont, B. (1973). Histocompatibility Determinants in Multiple Sclerosis, With Special Reference To Clinical Course. *The Lancet*, *302*(7840), 1221-1225.
- Jersild, C., Svejgaard, A., & Fog, T. (1972). HL-A Antigens and Multiple Sclerosis. *The Lancet*, *299*(7762), 1240-1241.
- Kabat, E. A., Moore, D. H., & Landow, H. (1942). An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *Journal of Clinical Investigation*, *21*(5), 571-577.
- Kalman, K., McConathy, W., Araoz, C., Kasa, P., & Lacko, A. G. (2000). Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurological Research*, *22*(4), 330-336.
- Kappos, L., Bar-Or, A., Cree, B. A. C., Fox, R. J., Giovannoni, G., Gold, R., Vermersch, P., Arnold, D. L., Arnould, S., Scherz, T., Wolf, C., Wallström, E., Dahlke, F., Achiron, A., Achtnichts, L., Agan, K., Akman-Demir, G., Allen, A. B., Antel, J. P., ... Ziemssen, T. (2018). Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet*, *391*(10127), 1263-1273.

- Kappos, L., Radue, E.-W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., & Burtin, P. (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, *362*(5), 387-401.
- Kesterson, J. W., & Carlton, W. W. (1970). Aqueductal stenosis as the cause of hydrocephalus in mice fed the substituted hydrazine, cuprizone. *Experimental and Molecular Pathology*, *13*(3), 281-294.
- Kesterson, J. W., & Carlton, W. W. (1972). Cuprizone toxicosis in mice—Attempts to antidote the toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *22*(1), 6-13.
- Kfir, S., Basavaraja, R., Wigoda, N., Ben-Dor, S., Orr, I., & Meidan, R. (2018). Genomic profiling of bovine corpus luteum maturation. *PLoS ONE*, *13*(3), 1-19.
- Kielkopf, C. S., Low, J. K. K., Mok, Y., Bhatia, S., Oakley, A. J., Whitten, A. E., Garner, B., & Simon, H. J. (2018). Identification of a novel tetrameric structure for human apolipoprotein-D. *Journal of Structural Biology*, *203*(3), 205-218.
- Kielkopf, C. S., Whitten, A. E., Garner, B., & Brown, S. H. J. (2021). Small angle X-ray scattering analysis of ligand-bound forms of tetrameric apolipoprotein-D. *Bioscience Reports*, *41*(1), 1-9.
- Kim, D. S., Lee, S. J., Park, S. Y., Yoo, H. J., Kim, S. H., Kim, K. J., & Cho, H. J. (2001). Differentially expressed genes in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Neuroreport*, *12*(15), 3401-3405.
- Kim, W. S., Wong, J., Weickert, C. S., Webster, M. J., Bahn, S., & Garner, B. (2009). Apolipoprotein-D expression is increased during development and maturation of the human prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry*, *109*(4), 1053-1066.
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathologica*, *118*(6), 723-736.
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain pathology*, *27*(2), 123-137.
- Kipp, M., Van Der Star, B., Vogel, D. Y. S., Puentes, F., Van Der Valk, P., Baker, D., & Amor, S. (2012). Experimental *in vivo* and *in vitro* models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *1*(1), 15-28.
- Kobelt, G. (2006). Health economic issues in MS. *International Multiple Sclerosis Journal*, *13*(1), 17-26.
- Koch, S., Donarski, N., Goetze, K., Kreckel, M., Stuerenburg, H. J., Buhmann, C., & Beisiegel, U. (2001). Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *Journal of Lipid Research*, *42*(7), 1143-1151.

- Kolahdouzan, M., Futhey, N. C., Kieran, N. W., & Healy, L. M. (2019). Novel Molecular Leads for the Prevention of Damage and the Promotion of Repair in Neuroimmunological Disease. *Frontiers in Immunology*, *10*(1657), 1-15.
- Kondo, M. A., Fukudome, D., Smith, D. R., Gallagher, M., Kamiya, A., & Sawa, A. (2016). Dimensional assessment of behavioral changes in the cuprizone short-term exposure model for psychosis. *Neuroscience Research*, *107*, 70-74.
- Kosacka, J., Gericke, M., Nowicki, M., Kacza, J., Borlak, J., & Spanel-Borowski, K. (2009). Apolipoproteins D and E3 exert neurotrophic and synaptogenic effects in dorsal root ganglion cell cultures. *Neuroscience*, *162*(2), 282-291.
- Koudriavtseva, T., & Mainero, C. (2016). Neuroinflammation, neurodegeneration and regeneration in multiple sclerosis: intercorrelated manifestations of the immune response. *Neural Regeneration Research*, *11*(11), 1727-1730.
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods in Molecular Biology*, *1078*, 9-21.
- Krishnamoorthy, G., & Wekerle, H. (2009). EAE: An immunologist's magic eye. *European Journal of Immunology*, *39*(8), 2031-2035.
- Kumar, D. R., Aslinia, F., Yale, S. H., & Mazza, J. J. (2011). Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. *Clinical Medicine & Research*, *9*(1), 46-49.
- Kumar, P., Sharma, G., Gupta, V., Kaur, R., Thakur, K., Malik, R., Kumar, A., Kaushal, N., & Raza, K. (2018). Preclinical Explorative Assessment of Dimethyl Fumarate-Based Biocompatible Nanolipoidal Carriers for the Management of Multiple Sclerosis. *ACS Chemical Neuroscience*, *9*(5), 1152-1158.
- Kumar, U. (2012). Immunohistochemical distribution of somatostatin and somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in hypothalamus of ApoD knockout mice brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, *48*(3), 684-695.
- Lai, C. J., Cheng, H. C., Lin, C. Y., Huang, S. H., Chen, T. H., Chung, C. J., Chang, C. H., Wang, H. D., & Chuu, C. P. (2017). Activation of liver X receptor suppresses angiogenesis via induction of ApoD. *FASEB Journal*, *31*(12), 5568-5576.
- Lalive, P. H., Neuhaus, O., Benkhoucha, M., Burger, D., Hohlfeld, R., Zamvil, S. S., & Weber, M. S. (2011). Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs*, *25*(5), 401-414.

- Lambert, J., Provost, P. R., Marcel, Y. L., & Rassart, E. (1993). Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1172*(1-2), 190-192.
- Lassmann, H., & van Horssen, J. (2016). Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1862*(3), 506-510.
- Lassmann, H., van Horssen, J., & Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature reviews. Neurology*, *8*(11), 647-656.
- Le Page, E., Veillard, D., Laplaud, D. A., Hamonic, S., Wardi, R., Lebrun, C., Zagnoli, F., Wiertlewski, S., Deburghgraeve, V., Coustans, M., & Edan, G. (2015). Oral versus intravenous high-dose methylprednisolone for treatment of relapses in patients with multiple sclerosis (COPOUSEP): a randomised, controlled, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet*, *386*(9997), 974-981.
- Leopold, P., Schmitz, C., & Kipp, M. (2019). Animal Weight Is an Important Variable for Reliable Cuprizone-Induced Demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience*, *68*(4), 522-528.
- Leung, G., Sun, W., Zheng, L., Brookes, S., Tully, M., & Shi, R. (2011). Anti-acrolein treatment improves behavioral outcome and alleviates myelin damage in EAE mouse. *Neuroscience*, *173*, 155.
- Leung, W. C. Y., Lawrie, A., Demaries, S., Massaeli, H., Burry, A., Yablonsky, S., Sarjeant, J. M., Fera, E., Rassart, E., Pickering, J. G., & Rabinovitch, M. (2004). Apolipoprotein D and platelet-derived growth factor-BB synergism mediates vascular smooth muscle cell migration. *Circulation Research*, *95*(2), 179-186.
- Levros, L. C., Carmo, S. Do, Edouard, E., Legault, P., Charfi, C., & Rassart, E. (2010). Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: Implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1803*(9), 1062-1071.
- Li, H., Ruberu, K., Karl, T., & Garner, B. (2016). Cerebral Apolipoprotein-D Is Hypoglycosylated Compared to Peripheral Tissues and Is Variably Expressed in Mouse and Human Brain Regions. *PLoS ONE*, *11*(2), 1-13.
- Li, H., Ruberu, K., Muñoz, S. S., Jenner, A. M., Spiro, A., Zhao, H., Rassart, E., Sanchez, D., Ganfornina, M. D., Karl, T., & Garner, B. (2015). Apolipoprotein D modulates amyloid pathology in APP/PS1 Alzheimer's disease mice. *Neurobiology of Aging*, *36*(5), 1820-1833.
- Lim, W., Bae, H., & Song, G. (2016). Differential expression of apolipoprotein D in male reproductive system of rats by high-fat diet. *Andrology*, *4*(6), 1115-1122.

- Lindner, M., Heine, S., Haastert, K., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Grothe, C., Baumgärtner, W., & Stangel, M. (2008). Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathology and applied neurobiology*, *34*(1), 105-114.
- Liu, L., Belkadi, A., Darnall, L., Hu, T., Drescher, C., Cotleur, A. C., Padovani-Claudio, D., He, T., Choi, K., Lane, T. E., Miller, R. H., & Ransohoff, R. M. (2010). CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: Relevance to multiple sclerosis. *Nature Neuroscience*, *13*(3), 319-326.
- Loerch, P. M., Lu, T., Dakin, K. A., Vann, J. M., Isaacs, A., Geula, C., Wang, J., Pan, Y., Gabuzda, D. H., Li, C., Prolla, T. A., & Yankner, B. A. (2008). Evolution of the Aging Brain Transcriptome and Synaptic Regulation. *PLoS ONE*, *3*(10), 1-13.
- López-Boado, Y. S., Tolivia, J., & López-Otín, C. (1994). Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, *269*(43), 26871-26878.
- Luchetti, S., Fransen, N. L., Corbert, , Van Eden, G., Ramaglia, V., Mason, M., & Huitinga, I. (2018). Progressive multiple sclerosis patients show substantial lesion activity that correlates with clinical disease severity and sex: a retrospective autopsy cohort analysis. *Acta Neuropathologica*, *135*, 511-528.
- Luo, M., Deng, M., Yu, Z., Zhang, Y., Xu, S., Hu, S., & Xu, H. (2020). Differential Susceptibility and Vulnerability of Brain Cells in C57BL/6 Mouse to Mitochondrial Dysfunction Induced by Short-Term Cuprizone Exposure. *Frontiers in Neuroanatomy*, *14*(30), 1-13.
- Madill, M., Fitzgerald, D., O'Connell, K. E., Dev, K. K., Shen, S., & FitzGerald, U. (2016). In vitro and ex vivo models of multiple sclerosis. *Drug Discovery Today*, *21*(9), 1504-1511.
- Mahadik, S. P., Khan, M. M., Evans, D. R., & Parikh, V. V. (2002). Elevated plasma level of apolipoprotein D in schizophrenia and its treatment and outcome. *Schizophrenia Research*, *58*(1), 55-62.
- Markovic, M., Trajkovic, V., Drulovic, J., Mesaros, S., Stojkovic, N., Dujmovic, I., & Stojkovic, M. M. (2003). Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, *211*(1-2), 67-73.
- Martineau, C., Najyb, O., Signor, C., Rassart, É., & Moreau, R. (2016). Apolipoprotein D deficiency is associated to high bone turnover, low bone mass and impaired osteoblastic function in aged female mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *65*(9), 1247-1258.

- Martínez-Pinilla, E., Reyes-Resina, I., Oñatibia-Astibia, A., Zamarbide, M., Ricobaraza, A., Navarro, G., Moreno, E., Dopeso-Reyes, I. G., Sierra, S., Rico, A. J., Roda, E., Lanciego, J. L., & Franco, R. (2014). CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Experimental Neurology*, *261*, 44-52.
- Martínez-Pinilla, Eva, Aguinaga, D., Navarro, G., Rico, A. J., Oyarzábal, J., Sánchez-Arias, J. A., Lanciego, J. L., & Franco, R. (2019). Targeting CB 1 and GPR55 Endocannabinoid Receptors as a Potential Neuroprotective Approach for Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, *56*(8), 5900-5910.
- Martínez-Pinilla, Eva, Navarro, A., Ordóñez, C., del Valle, E., & Tolivia, J. (2015). Apolipoprotein D subcellular distribution pattern in neuronal cells during oxidative stress. *Acta Histochemica*, *117*(6), 536-544.
- Martínez, E., Navarro, A., Ordóñez, C., Del Valle, E., & Tolivia, J. (2012). Amyloid- β 25-35 induces Apolipoprotein D synthesis and growth arrest in HT22 hippocampal cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, *30*(2), 233-244.
- Martínez, E., Navarro, A., Ordóñez, C., Del Valle, E., & Tolivia, J. (2013). Oxidative stress induces Apolipoprotein D overexpression in hippocampus during aging and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *36*(1), 129-144.
- Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathology*, *11*(1), 116.
- Mazzulli, J. R., Xu, Y.-H., Sun, Y., Knight, A. L., Mclean, P. J., Caldwell, G. A., Sidransky, E., Grabowski, G. A., & Krainc, D. (2011). Gaucher Disease Glucocerebrosidase and α -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell*, *146*, 37-52.
- McCarthy, M. M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews*, *88*(1), 91-124.
- McConathy, W. J., & Alaupovic, P. (1973). Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: A new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Letters*, *37*(2), 178-182.
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.-P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., Noort, S. Van Den, Weinschenker, B. Y., & Wolinsky, J. S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, *50*(1), 121-127.
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H., & Miller, S. D. (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *NATURE MEDICINE VOLUME*, *11*(3), 335-339.
- McQualter, J. L., & Bernard, C. C. A. (2007). Multiple sclerosis: A battle between destruction and repair. *Journal of Neurochemistry*, *100*(2), 295-306.

BIBLIOGRAFÍA

- Merkler, D., Ernsting, T., Kerschensteiner, M., Brück, W., & Stadelmann, C. (2006). A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain*, *129*(8), 1972-1983.
- Merrill, J. E. (2009). In Vitro and In Vivo Pharmacological Models to Assess Demyelination and Remyelination. *Neuropsychopharmacology*, *34*(1), 55-73.
- Messori, L., Casini, A., Gabbiani, C., Sorace, L., Muniz-Miranda, M., & Zatta, P. (2007). Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Transactions*, *21*, 2112-2114.
- Moldovan, N., Al-Ebraheem, A., Lobo, L., Park, R., Farquharson, M. J., & Bock, N. A. (2015). Altered transition metal homeostasis in the cuprizone model of demyelination. *NeuroToxicology*, *48*, 1-8.
- Montpied, P., de Bock, F., Lerner-Natoli, M., Bockaert, J., & Rondouin, G. (1999). Hippocampal alterations of apolipoprotein E and D mRNA levels in vivo and in vitro following kainate excitotoxicity. *Epilepsy Research*, *35*(2), 135-146.
- Morais Cabral, J. H., Atkins, G. L., Sánchez, L. M., López-Boado, Y. S., López-Otin, C., & Sawyer, L. (1995). Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Letters*, *366*(1), 53-56.
- Morell, P., Barrett, C. V., Mason, J. L., Toews, A. D., Hostettler, J. D., Knapp, G. W., & Matsushima, G. K. (1998). Gene Expression in Brain during Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *12*(4-5), 220-227.
- Moscarello, M. A., Wood, D. D., Ackerley, C., & Boulias, C. (1994). Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *The Journal of Clinical Investigation*, *94*(1), 146-154.
- Motl, R. W., Sandroff, B. M., Kwakkel, G., Dalgas, U., Feinstein, A., Heesen, C., Feys, P., & Thompson, A. J. (2017). Exercise in patients with multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, *16*(10), 848-856.
- Muffat, J., & Walker, D. W. (2010). Apolipoprotein D: An overview of its role in aging and age-related diseases. *Cell Cycle*, *9*(2), 269-273.
- Muffat, J., Walker, D. W., & Benzer, S. (2008). Human Apo D, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(19), 7088-7093.
- Muraro, P. A., Martin, R., Mancardi, G. L., Nicholas, R., Sormani, M. P., & Saccardi, R. (2017). Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, *13*(7), 391-405.

- Murray, T. J. (2009). The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. En *Journal of the Neurological Sciences* (Vol. 277, Número SUPPL. 1).
- Musse, A. A., Boggs, J. M., & Harauz, G. (2006). Deimination of membrane-bound myelin basic protein in multiple sclerosis exposes an immunodominant epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4422-4427.
- Naito, S., Namerow, N., Mickey, M. R., & Terasaki, P. I. (1972). Multiple Sclerosis: Association with HL—A3. *Tissue Antigens*, 2(1), 1-4.
- Najyb, O., Brissette, L., & Rassart, E. (2015). Apolipoprotein D internalization is a basigin-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 16077-16087.
- Najyb, O., Do Carmo, S., Alikashani, A., & Rassart, E. (2017). Apolipoprotein D Overexpression Protects Against Kainate-Induced Neurotoxicity in Mice. *Molecular Neurobiology*, 54, 3948-3963.
- Nash, R. A., Hutton, G. J., Racke, M. K., Popat, U., Devine, S. M., Steinmiller, K. C., Griffith, L. M., Muraro, P. A., Openshaw, H., Sayre, P. H., Stuve, O., Arnold, D. L., Wener, M. H., Georges, G. E., Wundes, A., Kraft, G. H., & Bowen, J. D. (2017). High-dose immunosuppressive therapy and autologous HCT for relapsing-remitting MS. *Neurology*, 88(9), 842-852.
- Nasreen, A., Vogt, M., Kim, H. J., Eichinger, A., & Skerra, A. (2006). Solubility engineering and crystallization of human apolipoprotein D. *Protein Science*, 15(1), 190-199.
- Navarro-Incio, A. M., & Tolivia-Fernández, J. (2004). Implicación de la apolipoproteína D en las patologías del sistema nervioso. *Revista de Neurología*, 38(12), 1166-1175.
- Navarro, A., Astudillo, A., Del Valle, E., Gonzalez del Rey, C., & Tolivia, J. (2001). Immunohistochemical Presence of Apolipoprotein D in Senile Plaques. *Journal of Histotechnology*, 24(1), 45-48.
- Navarro, A., Del Valle, E., Astudillo, A., Del Rey, C. G., & Tolivia, J. (2003). Immunohistochemical study of distribution of apolipoproteins E and D in human cerebral β amyloid deposits. *Experimental Neurology*, 184(2), 697-704.
- 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., & Tolivia, J. (2004). Differential expression of apolipoprotein D in human astroglial and oligodendroglial cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52, 1031-1036.

BIBLIOGRAFÍA

- Navarro, A., Rioseras, B., del Valle, E., Martínez-Pinilla, E., Astudillo, A., & Tolivia, J. (2018). Expression pattern of Myelin-Related Apolipoprotein D in human multiple sclerosis lesions. *Frontiers in Aging Neuroscience, 10*, 1-15.
- Number of people with MS / Atlas of MS.* (s. f.). Recuperado 17 de junio de 2023, de <https://www.atlasofms.org/>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry, 267*(17), 5421-5426.
- Oakley, A. J., Bhatia, S., Ecroyd, H., & Garner, B. (2012). Molecular Dynamics Analysis of Apolipoprotein-D-Lipid Hydroperoxide Interactions: Mechanism for Selective Oxidation of Met-93. *PLoS ONE, 7*(3), 1-9.
- Ong, W., He, Y., Suresh, S., & Patel, S. (1997). Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience, 79*, 359-367.
- Ong, W. Y., Lau, C. P., Leong, S. K., Kumar, U., Suresh, S., & Patel, S. C. (1999). Apolipoprotein d gene expression in the rat brain and light and electron microscopic immunocytochemistry of apolipoprotein D expression in the cerebellum of neonatal, immature and adult rats. *Neuroscience, 90*(3), 913-922.
- Ordoñez, C., Navarro, A., Perez, C., Astudillo, A., Martínez, E., & Tolivia, J. (2006). Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histology and Histopathology, 21*(4), 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. *Neurobiology of Aging, 33*(2), 11-20.
- Orrell, R. W. (2005). Multiple Sclerosis: The History of a Disease. *Journal of the Royal Society of Medicine, 98*(6), 289-289.
- Pajaniappan, M., Guber, N. K., Kennard, S., Liu, H., Zhao, N., & Lilly, B. (2011). Endothelial cells downregulate apolipoprotein D expression in mural cells through paracrine secretion and Notch signaling. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 301*(3), 784-793.
- Palumbo, S. (2017). Pathogenesis and Progression of Multiple Sclerosis: The Role of Arachidonic Acid-Mediated Neuroinflammation. En *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis* (pp. 111-124). Codon Publications.
- Palumbo, S., & Pellegrini, S. (2017). Experimental *In Vivo* Models of Multiple Sclerosis: State of the Art. En *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis* (pp. 173-183).

- Pascua-Maestro, R., Corraliza-Gomez, M., Fadrique-Rojo, C., Ledesma, M. D., Schuchman, E. H., Sanchez, D., & Ganfornina, M. D. (2020). Apolipoprotein D-mediated preservation of lysosomal function promotes cell survival and delays motor impairment in Niemann-Pick type A disease. *Neurobiology of Disease*, *144*(105046), 1-13.
- Pascua-Maestro, R., Diez-Hermano, S., Lillo, C., Ganfornina, M. D., & Sanchez, D. (2017). Protecting cells by protecting their vulnerable lysosomes: Identification of a new mechanism for preserving lysosomal functional integrity upon oxidative stress. *PLoS Genetics*, *13*(2), 1-33.
- Pascua-Maestro, R., González, E., Lillo, C., Ganfornina, M. D., Falcón-Pérez, J. M., & Sanchez, D. (2019). Extracellular vesicles secreted by astroglial cells transport apolipoprotein D to neurons and mediate neuronal survival upon oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(526), 1-13.
- Pasquini, L. A., Calatayud, C. A., Bertone Uña, A. L., Millet, V., Pasquini, J. M., & Soto, E. F. (2007). The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochemical Research*, *32*(2), 279-292.
- Patel, J., & Balabanov, R. (2012). Molecular Mechanisms of Oligodendrocyte Injury in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(8), 10647-10659.
- Patel, S. C., Asotra, K., Patel, Y. C., McConathy, W. J., Patel, R. C., & Suresh, S. (1995). Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *NeuroReport*, *6*(4), 653-657.
- Patergnani, S., Fossati, V., Bonora, M., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Rusielewicz, T., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2017). Mitochondria in Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms of Pathogenesis. En *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 328, pp. 49-103). Elsevier Inc.
- Patsopoulos, N. A., Barcellos, L. F., Hintzen, R. Q., Schaefer, C., van Duijn, C. M., Noble, J. A., Raj, T., Gourraud, P.-A. A., Stranger, B. E., Oksenberg, J., Olsson, T., Taylor, B. V., Sawcer, S., Hafler, D. A., Carrington, M., De Jager, P. L., de Bakker, P. I. W., Duijn, C. M. van, Noble, J. A., ... Bakker, P. I. W. de. (2013). Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. *PLoS Genetics*, *9*(11), 1-11.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*.
- Pelletier, D., & Hafler, D. A. (2012). Fingolimod for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, *366*(4), 339-347.
- Perdomo, G., Kim, D. H., Zhang, T., Qu, S., Thomas, E. A., Toledo, F. G. S., Slusher, S., Fan, Y., Kelley, D. E., & Dong, H. H. (2010). A role of apolipoprotein D in triglyceride metabolism. *Journal of Lipid Research*, *51*(6), 1298-1311.

- Piani, D., Frei, K., Do, K. Q., Cuénod, M., & Fontana, A. (1991). Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neuroscience Letters*, *133*(2), 159-162.
- Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M. A., & Sandrock, A. W. (2009). A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, *354*(9), 899-910.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, *69*(2), 292-302.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.-P., Kappos, L., Lublin, F. D., Metz, L. M., McFarland, H. F., O'Connor, P. W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Weinshenker, B. G., & Wolinsky, J. S. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology*, *58*(6), 840-846.
- Pong, A. C., Jugé, L., Bilston, L. E., & Cheng, S. (2017). Development of acute hydrocephalus does not change brain tissue mechanical properties in adult rats, but in juvenile rats. *PLoS ONE*, *12*(8), 1-15.
- Popescu, B. F. G., Pirko, I., & Lucchinetti, C. F. (2013). Pathology of multiple sclerosis: Where do we stand? *Continuum Lifelong Learning in Neurology*, *19*(4), 901-921.
- Post, G. R., & Dawson, G. (1992). Characterization of a cell line derived from a human oligodendroglioma. *Molecular and Chemical Neuropathology*, *16*(3), 303-317.
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *47*, 485-505.
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of Multiple Sclerosis. *European Journal of Pharmacology*, *759*, 182-191.
- Provost, P. R., Weech, P. K., Tremblay, N. M., Marcel, Y. L., & Rassart, E. (1990). Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *Journal of Lipid Research*, *31*(11), 2057-2065.
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G., & Arancio, O. (2014). Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: Practical considerations and guidelines. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 450-467.

- Radetz, A., Mladenova, K., Ciolac, D., Gonzalez-Escamilla, G., Fleischer, V., Ellwardt, E., Krämer, J., Bittner, S., Meuth, S. G., Muthuraman, M., & Groppa, S. (2021). Linking Microstructural Integrity and Motor Cortex Excitability in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, *12*, 1-11.
- Raivich, G., & Banati, R. (2004). Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Research Reviews*, *46*(3), 261-281.
- Ransohoff, R. M. (2012). Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nature Neuroscience*, *15*(8), 1074-1077.
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L., & Milne, R. (2000). Apolipoprotein D. *Gene*, *756*, 185-198.
- Rassart, E., Desmarais, F., Najyb, O., Bergeron, K. F., & Mounier, C. (2020). Apolipoprotein D. *Gene*, *756*(144874), 1-11.
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, *378*(2), 169-180.
- Reindl, M., Knipping, G., Wicher, I., Dilitz, E., Egg, R., Deisenhammer, F., & Berger, T. (2001). Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *119*(2), 327-332.
- Remington, L. T., Babcock, A. A., Zehntner, S. P., & Owens, T. (2007). Microglial Recruitment, Activation, and Proliferation in Response to Primary Demyelination. *The American Journal of Pathology*, *170*(5), 1713-1724.
- Rhodes, K. E., Raivich, G., & Fawcett, J. W. (2006). The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience*, *140*(1), 87-100.
- Rickhag, M., Deierborg, T., Patel, S., Ruscher, K., & Wieloch, T. (2008). Apolipoprotein D is elevated in oligodendrocytes in the peri-infarct region after experimental stroke: Influence of enriched environment. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *28*(3), 551-562.
- Rioux, D. J., & Prosser, D. C. (2023). A CIE change in our understanding of endocytic mechanisms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1-7.
- Rivers, T. M., & Schwentker, F. F. (1935). Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *Journal of Experimental Medicine*, *61*(5), 689-702.

- Robinson, W. H., & Steinman, L. (2022). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science*, *375*(6578), 264-265.
- Rossi, S., Furlan, R., De Chiara, V., Motta, C., Studer, V., Mori, F., Musella, A., Bergami, A., Muzio, L., Bernardi, G., Battistini, L., Martino, G., & Centonze, D. (2012). Interleukin-1 β causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, *71*(1), 76-83.
- Ruiz, M., Ganfornina, M. D., Correnti, C., Strong, R. K., & Sanchez, D. (2014). Ligand binding-dependent functions of the lipocalin NLaz: An in vivo study in *Drosophila*. *FASEB Journal*, *28*(4), 1555-1567.
- Ruiz, M., Sanchez, D., Correnti, C., Strong, R. K., & Ganfornina, M. D. (2013). Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: Functional implications for cell differentiation. *FEBS Journal*, *280*, 3928-3943.
- Ruiz, M., Wicker-Thomas, C., Sanchez, D., & Ganfornina, M. D. (2012). Grasshopper Lazarillo, a GPI-anchored Lipocalin, increases *Drosophila* longevity and stress resistance, and functionally replaces its secreted homolog NLaz. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(10), 776-789.
- Sanabria-Castro, A., Flores-Díaz, M., & Alape-Girón, A. (2020). Biological models in multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, *98*(3), 491-508.
- Sanadgol, N., Golab, F., Tashakkor, Z., Taki, N., Kouchi, S. M., Mostafaie, A., Mehdizadeh, M., Abdollahi, M., Taghizadeh, G., & Sharifzadeh, M. (2017). Neuroprotective effects of ellagic acid on cuprizone-induced acute demyelination through limitation of microgliosis, adjustment of CXCL12/IL-17/IL-11 axis and restriction of mature oligodendrocytes apoptosis. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 1679-1687.
- Sanchez, D., Bajo-Grañeras, R., Del Caño-Espinel, M., Garcia-Centeno, R., Garcia-Mateo, N., Pascua-Maestro, R., & Ganfornina, M. D. (2015). Aging without Apolipoprotein D: Molecular and cellular modifications in the hippocampus and cortex. *Experimental Gerontology*, *67*, 19-47.
- Sanchez, D., & Ganfornina, M. D. (2021). The Lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. *Frontiers in Physiology*, *12*, 1-36.
- Sánchez, D., Ganfornina, M. D., & Martínez, S. (2002). Expression pattern of the lipocalin Apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, *110*, 225-229.
- Sanchez, D., López-Arias, B., Torroja, L., Canal, I., Wang, X., Bastiani, M. J., & Ganfornina, M. D. (2006). Loss of Glial Lazarillo, a Homolog of Apolipoprotein D, Reduces Lifespan and Stress Resistance in *Drosophila*. *Current Biology*, *16*(7), 680-686.

- Sarantseva, S., Timoshenko, S., Bolshakova, O., Karaseva, E., Rodin, D., Schwarzman, A. L., & Vitek, M. P. (2009). Apolipoprotein E-Mimetics Inhibit Neurodegeneration and Restore Cognitive Functions in a Transgenic *Drosophila* Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *4*(12), 1-11.
- Sarjeant, J. M., Lawrie, A., Kinnear, C., Yablonsky, S., Leung, W., Massaelli, H., Prichett, W., Veinot, J. P., Rassart, E., & Rabinovitch, M. (2003). Apolipoprotein D Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-BB-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferated by Preventing Translocation of Phosphorylated Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2 to the Nucleus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *23*(12), 2172-2177.
- Schiess, N., & Calabresi, P. A. (2016). Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*, *36*(4), 350-356.
- Selvaraju, R., Bernasconi, L., Losberger, C., Graber, P., Kadi, L., Avellana-Adalid, V., Picard-Riera, N., Van Evercooren, A. B., Cirillo, R., Kosco-Vilbois, M., Feger, G., Papoian, R., & Boschert, U. (2004). Osteopontin is upregulated during in vivo demyelination and remyelination and enhances myelin formation in vitro. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *25*(4), 707-721.
- Sen, M. K., Almuslehi, M. S. M., Coorssen, J. R., Mahns, D. A., & Shortland, P. J. (2020). Behavioural and histological changes in cuprizone-fed mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *87*, 508-523.
- Sen, M. K., Mahns, D. A., Coorssen, J. R., & Shortland, P. J. (2019). Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *107*, 23-46.
- Sen, M. K., Mahns, D. A., Coorssen, J. R., & Shortland, P. J. (2022). The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis. *Glia*, *70*(7), 1215-1250.
- Serra-de-Oliveira, N., Boilesen, S. N., Prado de França Carvalho, C., LeSueur-Maluf, L., Zollner, R. de L., Spadari, R. C., Medalha, C. C., & Monteiro de Castro, G. (2015). Behavioural changes observed in demyelination model shares similarities with white matter abnormalities in humans. *Behavioural Brain Research*, *287*, 265-275.
- Simard, J., Dauvois, S., Haagensen, D. E., Levesque, C., Merand, Y., & Labrie, F. (1990). Regulation of Progesterone-Binding Breast Cyst Protein GCDP-24 Secretion by Estrogens and Androgens in Human Breast Cancer Cells: A New Marker of Steroid Action in Breast Cancer. *Endocrinology*, *126*(6), 3223-3231.
- 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 Research*, *51*(16), 4336-4341.
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, *36*(1), 1-12.

- Skripuletz, T., Gudi, V., Hackstette, D., & Stangel, M. (2011). De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: The old, the new, and the unexpected. *Histology and Histopathology*, *26*(12), 1585-1597.
- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C., & Stangel, M. (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *American Journal of Pathology*, *172*(4), 1053-1061.
- 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. *Journal of Lipid Research*, *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 fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO Journal*, *9*(8), 2479-2484.
- Stangel, M., & Hartung, H.-P. (2002). Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology*, *68*(5), 361-376.
- Steelman, A. J., Thompson, J. P., & Li, J. (2012). Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neuroscience Research*, *72*(1), 32-42.
- Steiner, J., Martins-de-Souza, D., Schiltz, K., Sarnyai, Z., Westphal, S., Isermann, B., Dobrowolny, H., Turck, C. W., Bogerts, B., Bernstein, H. G., Horvath, T. L., Schild, L., & Keilhoff, G. (2014). Clozapine promotes glycolysis and myelin lipid synthesis in cultured oligodendrocytes. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*(384), 1-11.
- Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, *32*, 22-37.
- Stoop, M. P., Singh, V., Dekker, L. J., Titulaer, M. K., Stingl, C., Burgers, P. C., Sillevius Smitt, P. A. E., Hintzen, R. Q., & Luiders, T. M. (2010). Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *PLoS ONE*, *5*(8), 1-8.
- Stys, P. K., Zamponi, G. W., Van Minnen, J., & Geurts, J. J. G. (2012). Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(8), 507-514.
- Sun, A. Y., Wang, Q., Simonyi, A., & Sun, G. Y. (2010). Resveratrol as a Therapeutic Agent for Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *41*(2-3), 383.
- Suzuki, K. (1969). Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone. *Science*, *163*(3862), 81-82.

- SWISS-MODEL Interactive Workspace*. (s. f.). Recuperado 30 de septiembre de 2023, de <https://swissmodel.expasy.org/interactive>
- Taraboletti, A., Walker, T. L., Avila, R., Huang, H., Caporoso, J., Manandhar, E., Leeper, T. C., Modarelli, D. A., Medicetty, S., & Shriver, L. P. (2017). Cuprizone Intoxication Induces Cell Intrinsic Alterations in Oligodendrocyte Metabolism Independent of Copper Chelation. *Biochemistry*, *56*(10), 1-51.
- Taylor, L. C., Gilmore, W., Ting, J. P. Y., & Matsushima, G. K. (2010). Cuprizone induces similar demyelination in male and female C57BL/6 mice and results in disruption of the estrous cycle. *Journal of neuroscience research*, *88*(2), 391-402.
- Templeton, N., Kivell, B., McCaughey-Chapman, A., Connor, B., & La Flamme, A. C. (2019). Clozapine administration enhanced functional recovery after cuprizone demyelination. *PLoS ONE*, *14*(5), 1-13.
- Teniente-Serra, A., Ramo-Tello, C., & Martinez-Caceres, E. M. (2017). Immunomonitoring Lymphocyte Subpopulations in Multiple Sclerosis Patients. En *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis* (pp. 139-154). Codon Publications.
- Terrisse, L., Séguin, D., Bertrand, P., Poirier, J., Milne, R., & Rassart, E. (1999). Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Molecular Brain Research*, *70*(1), 26-35.
- Thomas, E. A., George, R. C., Danielson, P. E., Nelson, P. A., Warren, A. J., Lo, D., & Sutcliffe, J. G. (2003a). Antipsychotic drug treatment alters expression of mRNAs encoding lipid metabolism-related proteins. *Molecular Psychiatry*, *8*(12), 983-993.
- Thomas, Elizabeth A., Danielson, P. E., Nelson, P. A., Pribyl, T. M., Hilbush, B. S., Hasel, K. W., & Sutcliffe, J. G. (2001a). Clozapine increases apolipoprotein D expression in rodent brain: towards a mechanism for neuroleptic pharmacotherapy. *Journal of Neurochemistry*, *76*(3), 789-796.
- Thomas, Elizabeth A., George, R. C., & Sutcliffe, J. G. (2003b). Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: Implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *69*(6), 421-427.
- Thomas, Elizabeth A., & Yao, J. K. (2007). Clozapine specifically alters the arachidonic acid pathway in mice lacking apolipoprotein D. *Schizophrenia Research*, *89*, 147-153.
- Thomas, Elizabeth A, Dean, B., Pavey, G., & Sutcliffe, J. G. (2001b). Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: Implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(7), 4066-4071.

- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., ... Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*, *17*(2), 173.
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *The Lancet*, *391*(10130), 1622-1636.
- Titus, H. E., Chen, Y., Podojil, J. R., Robinson, A. P., Balabanov, R., Popko, B., & Miller, S. D. (2020). Pre-clinical and Clinical Implications of «Inside-Out» vs. «Outside-In» Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 1-16.
- Tolivia, J., Navarro, A., del Valle, E., Perez, C., Ordoñez, C., & Martínez, E. (2006). Application of Photoshop and Scion Image analysis to quantification of signals in histochemistry, immunocytochemistry and hybridocytochemistry. *Analytical and quantitative cytology and histology*, *28*, 43-53.
- Torkildsen, Ø., Myhr, K.-M., & Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta neurologica Scandinavica*, *117*(188), 72-76.
- Torre-Fuentes, L., Moreno-Jiménez, L., Pytel, V., Matías-Guiu, J. A., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2020). Modelos experimentales de desmielinización-remielinización. *Neurología*, *35*(1), 32-39.
- Tourbah, A., Lebrun-Frenay, C., Edan, G., Clanet, M., Papeix, C., Vukusic, S., De Sèze, J., Debouverie, M., Gout, O., Clavelou, P., Defer, G., Laplaud, D. A., Moreau, T., Labauge, P., Brochet, B., Sedel, F., & Pelletier, J. (2016). MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Multiple Sclerosis Journal*, *22*(13), 1719-1731.
- Traka, M., Podojil, J. R., McCarthy, D. P., Miller, S. D., & Popko, B. (2016). Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 65-74.
- Tsukamoto, K., Mani, D. R., Shi, J., Zhang, S., Haagensen, D. E., Otsuka, F., Guan, J., Smith, J. D., Weng, W., Liao, R., Kolodgie, F. D., Virmani, R., & Krieger, M. (2013). Identification of apolipoprotein D as a cardioprotective gene using a mouse model of lethal atherosclerotic coronary artery disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(42), 17023-17028.
- Uzarski, J. S., DiVito, M. D., Wertheim, J. A., & Miller, W. M. (2017). Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, *129*, 163-175.

- Valeiras, B., Rosato Siri, M. V., Codagnone, M., Reinés, A., & Pasquini, J. M. (2014). Gender influence on schizophrenia-relevant abnormalities in a cuprizone demyelination model. *Glia*, *62*(10), 1629-1644.
- van der Star, B. J., Vogel, D. Y. S., Kipp, M., Puentes, F., Baker, D., & Amor, S. (2012). In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *11*(5), 570-588.
- Vanderlugt, C. L., & Miller, S. D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: Implications for immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, *2*(2), 85-95.
- Vargas, D. L., & Tyor, W. R. (2017). Update on Disease-Modifying Therapies for Multiple Sclerosis. *Journal of Investigative Medicine*, *65*(5), 883-891.
- Vega-Riquer, J. M., Mendez-Victoriano, G., Morales-Luckie, R. A., & Gonzalez-Perez, O. (2019). Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Current Neuropharmacology*, *17*(2), 129-141.
- Venturini, G. (1973). Enzymic Activities And Sodium, Potassium And Copper Concentrations In Mouse Brain And Liver After Cuprizone Treatment In Vivo. *Journal of Neurochemistry*, *21*(5), 1147-1151.
- Vogt, M., & Skerra, A. (2001). Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *Journal of Molecular Recognition*, *14*(1), 79-86.
- Waldner, A., Dassati, S., Redl, B., Smania, N., & Gandolfi, M. (2018). Apolipoprotein D Concentration in Human Plasma during Aging and in Parkinson's Disease: A Cross-Sectional Study. *Parkinson's Disease*, *2018*, 1-7.
- Walker, D. W., Muffat, J., Rundel, C., & Benzer, S. (2006). Overexpression of a *Drosophila* Homolog of Apolipoprotein D Leads to Increased Stress Resistance and Extended Lifespan. *Current Biology*, *16*(7), 674-679.
- Wang, H., Durham, L., Dawson, H., Song, P., Warner, D. S., Sullivan, P. M., Vitek, M. P., & Laskowitz, D. T. (2007). An apolipoprotein E-based therapeutic improves outcome and reduces Alzheimer's disease pathology following closed head injury: Evidence of pharmacogenomic interaction. *Neuroscience*, *144*(4), 1324-1333.
- Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochedlinger, K., Windrem, M., & Goldman, S. A. (2013). Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitors can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*, *12*(2), 252-264.
- Weech, P. K., Provost, P., Tremblay, N. M., Camato, R. N., Milne, R. W., Marcel, Y. L., & Rassart, E. (1991). Apolipoprotein D-An atypical apolipoprotein. *Progress in Lipid Research*, *30*(2-3), 259-266.
- Witherick, J., Wilkins, A., Scolding, N., & Kemp, K. (2011). Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Diseases*, *1*(1), 1-11.

- Wood, D. D., Bilbao, J. M., O'Connors, P., & Moscarello, M. A. (1996). Acute multiple sclerosis (marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Annals of Neurology*, *40*(1), 18-24.
- Woodruff, R. H., & Franklin, R. J. M. (1999). Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. *GLIA*, *25*(3), 216-228.
- Xiao, Lin, Guo, D., Hu, C., Shen, W., Shan, L., Li, C., Liu, X., Yang, W., Zhang, W., & He, C. (2012). Diosgenin promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation through estrogen receptor-mediated ERK1/2 activation to accelerate remyelination. *Glia*, *60*(7), 1037-1052.
- Xiao, L., Xu, H., Zhang, Y., Wei, Z., He, J., Jiang, W., Li, X., Dyck, L. E., Devon, R. M., Deng, Y., & Li, X. M. (2008). Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes. *Molecular Psychiatry*, *13*(7), 697-708.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(10), 1-11.
- Xu, H. B., Zhang, R. F., Luo, D., Zhou, Y., Wang, Y., Fang, L., Li, W. J., Mu, J., Zhang, L., Zhang, Y., & Xie, P. (2012). Comparative proteomic analysis of plasma from major depressive patients: identification of proteins associated with lipid metabolism and immunoregulation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(10), 1413-1425.
- Xu, H., Yang, H.-J., & Li, X.-M. (2013a). Differential effects of antipsychotics on the development of rat oligodendrocyte precursor cells exposed to cuprizone. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *264*, 121-129.
- Xu, H., Yang, H.-J., Zhang, Y., Clough, R., Browning, R., & Li, X.-M. (2009). Behavioral and Neurobiological Changes in C57BL/6 Mice Exposed to Cuprizone. *Behavioral Neuroscience*, *123*(2), 418-429.
- Xu, H., Yang, H. J., McConomy, B., Browning, R., & Li, X. M. (2010). Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mouse exposed to cuprizone: effects of antipsychotics. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*(8), 1-10.
- Xu, W., Barrientos, T., & Andrews, N. C. (2013b). Iron and Copper in Mitochondrial Diseases. *Cell Metabolism*, *17*(3), 319-328.
- Yadav, S. K., Mindur, J. E., Ito, K., & Dhib-Jalbut, S. (2015). Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, *28*(3), 206-219.

- Yamamoto, S., Yamashina, K., Ishikawa, M., Gotoh, M., Yagishita, S., Iwasa, K., Maruyama, K., Murakami-Murofushi, K., & Yoshikawa, K. (2017). Protective and therapeutic role of 2-carba-cyclic phosphatidic acid in demyelinating disease. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(142), 1-14.
- Yamout, B. I., & Alroughani, R. (2018). Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*, *38*(2), 212-225.
- Yang, C. L., Kurczab, T., Down, G., Kealey, T., & Langlands, K. (2005). Gene expression profiling of the ageing rat vibrissa follicle. *British Journal of Dermatology*, *153*(1), 22-28.
- Yang, C. Y., Zi-Wei, G., Blanco-Vaca, F., Gaskell, S. J., Yang, M., Massey, J. B., Gotto, A. M., & Pownall, H. J. (1994). Structure of Human Apolipoprotein D: Locations of the Intermolecular and Intramolecular Disulfide Links. *Biochemistry*, *33*(41), 12451-12455.
- Yao, J. K., Thomas, E. A., Reddy, R. D., & Keshavan, M. S. (2005). Association of plasma apolipoproteins D with RBC membrane arachidonic acid levels in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *72*, 259-266.
- Young, A. H., & Juruena, M. F. (2021). The Neurobiology of Bipolar Disorder. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *48*, 1-20.
- Yu, H., Wu, M., Lu, G., Cao, T., Chen, N., Zhang, Y., Jiang, Z., Fan, H., & Yao, R. (2018). Prednisone alleviates demyelination through regulation of the NLRP3 inflammasome in a C57BL/6 mouse model of cuprizone-induced demyelination. *Brain Research*, *1678*, 75-84.
- Yu, R. H., Zhang, X. Y., Xu, W., Li, Z. K., & Zhu, X. D. (2020). Apolipoprotein D alleviates glucocorticoid-induced osteogenesis suppression in bone marrow mesenchymal stem cells via the PI3K/Akt pathway. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *15*(1), 1-8.
- Zatta, P., Raso, M., Zambenedetti, P., Wittkowski, W., Messori, L., Piccioli, F., Mauri, P. L., & Beltramini, M. (2005). Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. *Cellular and molecular life sciences*, *62*(13), 1502-1513.
- Zendedel, A., Beyer, C., & Kipp, M. (2013). Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection. *Journal of Molecular Neuroscience*, *51*(2), 567-572.
- Zhan, J., Mann, T., Joost, S., Behrangi, N., Frank, M., & Kipp, M. (2020). The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells*, *9*(843), 1-21.
- Zhang, Yanli, Cai, L., Fan, K., Fan, B., Li, N., Gao, W., Yang, X., & Ma, J. (2019). The Spatial and Temporal Characters of Demyelination and Remyelination in the Cuprizone Animal Model. *The Anatomical Record*, *302*(11), 2020-2029.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, Yu, Cong, Y., Wang, S., & Zhang, S. (2011). Antioxidant activities of recombinant amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) apolipoprotein D. *Molecular Biology Reports*, *38*(3), 1847-1851.
- Zindler, E., & Zipp, F. (2010). Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, *24*(4), 551-562.
- Zirngibl, M., Assinck, P., Sizov, A., Caprariello, A. V., & Plemel, J. R. (2022). Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. *Molecular Neurodegeneration*, *17*(34), 1-28.

Publicaciones

Article

Cuprizone-Induced Neurotoxicity in Human Neural Cell Lines Is Mediated by a Reversible Mitochondrial Dysfunction: Relevance for Demyelination Models

Eva Martínez-Pinilla ^{1,2,3}, Núria Rubio-Sardón ¹, Sandra Villar-Conde ¹, Gemma Navarro ^{4,5},
Eva del Valle ^{1,2,3}, Jorge Tolivia ^{1,2,3,*}, Rafael Franco ^{5,6,*,†} and Ana Navarro ^{1,2,3,†}

- ¹ Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain; martinezpinillaeva@gmail.com (E.M.-P.); nuria199510@hotmail.com (N.R.-S.); sandravillarconde@gmail.com (S.V.-C.); valleeva@uniovi.es (E.d.V.); anavarro@uniovi.es (A.N.)
- ² Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), 33003 Oviedo, Spain
- ³ Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Spain
- ⁴ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, 02028 Barcelona, Spain; g.navarro@ub.edu
- ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), Instituto de Salud Carlos III, 28031 Madrid, Spain
- ⁶ Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, School of Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
- * Correspondence: jtologia@uniovi.es (J.T.); rfranco@ub.edu (R.F.)
- † Both authors contributed equally to this work.



Citation: Martínez-Pinilla, E.; Rubio-Sardón, N.; Villar-Conde, S.; Navarro, G.; del Valle, E.; Tolivia, J.; Franco, R.; Navarro, A. Cuprizone-Induced Neurotoxicity in Human Neural Cell Lines Is Mediated by a Reversible Mitochondrial Dysfunction: Relevance for Demyelination Models. *Brain Sci.* **2021**, *11*, 272. <https://doi.org/10.3390/brainsci11020272>

Academic Editor: Marieta B. Heaton

Received: 22 January 2021

Accepted: 17 February 2021

Published: 22 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Suitable in vivo and in vitro models are instrumental for the development of new drugs aimed at improving symptoms or progression of multiple sclerosis (MS). The cuprizone (CPZ)-induced murine model has gained momentum in recent decades, aiming to address the demyelination component of the disease. This work aims at assessing the differential cytotoxicity of CPZ in cells of different types and from different species: human oligodendroglial (HOG), human neuroblastoma (SH-SY5Y), human glioblastoma (T-98), and mouse microglial (N-9) cell lines. Moreover, the effect of CPZ was investigated in primary rat brain cells. Cell viability was assayed by oxygen rate consumption and by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-based (MTT) method. Our results demonstrated that CPZ did not cause death in any of the assayed cell models but affected mitochondrial function and aerobic cell respiration, thus compromising cell metabolism in neural cells and neuron-glia co-cultures. In this sense, we found differential vulnerability between glial cells and neurons as is the case of the CPZ-induced mouse model of MS. In addition, our findings demonstrated that reduced viability was spontaneously reverted in a time-dependent manner by treatment discontinuation. This reversible cell-based model may help to further investigate the role of mitochondria in the disease, and study the molecular intricacies underlying the pathophysiology of the MS and other demyelinating diseases.

Keywords: neurodegenerative diseases; copper chelator; pathophysiology; cell metabolism; glia

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative, demyelinating, and inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that affects more than 2 million people worldwide, with a prevalence two to three times higher in women than in men [1]. This disabling pathology is characterized by the progressive focal loss of oligodendrocytes (OLG) and myelin membranes around axons, which compromises axonal transport and signal transduction, ultimately leading to progressive worsening of symptoms (reviewed in [2,3]). The clinical manifestations appear in multiple fully or partially reversible episodes, and four basic disease courses have been defined and termed as clinically isolated syndrome

(CIS), relapsing remitting MS (RRMS), secondary progressive MS (SPMS), and primary progressive MS (PPMS) [4,5]. A myriad of treatments is currently in use in an attempt to alleviate symptoms or slow down MS progression [4,6–10]. Although some are promising in early stages of disease, their long-term effects remain uncertain [4,5,11–15].

The convergence of genetic inheritance, hormonal changes, and environmental factors has long been suspected in determining the risk of developing MS. Despite research efforts in the last years, the mechanisms underlying the MS pathophysiology are still unclear [16]. It seems that neurodegenerative processes driven by inflammation-like events appear at some point in the course of the disease. However, the so-called “inside-out” model of MS pathogenesis is gaining momentum in recent years [17–19]. Now, the debate focuses on the exact contribution of each of the mechanisms contributing to axonal damage, which are not mutually exclusive. Obviously, the advance in understanding cellular and molecular pathogenic mechanisms of MS is key to develop effective therapies. In total, three are the main animal models of MS that partially and complementary mimic the different features of human MS: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the Theiler’s murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection-based model, and the toxin-induced models of demyelination using either cuprizone (CPZ) or lysolecithin [20–22]. The autoimmune models are extensively used in the development of new therapies for MS, however, when it comes to further studying myelination processes the CPZ-induced demyelination constitutes the best experimental approach [23–25].

CPZ, bis-cyclohexanone oxaldihydrazone, is a copper chelator that impacts on the activity of Cu^{2+} dependent metalloenzymes such as monoamine oxidase, cytochrome oxidase or $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -superoxide dismutase. Diverse altered processes, resulting from enzyme inhibition, compromise energy metabolism and increase oxidative stress [25]. In the many studies performed with rodents fed with CPZ, acute OLG degeneration and myelin sheath disruption was followed by spontaneous remyelination after ceasing the CPZ treatment [22,26]. Nevertheless, it has been shown that the exogenous addition of Cu^{2+} does not reduce the CPZ-induced toxicity thus indicating that it is not only acting as ion chelator and other mechanisms may be sought [27,28]. A major question regarding the use of CPZ is the molecular mechanism of action by which the toxic induces OLG death and causes the pathology. To provide reliable answers requires the development of simpler models, and for this purpose cell lines are instrumental.

This work evaluates the cytotoxicity of CPZ in cell lines and highlights mitochondria as a key factor in the neurodegeneration associated with MS. The study includes both cell lines and primary cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines

HOG cell line, established from a surgically removed human oligodendroglioma by Dr. A. T. Campagnoni (University of California, UCLA, Berkeley, CA, USA) [29] was kindly provided by Dr. J. A. López-Guerrero (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain) [30]. Cells were grown in Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM), low glucose, pyruvate, HEPES (22320-022, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 100 units/mL penicillin and streptomycin (17-602E, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 10% (*v/v*) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (10270-106, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was obtained from Sigma (94030304, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and was grown in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (61965-059, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 100 units/mL penicillin and streptomycin (17-602E, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 1% nonessential amino acids (11140-035, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 10% (*v/v*) heat inactivated FBS (10270-106, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Human glioblastoma T-98 cell line (ATCC) was grown in Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 100 units/mL penicillin and streptomycin (17-602E,

Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 10% (*v/v*) heat inactivated FBS (10270-106, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Finally, mouse microglial N-9 cells (ATCC) were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium containing 100 units/mL penicillin and streptomycin (17-602E, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 10% (*v/v*) heat inactivated FBS (10270-106, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and were passaged when they were 80–90% confluent, i.e., approximately twice a week for no more than 20 passages. The experiments were always done with cells from passages 3–15.

2.2. Co-Cultures

HOG and SH-SY5Y cells were co-cultured in a 2:1.5 proportion, respectively, in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (61965-059, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 100 units/mL penicillin and streptomycin (17-602E, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 1% nonessential amino acids (11140-035, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 10% (*v/v*) heat inactivated FBS (10270-106, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). The mixed culture was grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for at least 48 h before the treatments.

2.3. Primary Cultures of Neurons

Cortical neurons were prepared from Sprague–Dawley embryos. Neurons were isolated as described in [31] and plated at 40,000 cells/0.32 cm² confluence. Cortical cells were grown for 12 days in Neurobasal medium (NB) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and streptomycin, and 2% (*v/v*) B27 supplement (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) in a 6-well plate. Animal handling was conducted at all times in accordance with the European Council Directive 2010/63/UE, as well as in keeping with current Spanish legislation (RD53/2013). The experimental design was reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Testing of the University of Barcelona.

2.4. Cell Treatments

Cell treatments were performed using 3,000–5,000 cells per well in 96-well plates for MTT reduction assay (MTT is a water-soluble tetrazolium reagent in REDOX reactions involving mitochondrial components), 40,000 cells per well in 96-well plates for oxygen consumption assay (OCR), and 30,000 cells per well in 6-well chambered for Trypan blue exclusion assay (an azo blue dye that selectively colors death cells).

For experiments, a stock solution of 30 mM CPZ (C9012-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared freshly. For this, CPZ powder was dissolved in 50% ethanol/medium shaking at 225 rpm at 60 °C for 15–20 min until its complete dissolution. Working solutions were prepared by diluting the stock in the specific medium for each cell type. After 24–48 h of plating (30–40% cell confluence), cellular toxicity was induced by the addition of CPZ in growing concentrations (0.05–1 mM; see corresponding figure legends), for 24, 48, or 72 h. The CPZ concentrations and times of treatments used in these experiments were based on the bibliography [32,33].

2.5. Oxygen Consumption Rate (OCR) Assay

Oxygen consumption was monitored in oxygen-sensing microplates (Oxoprobics Biosciences S. L., Madrid, Spain) as described in [34]. The probe is quenched in the presence of oxygen; as oxygen is consumed by cellular respiration, the fluorescence signal increases being directly related to cell metabolism [35]. Briefly, cells were seeded in oxygen-sensing plates and incubated for 24 h (40–50% cell confluence), the different treatments were added to the cells at the indicated final concentrations, and the wells were sealed from ambient oxygen by the addition of 100 µL/well of mineral oil. Plates were placed in a plate reader (Envision, Perkin–Elmer, Waltham, MA, USA) previously equilibrated at

37 °C and monitored using 340/665 nm excitation/emission filters, with a delay time of 70 µs for 24–48 h.

2.6. MTT Reduction Assay

Cell viability was studied by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay, a method based on the activity of mitochondrial NADH-dependent oxidoreductases as indicator of the functional state of mitochondria, as described in [34]. After 24–48 h of plating (30–40% cell confluence) and once treatments were completed, 10 µL of MTT (5 mg/mL in phosphate buffered saline (PBS)) (5655, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to each well. Then, four hours later, 100 µL of lysis solution (20% sodium dodecyl sulfate (SDS); 50% dimethylformamide; pH 4) were added to the culture and incubated overnight at 37 °C. Absorbance at 570 nm was measured using a Multiskan EX Microplate Reader (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Values from blank dishes, containing only medium, were subtracted from the values of the samples. Cell viability, absorbance at 570 nm, was expressed as the percentage of the controls.

2.7. Trypan Blue Exclusion Assay

The trypan blue exclusion test was used to determine the number of dead cells present in a cell suspension by an azo dye that only enters cells with altered membranes. After 24–48 h of plating (30–40% cell confluence) and once treatments were completed, cells were harvested by trypsinization, washed in ice-cold PBS, collected by centrifugation at $200\times g$ for 5 min, and examined by adding an equivalent volume of a 0.4% trypan blue solution. The number of live cells (unstained) and dead cells (blue) was counted in a Neubauer chamber (Laboroptik, Arganda del Rey, Madrid, Spain) under light microscopy, and the percentage of viable cells was calculated as described in [36]. In total, four samples were included in each experimental group and each sample was counted at least three times.

2.8. Microscopy Observation

Cell cultures were observed using an inverted and phase contrast Nikon Eclipse TS 100 microscope (Nikon, Minato, Tokyo, Japan) and images were recorded by a digital Nikon DS-Fi1 camera (Nikon, Minato, Tokyo, Japan).

2.9. Data Analysis

Data result from at least five independent experiments (3–6 replicates). The data in the graphs are presented as the mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed with SPSS[®] 18.0 software (IBM, Armonk, NY, USA). The test of Kolmogorov–Smirnov with the correction of Lilliefors was used to evaluate the fit of the data to a normal distribution and the test of Levene to evaluate the homogeneity of variance. Significance was analyzed by one- or two-way ANOVA test followed by *post-hoc* Tukey's test for multiple comparisons as described in [34]. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cuprizone Decreases Cell Growth but Does Not Cause Death in HOG Cells

We first investigated the cytotoxic effect of CPZ in the human oligodendroglioma HOG cell line using human neuroblastoma SH-SY5Y cells as control. Cell viability was approached by the MTT reduction assay, which is mainly based on reduced activity of mitochondrial enzymes and electron carriers, i.e., is not, as often considered, a marker for cell death but of altered energy production. We will use the term cell viability as synonym of cell having shortage of energy production that if sustained would lead to death. As shown in Figure 1a–d, CPZ induced a significant loss of signal which was concentration-dependent manner in both SH-SY5Y and HOG cells and at either 24 or 48 h of treatment. Data analysis revealed a statistically significant decrease of about 65–70% in cell viability upon 24 h of treatment with 1 mM CPZ. In cells treated for 48 h the extent of toxicity was

similar. Importantly, the two cell lines were differentially affected by CPZ, being the OLGs more sensitive to lower concentrations of the toxic than neurons. In fact, HOG cells were significantly affected by 0.1–0.5 mM doses of CPZ, while SH-SY5Y cells were more resistant and higher concentrations (0.5–1.5 mM) were needed to achieve similar effects (Figure 1).

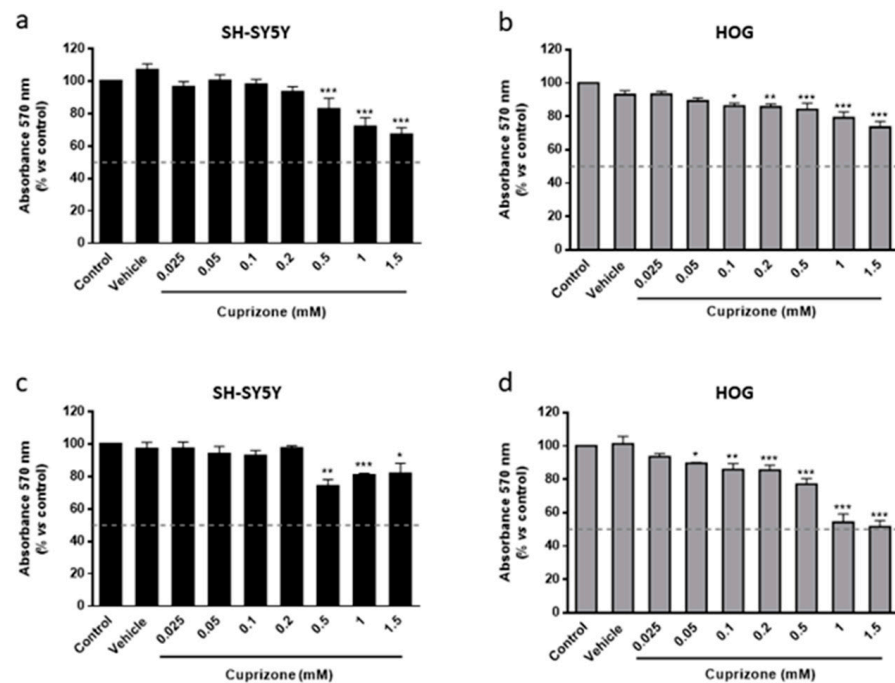


Figure 1. MTT reduction assay in SH-SY5Y (a,c) and HOG (b,d) cells treated with increasing concentrations of CPZ (0.025–1.5 mM) for 24 (a,b) and 48 h (c,d). Cell damage is represented as the percentage of MTT reduction *versus* control. Data are the mean \pm S.E.M of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by *post-hoc* Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control.

To assess whether CPZ-induced decrease in cell viability correlates with an increase in cell death, a trypan blue exclusion test was performed. We found that CPZ, at all tested concentrations (0.1–1.5 mM), did not cause death in either SH-SY5Y or HOG cell lines after 24 and 48 h of treatment (Figure 2a–d).

3.2. The Toxic Effect on HOG and SH-SY5Y Cells Is Both Mediated by Mitochondria and Reverted Once the CPZ Treatment Is Interrupted

As indicated in the introduction section, CPZ-administered mice show a spontaneous remyelination when the treatment is stopped. To better understand the molecular mechanisms underlying this fact, HOG and SH-SY5Y cells were analyzed after a first treatment with CPZ (0.2–1.5 mM) for 24 h followed by growth in fresh medium (recovery period). Results demonstrated the reversion of the toxic effect (60–65%) in both cell lines (Figure 3). It should be noted that oligodendrogloma cells which are more sensitive to CPZ (see above) showed better recovery at longer (48 h) times (Figure 3c,d). Our findings suggest that CPZ affects cell metabolism but that cells recover once the treatment is discontinued.

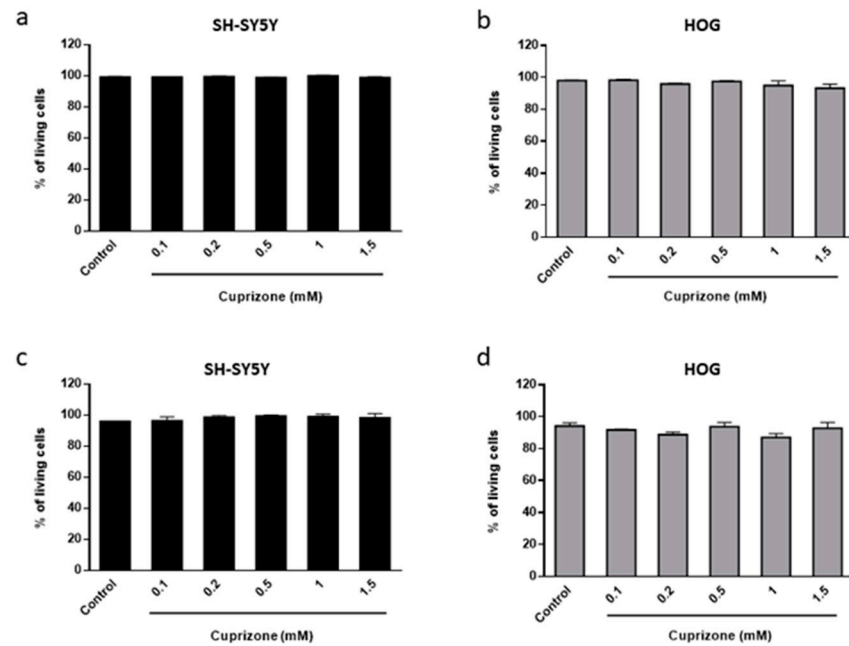


Figure 2. The number of SH-SY5Y (a,c) and HOG (b,d) living cells was calculated after 24 (a,b) and 48 h (c,d) of culture with increasing concentrations of CPZ (0.1–1.5 mM). Cell viability is represented as the percentage of living cells *versus* control. Data are the mean \pm S.E.M of three independent experiments. Each experimental group was run in triplicate, and each plate was counted at least three times.

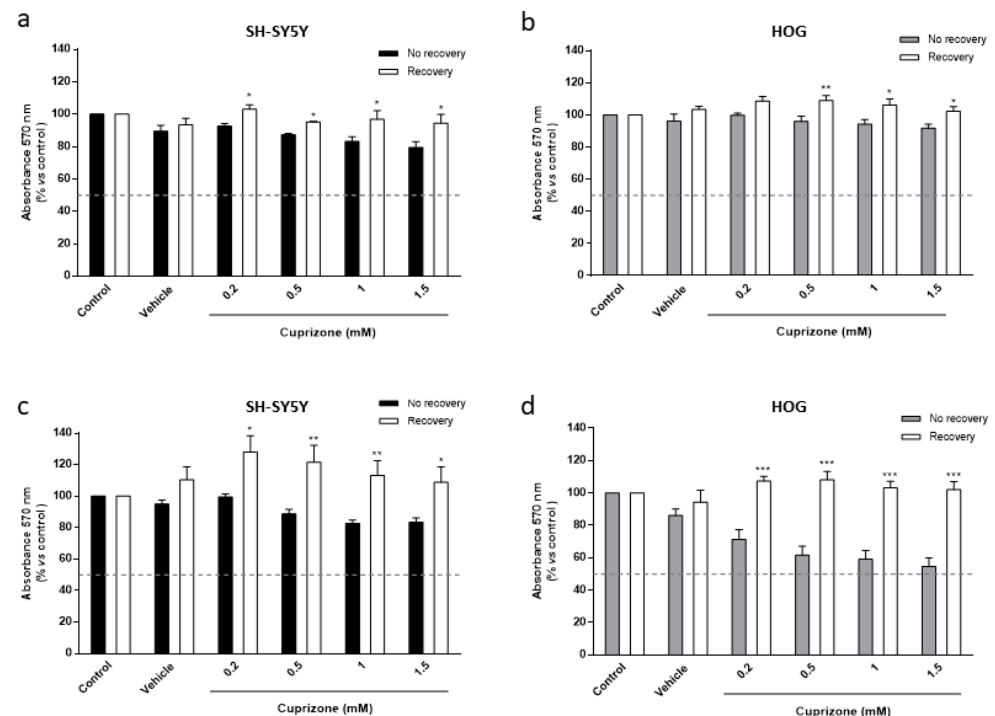


Figure 3. MTT reduction assay in SH-SY5Y (a,c) and HOG (b,d) cells treated with increasing concentrations of CPZ (0.2–1.5 mM) for 24 h followed by 24 (a,b) or 48 h (c,d) without the treatment (recovery period). Cell damage is represented as the percentage of MTT reduction *versus* control. Data are the mean \pm S.E.M of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a two-way ANOVA followed by *post-hoc* Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to no recovery.

3.3. Cuprizone Alters Mitochondrial Function but Does Not Cause Death in SH-SY5Y/HOG Co-Cultures

One of the major limitations of the *in vitro* MS models is that culture of a single cell type does not reflect the microenvironment of the CNS. Accordingly, we analyzed the cytotoxic effect of CPZ in neuron-glia *in vitro* model, namely a SH-SY5Y/HOG cell co-culture.

First of all, suitable co-culture conditions were determined in terms of optimal growth medium and cell type proportion (see Material and Methods section). Apart from their morphological identification, we tested by immunofluorescence the presence and proportion of both cell types in the co-cultures, specifically using the anti-NeuN antibody for SH-SY5Y and the anti-B crystallin antibody for HOG cells (data not shown). In these selected conditions, and 24 h after seeding, both cell types were adherent and showed small extended processes. At 48 h of co-culture the cells exhibited conical or fusiform bodies and longer processes (Figure 4c,d). Interestingly, we observed that SH-SY5Y and HOG cells grew in direct physical contact in a 1:1 ratio, approximately. In fact, cells began to establish contacts between them through their extensions at 48 and 72 h of culture (Figure 4c–f). Moreover, HOG cell processes were longer than those in the monocultures (Figure 4a,b,d,f).

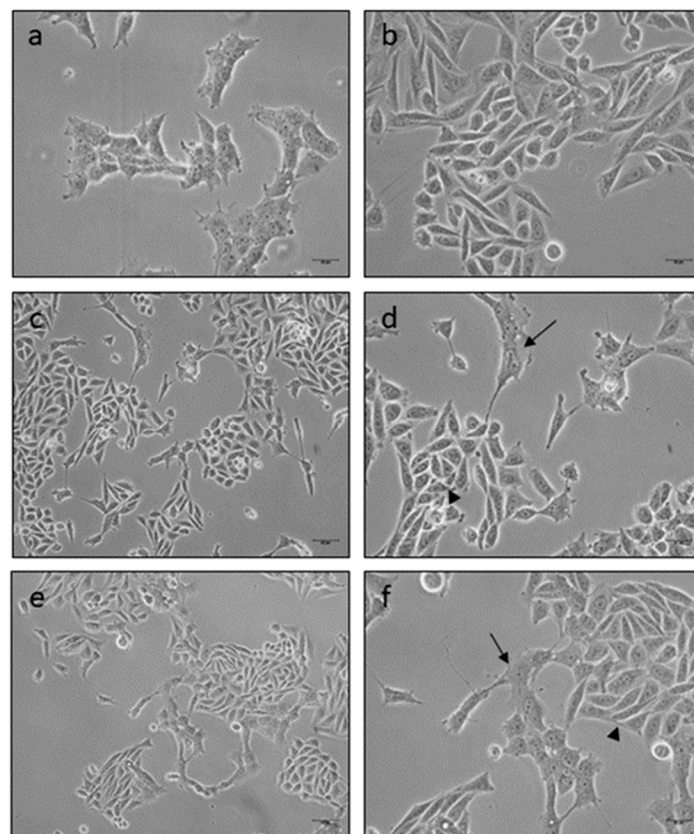


Figure 4. Representative phase contrast inverted microscopy images showing SH-SY5Y (arrowheads) and HOG cells (arrows) grown in a direct physical contact after 48 (c,d) or 72 h (e,f) of mixed culture. Cell processes were longer than those in the HOG (a) and SH-SY5Y (b) cells grown separately during 72 h. (a,b,d,f) Scale bars 10 μ m (20 \times); (c,e) Scale bars 10 μ m (10 \times).

As it might be expected, CPZ altered the viability of co-cultures in a concentration-dependent fashion. Effects were evident at both 24 and 48 h of treatment. Data analysis revealed a significant decrease (65–70%) in MTT reduction upon 24 h of treatment with 1 mM CPZ (Figure 5a). In cells treated for 48 h the extent of toxicity was similar (Figure 5b).

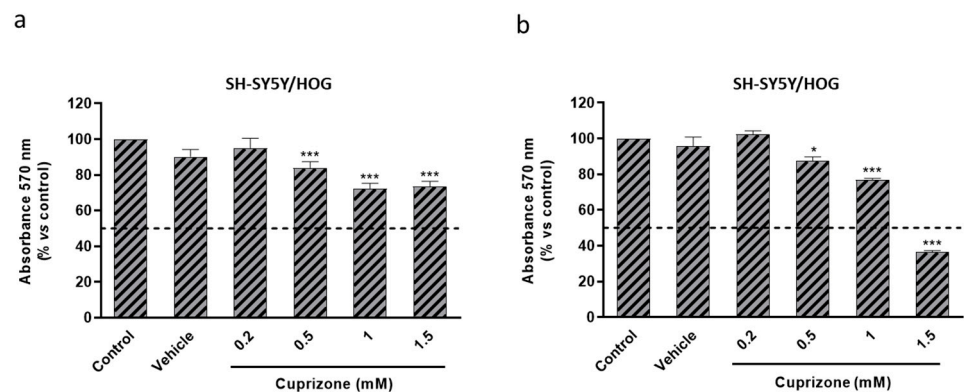


Figure 5. MTT reduction assay in SH-SY5Y/HOG co-cultures treated with increasing concentrations of CPZ (0.2–1.5 mM) for 24 (a) and 48 h (b). Cell damage is represented as the percentage of MTT reduction *versus* control. Data are the mean \pm S.E.M of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by *post-hoc* Tukey's test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to control.

Finally, we tested whether CPZ-induced decrease in cell viability correlated with increase in cell death. The trypan blue exclusion test showed that CPZ caused negligible (5–10%) cell death in SH-SY5Y/HOG co-cultures even at high concentrations (1–1.5 mM) and irrespective of treatment time (24 or 48 h) (Figure 6).

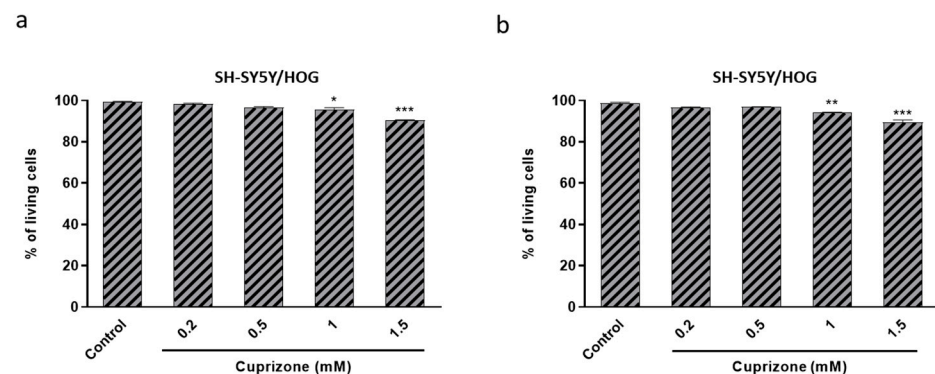


Figure 6. The number of SH-SY5Y and HOG living cells in the co-culture was calculated after treatment with increasing concentrations of CPZ (0.2–1.5 mM) for 24 (a) and 48 h (b). Cell viability is represented as the percentage of living cells *versus* control. Data are the mean \pm S.E.M of three independent experiments. Each experimental group was run in triplicate, and each plate was counted at least three times. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by *post-hoc* Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control.

3.4. The Loss of Cell Viability Caused by Cuprizone in SH-SY5Y/HOG Co-Cultures Is Reverted Once the Treatment Is Suspended

The next step was to assess the possibility that the loss of cell viability caused by CPZ could be reverted in SH-SY5Y/HOG co-cultures, as we found for individual cells. Again, we observed a significant increase in cell viability in co-cultures treated with 0.2–1.5 mM CPZ for 24 h following by a recovery period (Figure 7). Moreover, the effect was time-dependent since co-cultures showed greater improvements in viability at 48 than at 24 h of recuperation (Figure 7). These results are consistent with CPZ reversible actions on cell metabolism also detectable in neuron-glia co-cultures.

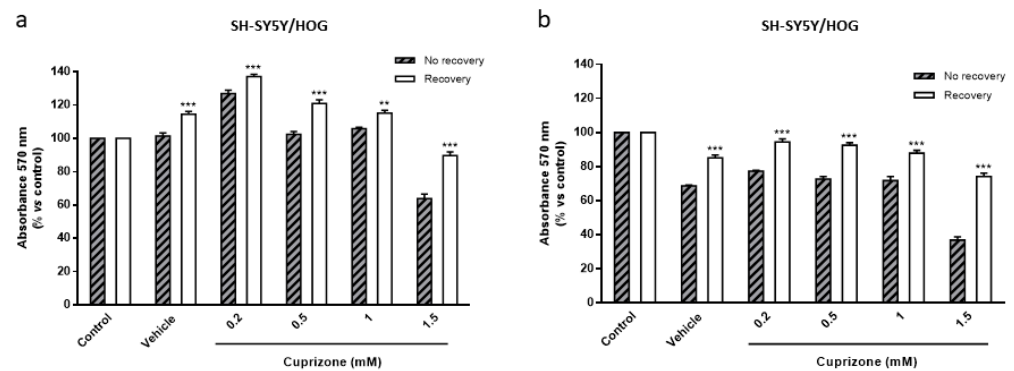


Figure 7. MTT reduction assay in SH-SY5Y/HOG co-cultures treated with increasing concentrations of CPZ (0.2–1.5 mM) for 24 h followed by 24 (a) or 48 h (b) without the treatment (recovery period). Cell damage is represented as the percentage of MTT reduction *versus* control. Data are the mean \pm S.E.M of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a two-way ANOVA followed by *post-hoc* Tukey's test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to no recovery.

3.5. Oxygen Consumption by the Electron Transport Chain Is Reduced upon CPZ Treatment

To better understand the apparently reversible CPZ effect, we tested the oxygen consumption rate (OCR) in primary cultures of neurons from rat neuronal cortex. In our hands, OCR is instrumental to measure the activity of primary cells from white adipose tissue (WAT) and, therefore, we used them as a control (Figure 8). The decrease in OCR induced by CPZ was dose-dependent. Notice that oxygen consumption is a kinetic measure that correlates with the slope of the curves. As shown in Figure 8a,b, the slope was negligible when either primary WAT or cortical cells were treated with 50 μ M CPZ. Then, a decrease in slope, in OCR and, consequently, in cell respiration, was detected by the administration of CPZ at concentrations higher than 10 μ M (Figure 8). Surprisingly, those concentrations of CPZ (10 or 50 μ M) that did not cause significant reductions in cell viability were able to significantly reduce oxygen consumption.

These results show that energy metabolism is affected by CPZ in fairly different cell types (and not only in neural cells). Then, we aimed at comparing OCR data in primary cultures of neurons with those of glial origin, one from human origin (T-98) with supposedly mild metabolic activity and another from a rodent glioblastoma (N-9) with supposedly high metabolic activity. Our findings show that CPZ caused a concentration-dependent decrease in oxygen consumption in both cell lines (Figure 9). The decline in OCR in T-98 was higher than in the N-9 cells suggesting differential susceptibility to the toxic drug (Figure 9a). Additionally noticeable is the reduction in respiration rate achieved in the two glial cell lines by very low concentrations of CPZ. Significant reductions were already noticed at concentrations as low as 0.1 μ M that are ineffective in the case of rat cortical neurons (Figure 10).

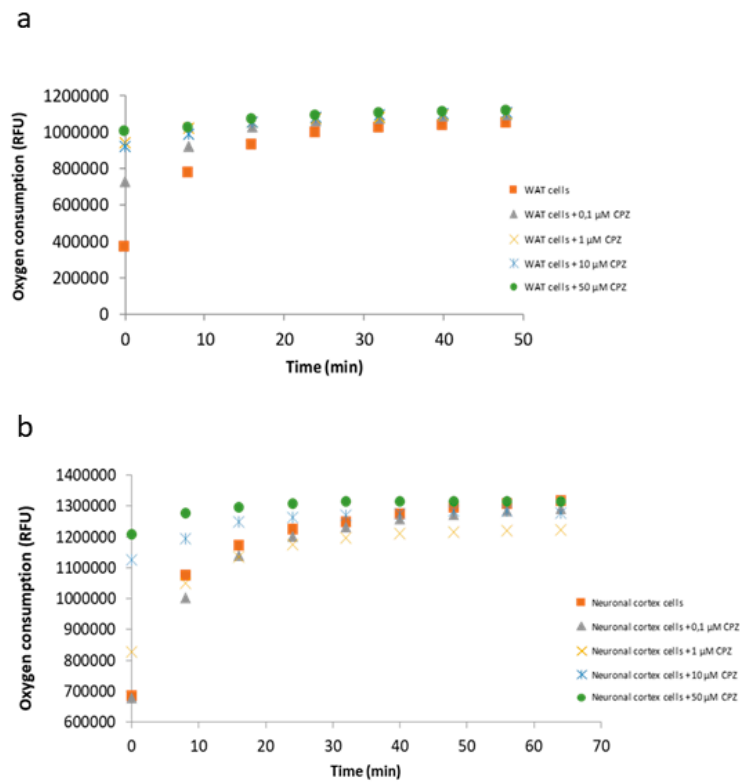


Figure 8. OCR assay in white adipose tissue (WAT) (a) and cortical neurons (b) incubated with increasing concentrations of CPZ (0.1–50 μM) for 24 h. Oxygen consumption was monitored in real-time using 96-well plate oxygen-sensing plates. Data are the mean ± S.E.M of five independent experiments. RFU: relative fluorescence units.

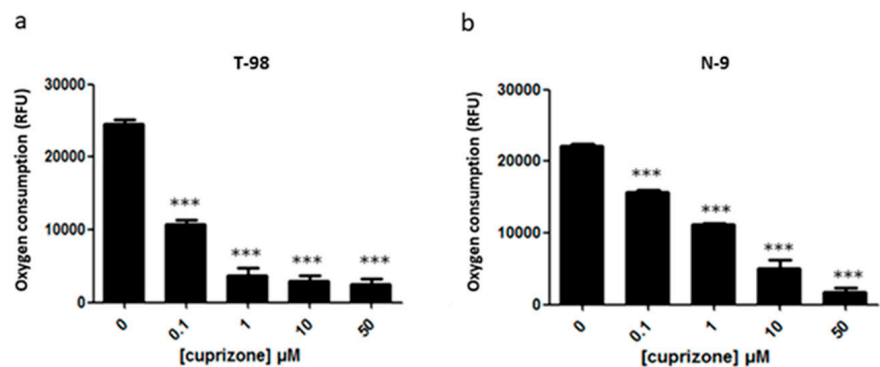


Figure 9. OCR assay in T-98 (a) and N-9 cells (b) incubated with increasing concentrations of CPZ (0.1–50 μM) for 24 h. Data are the mean ± S.E.M of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by *post-hoc* Tukey's test. *** $p < 0.001$ compared to control. RFU: relative fluorescence units.

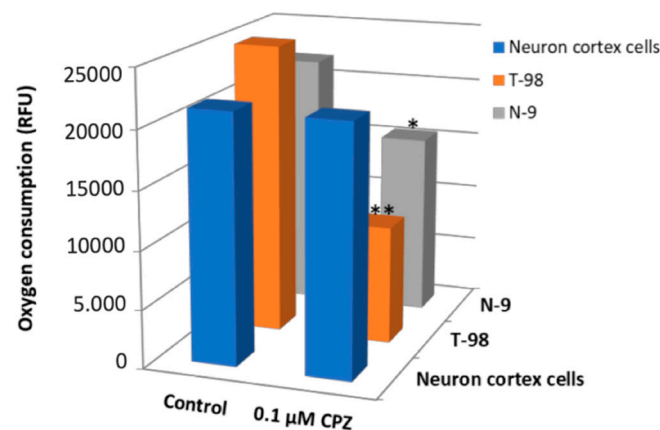


Figure 10. Oxygen consumption in T-98, N-9 and neuronal cortex cells treated with 0.1 μM of CPZ for 24 h. Data are the mean \pm S.E.M of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a Student's t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ glial compared to neuronal cells. RFU: relative fluorescence units.

4. Discussion

The use of in vivo and in vitro models is of pivotal relevance in the study of a complex disease such as MS, characterized by (i) multifactorial etiology, (ii) inter-individual variability of clinical manifestations, and (iii) lengthy time-course. In translational research, these features and the fact that patient samples can only be obtained *post-mortem*, pose significant limitations [11,37]. Nowadays, promoting an early and strong regeneration and remyelination in the CNS appears as the most promising approach in MS treatment, and the CPZ mouse model of demyelination seems to be very appropriate [20–22]. Despite its advantages, further work is needed to properly ascertain the intracellular pathways that lead to neuron damage and OLG apoptotic death. Therefore, it is required a simpler model in which molecular mechanism of MS can be better addressed [20,38]. In this sense, we here propose a cell model based on in vitro CPZ toxicity that has already been validated in our laboratory as an effective model to test potential protective molecules that could be key in the development of interventions to afford MS-related neuroprotection [39].

As mentioned, it was difficult to develop MS models in rodents but the CPZ-based mice models are of reference now. The dosage necessary to induce demyelination in rodents is strain- and age-dependent. At an appropriate dosage of CPZ the C57BL/6 genetic background leads to (mice) models with CNS lesions that are similar to those found in patients [40]. CPZ as copper ion chelator affects mitochondria and, therefore, we wanted to assess the effects in different cell lines. Our results show that CPZ alters mitochondrial function; the compound is mainly toxic for glial cells but it also affects neurons. In fact, the compound impacts on the functional state of mitochondria and aerobic cell respiration, thus compromising cell metabolism. There are very few reports that analyze the effect of CPZ in cellular models. Benetti et al., (2011) observed that treatment with 200 μM of CPZ during 3 weeks did not cause loss of cell viability in SH-SY5Y and GN11 neurons [41]. A later study revealed that the proliferative and survival rates of SH-SY5Y, microglia, astrocytes, and OLG precursor cells were not affected by short-term treatment with different concentrations of CPZ [32]. Recently, it has been demonstrated that CPZ leads to decreases in metabolic viability in the oligodendroglial cell line, MO3.13 [42]. On the one hand, these discrepancies in terms of cytotoxicity may be due to the methodology and the concentration or time of exposure to CPZ. On the other hand, the lack of changes in cell viability, in these previous studies, may be consequence of the Resazurin reduction test chosen, commercially known as AlamarBlue[®], since it is reported that there are serious concerns about its effectiveness to assess viability [43–45].

Also noteworthy is that the effect of CPZ does not translate into glial cell death in contrast to the suggestion derived from in vivo experiments [25]. Demyelinated lesions in

the brain of CPZ-intoxicated mice are consequence of OLGs death that correlates with microglial and astroglial activation, and with macrophage accumulation in a highly oxidative and inflammatory scenario characterized by elevated levels of cytokines [28,42,46,47]. In this line, our findings suggest that CPZ cell-specific toxicity, by itself, would not be able to induce OLGs death since immune and inflammatory concomitant cell responses would be required [20]. So far, no significant loss of neurons in the CPZ-mouse model has been reported [26], a finding that fits with our results in primary cultures. Interestingly, we also found that glial cells were more sensitive to CPZ than neurons. OCR results confirm that CPZ may affect virtually all cell types and that the sensitivity of each cell may depend on multiple factors; first of all, on the species as indicated by [40] but also on the cell type. In fact, differential susceptibility of neurons and glia against oxidative or mitochondrial damage in the aged or diseased brains has been the subject of intensive research [48,49]. In a very recent study, Luo et al., (2020) demonstrated a differential vulnerability, in terms of mitochondrial dysfunction, of brain cells of C57BL/6 mice subjected to short-term CPZ intoxication; the more efficient REDOX system of neurons makes them more resistant than OLGs to oxidative stress and mitochondrial damage [50]. The results show that CPZ alters energetic metabolism but why OLGs are more sensitive to these alterations is still an open question.

One simple approach to partially mimic cell responses that take place in the neuronal–glia complex networks of the CNS, is the use of mixed cultures [20,51]. Culture of different cell types in direct contact is useful for some applications but are difficult to obtain, especially when using primary or 3D cell cultures [20]. In this work, we developed a SH-SY5Y/HOG cell co-culture to analyze the effects of CPZ treatment in physiological-like conditions of the CNS. Despite its advantages, there are technical challenges that must be taken into account when one uses a co-culture of two cell lines, i.e., different nutritional requirements or growth rate, which complicates measurements of both intra- and inter-population interactions and makes the results difficult to interpret. Unlike what one might expect, the effect of CPZ in co-cultures was qualitatively similar to that obtained using individual cell clones.

The CPZ-induced murine model of demyelination has led to an exponential advance in testing novel therapies for MS, especially those aimed at addressing the myelin degenerative aspect of the disease [52]. One of the most relevant conclusions is the spontaneous recovery, to our knowledge never attempted using cell lines. Importantly, our findings demonstrated that the loss of neural viability due to the addition of different concentrations of the copper chelator was reverted in a time-dependent manner upon treatment interruption. This result is in line with the reversibility of demyelination after withdrawal of the toxic in mice subjected for 3–6 weeks to a diet containing 0.2% of CPZ [53]. Gudi et al., (2014) argued that remyelination phenomenon in murine models is based on proliferation and differentiation of precursor OLGs [54]. Bearing in mind our data, we can also hypothesize that mature OLGs functionality is compromised during treatment but returns back to normal after the toxic challenge.

Despite that CPZ model has constituted, for more than 50 years, one of the best models for the study of demyelinating diseases such as MS, the exact mechanism of action of CPZ is not completely understood. Nowadays, the main hypothesis is that CPZ could pass through biological membranes and compromise mitochondrial function acting directly on intracellular Cu (II) ion content, affecting $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -superoxide dismutase or monoamine oxidase function, and diminishing the activity of the electron transport chain [25,54,55]. The consequent decrease in energy production and the increase in oxidative stress lead to mitochondrial damage and, eventually, to cell death, as it has been shown in vivo in hepatocytes and also in OLGs [56,57]. In this sense, Pasquini et al., (2007) demonstrated that CPZ causes the appearance of megamitochondria in OLGs, a large and swollen dysfunctional form of this subcellular organelle. However, more recently, it has been suggested that CPZ could also act in an ion chelator independent fashion [27,42,58]. In this sense, a recent work by Tarabozetti and co-workers (2017) indicates that CPZ uptake causes

lipid metabolism disturbances that compromise OLGs survival. Additionally relevant, is the proven relationship between CPZ intoxication, oxidative stress and apoptosis in mature OLGs [25,26,59].

In conclusion, our work demonstrates that CPZ does not cause death in any of the assayed cell models, albeit it induces a significant loss of metabolic performance, may be due to the alteration of mitochondrial function, that is spontaneously restored when the toxic is eliminated. Moreover, we find differential vulnerability between glial cells and neurons. Therefore, the reversible cytotoxic model here implemented may help to further investigate the role of mitochondria in MS-associated neurodegeneration. It constitutes, a suitable approximation to study the interconnected molecular mechanisms underlying the pathophysiology of the MS and other demyelinating diseases, often characterized by periods of exacerbation of neurologic symptoms followed by periods of partial or complete recovery (remissions) as RRMS. Nevertheless, further experimental effort is needed to address whether the cytotoxicity is mediated by a direct or indirect effect of CPZ on mitochondrial electron transport chain.

Author Contributions: Conceptualization was agreed by J.T., R.F., and A.N., who also participated in the design of the project and analyzed the results; it is considered that their contribution was similar; E.M.-P., N.R.-S., and S.V.-C. performed the majority of the experiments; E.d.V. participated in a significant number of experiments; G.N. participated in the OCR data analysis and in providing data for final Figures; E.M.-P. and J.T. did many of the imaging assays in the microscope, took images and participated in data analysis; E.M.-P., A.N., and R.F. wrote the first draft of the manuscript that was further edited by all co-authors, who agreed with submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by *Fondo de Investigaciones Sanitarias* (FIS), which belongs to the Spanish National *Instituto de Salud Carlos III* through the project (PI15/00601) (Co-funded by European Regional Development Fund and European Social Fund “Investing in your future”).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ray Dorsey, E.; Elbaz, A.; Nichols, E.; Abd-Allah, F.; Abdelalim, A.; Adsuar, J.C.; Ansha, M.G.; Brayne, C.; Choi, J.Y.J.; Collado-Mateo, D.; et al. Global, regional, and national burden of Parkinson’s disease, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 939–953. [[CrossRef](#)]
2. Gelfand, J.M. Multiple sclerosis: Diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 122, pp. 269–290.
3. Noseworthy, J.H.; Lucchinetti, C.; Rodriguez, M.; Weinshenker, B.G. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 938–952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Correale, J.; Gaitán, M.I.; Ysraelit, M.C.; Fiol, M.P. Progressive multiple sclerosis: From pathogenic mechanisms to treatment. *Brain* **2017**, *140*, 527–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lublin, F.D.; Reingold, S.C.; Cohen, J.A.; Cutter, G.R.; Sørensen, P.S.; Thompson, A.J.; Wolinsky, J.S.; Balcer, L.J.; Banwell, B.; Barkhof, F.; et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* **2014**, *83*, 278–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Goldberg, P.; Fleming, M.C.; Picard, E.H. Multiple sclerosis: Decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Med. Hypotheses* **1986**, *21*, 193–200. [[CrossRef](#)]
7. Kappos, L.; Bar-Or, A.; Cree, B.A.C.; Fox, R.J.; Giovannoni, G.; Gold, R.; Vermersch, P.; Arnold, D.L.; Arnould, S.; Scherz, T.; et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): A double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet* **2018**, *391*, 1263–1273. [[CrossRef](#)]
8. Leibowitz, S.M.; Yan, J. NF- κ B pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and the therapeutic implications. *Front. Mol. Neurosci.* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)]
9. Ontaneda, D.; Hyland, M.; Cohen, J.A. Multiple Sclerosis: New Insights in Pathogenesis and Novel Therapeutics. *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 389–404. [[CrossRef](#)]

10. Vandenbark, A.A.; Culbertson, N.E.; Bartholomew, R.M.; Huan, J.; Agotsch, M.; LaTocha, D.; Yadav, V.; Mass, M.; Whitham, R.; Lovera, J.; et al. Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis. *Immunology* **2008**, *123*, 66–78. [[CrossRef](#)]
11. Barkhof, F.; Hulst, H.E.; Drulović, J.; Uitdehaag, B.M.J.; Matsuda, K.; Landin, R. Ibudilast in relapsing-remitting multiple sclerosis: A neuroprotectant? *Neurology* **2010**, *74*, 1033–1040. [[CrossRef](#)]
12. Brown, J.W.L.; Coles, A.; Horakova, D.; Havrdova, E.; Izquierdo, G.; Prat, A.; Girard, M.; Duquette, P.; Trojano, M.; Lugaresi, A.; et al. Association of Initial Disease-Modifying Therapy with Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA* **2019**, *321*, 175–187. [[CrossRef](#)]
13. Burton, J.M.; Kimball, S.; Vieth, R.; Bar-Or, A.; Dosch, H.M.; Cheung, R.; Gagne, D.; D'Souza, C.; Ursell, M.; O'Connor, P. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology* **2010**, *74*, 1852–1859. [[CrossRef](#)]
14. Frau, J.; Coghe, G.; Loreface, L.; Fenu, G.; Cocco, E. New horizons for multiple sclerosis therapeutics: Milestones in the development of ocrelizumab. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2018**, *14*, 1093–1099. [[CrossRef](#)]
15. Ontaneda, D.; Fox, R.J.; Chataway, J. Clinical trials in progressive multiple sclerosis: Lessons learned and future perspectives. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 208–223. [[CrossRef](#)]
16. Reich, D.S.; Lucchinetti, C.F.; Calabresi, P.A. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 169–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Stys, P.K.; Zamponi, G.W.; Van Minnen, J.; Geurts, J.J.G. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 507–514. [[CrossRef](#)]
18. Caprariello, A.V.; Rogers, J.A.; Morgan, M.L.; Hoghooghi, V.; Plemel, J.R.; Koebel, A.; Tsutsui, S.; Dunn, J.F.; Kotra, L.P.; Ousman, S.S.; et al. Biochemically altered myelin triggers autoimmune demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 5528–5533. [[CrossRef](#)]
19. Titus, H.E.; Chen, Y.; Podojil, J.R.; Robinson, A.P.; Balabanov, R.; Popko, B.; Miller, S.D. Pre-clinical and Clinical Implications of “Inside-Out” vs. “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 599717. [[CrossRef](#)]
20. van Der Star, B.; Vogel, D.; Kipp, M.; Puentes, F.; Baker, D.; Amor, S. In Vitro and In Vivo Models of Multiple Sclerosis. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2012**, *11*, 570–588. [[CrossRef](#)]
21. Palumbo, S.; Pellegrini, S. Experimental In Vivo Models of Multiple Sclerosis: State of the Art. In *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis*; Codon Publications: Brisbane, Australia, 2017; pp. 173–183. ISBN 9780994438133.
22. Procaccini, C.; De Rosa, V.; Pucino, V.; Formisano, L.; Matarese, G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *759*, 182–191. [[CrossRef](#)]
23. Denic, A.; Johnson, A.J.; Bieber, A.J.; Warrington, A.E.; Rodriguez, M.; Pirko, I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* **2011**, *18*, 21–29. [[CrossRef](#)]
24. Nyamoya, S.; Schweiger, F.; Kipp, M.; Hochstrasser, T. Cuprizone as a model of myelin and axonal damage. *Drug Discov. Today Dis. Model.* **2017**, *25–26*, 63–68. [[CrossRef](#)]
25. Vega-Riquer, J.M.; Mendez-Victoriano, G.; Morales-Luckie, R.A.; Gonzalez-Perez, O. Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Curr. Neuropharmacol.* **2019**, *17*, 129–141. [[CrossRef](#)]
26. Praet, J.; Guglielmetti, C.; Berneman, Z.; Van der Linden, A.; Ponsaerts, P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2014**, *47*, 485–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Carlton, W.W. Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone. *Exp. Mol. Pathol.* **1969**, *10*, 274–287. [[CrossRef](#)]
28. Messori, L.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Sorace, L.; Muniz-Miranda, M.; Zatta, P. Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalt. Trans.* **2007**, 2112–2114. [[CrossRef](#)]
29. Post, G.R.; Dawson, G. Characterization of a cell line derived from a human oligodendrogloma. *Mol. Chem. Neuropathol.* **1992**, *16*, 303–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bello-Morales, R.; Crespillo, A.J.; García, B.; Dorado, L.Á.; Martín, B.; Tabarés, E.; Krummenacher, C.; De Castro, F.; López-Guerrero, J.A. The effect of cellular differentiation on HSV-1 infection of oligodendrocytic cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
31. Hradsky, J.; Mikhaylova, M.; Karpova, A.; Kreutz, M.R.; Zuschratter, W. Super-resolution microscopy of the neuronal calcium-binding proteins calneuron-1 and caldendrin. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *963*, 147–169. [[CrossRef](#)]
32. Bénardais, K.; Kotsiari, A.; Škuljec, J.; Koutsoudaki, P.N.; Gudi, V.; Singh, V.; Vulinović, F.; Skripuletz, T.; Stangel, M. Cuprizone [bis(cyclohexylidenedihydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotox. Res.* **2013**, *24*, 244–250. [[CrossRef](#)]
33. Cammer, W. The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. *J. Neurol. Sci.* **1999**, *168*, 116–120. [[CrossRef](#)]
34. Martínez-Pinilla, E.; Aguinaga, D.; Navarro, G.; Rico, A.J.; Oyarzábal, J.; Sánchez-Arias, J.A.; Lanciego, J.L.; Franco, R. Targeting CB1 and GPR55 Endocannabinoid Receptors as a Potential Neuroprotective Approach for Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 5900–5910. [[CrossRef](#)]
35. Hynes, J.; Floyd, S.; Soini, A.E.; O'Connor, R.; Papkovskyi, D.B. Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8*, 264–272. [[CrossRef](#)]
36. Martínez, E.; Navarro, A.; Ordóñez, C.; Del Valle, E.; Tolivia, J. Oxidative stress induces apolipoprotein d overexpression in hippocampus during aging and alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *36*, 129–144. [[CrossRef](#)]

37. Palumbo, S. Pathogenesis and Progression of Multiple Sclerosis: The Role of Arachidonic Acid-Mediated Neuroinflammation. In *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis*; Codon Publications: Brisbane, Queensland, Australia, 2017; pp. 111–124.
38. Buntinx, M.; Vanderlocht, J.; Hellings, N.; Vandenabeele, F.; Lambrichts, I.; Raus, J.; Ameloot, M.; Stinissen, P.; Steels, P. Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: Morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *J. Neurocytol.* **2003**, *32*, 25–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Martínez-Pinilla, E.; Rubio-Sardón, N.; Peláez, R.; García-Álvarez, E.; Del Valle, E.; Tolvía, J.; Larráyo, I.M.; Navarro, A. Neuroprotective Effect of Apolipoprotein D in Cuprizone-Induced Cell Line Models: A Potential Therapeutic Approach for Multiple Sclerosis and Demyelinating Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Torkildsen, Ø.; Brunborg, L.A.; Myhr, K.-M.; Bø, L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol. Scand.* **2008**, *117*, 72–76. [[CrossRef](#)]
41. Benetti, F.; Ventura, M.; Salmini, B.; Ceola, S.; Carbonera, D.; Mammi, S.; Zitolo, A.; D’Angelo, P.; Urso, E.; Maffia, M.; et al. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *Neurotoxicology* **2010**, *31*, 509–517. [[CrossRef](#)]
42. Taraboletti, A.; Walker, T.; Avila, R.; Huang, H.; Caporoso, J.; Manandhar, E.; Leeper, T.C.; Modarelli, D.A.; Medicetty, S.; Shriver, L.P. Cuprizone Intoxication Induces Cell Intrinsic Alterations in Oligodendrocyte Metabolism Independent of Copper Chelation. *Biochemistry* **2017**, *56*, 1518–1528. [[CrossRef](#)]
43. Chen, J.L.; Steele, T.W.J.; Stuckey, D.C. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 351–358. [[CrossRef](#)]
44. O’Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426. [[CrossRef](#)]
45. Uzarski, J.S.; DiVito, M.D.; Wertheim, J.A.; Miller, W.M. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* **2017**, *129*, 163–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Buschmann, J.P.; Berger, K.; Awad, H.; Clarner, T.; Beyer, C.; Kipp, M. Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 66–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Liu, L.; Belkadi, A.; Darnall, L.; Hu, T.; Drescher, C.; Cotleur, A.C.; Padovani-Claudio, D.; He, T.; Choi, K.; Lane, T.E.; et al. CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: Relevance to multiple sclerosis. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 319–326. [[CrossRef](#)]
48. Fünfschilling, U.; Supplie, L.M.; Mahad, D.; Boretius, S.; Saab, A.S.; Edgar, J.; Brinkmann, B.G.; Kassmann, C.M.; Tzvetanova, I.D.; Möbius, W.; et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* **2012**, *485*, 517–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lassmann, H.; Van Horssen, J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2016**, *1862*, 506–510. [[CrossRef](#)]
50. Luo, M.; Deng, M.; Yu, Z.; Zhang, Y.; Xu, S.; Hu, S.; Xu, H. Differential Susceptibility and Vulnerability of Brain Cells in C57BL/6 Mouse to Mitochondrial Dysfunction Induced by Short-Term Cuprizone Exposure. *Front. Neuroanat.* **2020**, *14*, 30. [[CrossRef](#)]
51. Hyung, S.; Yoon Lee, B.; Park, J.C.; Kim, J.; Hur, E.M.; Francis Suh, J.K. Coculture of Primary Motor Neurons and Schwann Cells as a Model for in Vitro Myelination. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15122. [[CrossRef](#)]
52. Kolahdouzan, M.; Futhey, N.C.; Kieran, N.W.; Healy, L.M. Novel Molecular Leads for the Prevention of Damage and the Promotion of Repair in Neuroimmunological Disease. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1657. [[CrossRef](#)]
53. Hillis, J.M.; Davies, J.; Mundim, M.V.; Al-Dalahmah, O.; Szele, F.G. Cuprizone demyelination induces a unique inflammatory response in the subventricular zone. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13*, 190. [[CrossRef](#)]
54. Gudi, V.; Gingele, S.; Skripuletz, T.; Stangel, M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: Lessons learned. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pasquini, L.A.; Calatayud, C.A.; Bertone Uña, A.L.; Millet, V.; Pasquini, J.M.; Soto, E.F. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 279–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Matsushima, G.K.; Morell, P. The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathol.* **2006**, *11*, 107–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Patergnani, S.; Fossati, V.; Bonora, M.; Giorgi, C.; Marchi, S.; Missiroli, S.; Rusielewicz, T.; Wieckowski, M.R.; Pinton, P. Mitochondria in Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms of Pathogenesis. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 328, pp. 49–103.
58. Moldovan, N.; Al-Ebraheem, A.; Lobo, L.; Park, R.; Farquharson, M.J.; Bock, N.A. Altered transition metal homeostasis in the cuprizone model of demyelination. *Neurotoxicology* **2015**, *48*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Hesse, A.; Wagner, M.; Held, J.; Brück, W.; Salinas-Riester, G.; Hao, Z.; Waisman, A.; Kuhlmann, T. In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 362–369. [[CrossRef](#)]



Article

Neuroprotective Effect of Apolipoprotein D in Cuprizone-Induced Cell Line Models: A Potential Therapeutic Approach for Multiple Sclerosis and Demyelinating Diseases

Eva Martínez-Pinilla ^{1,2,3,*} , Núria Rubio-Sardón ¹, Rafael Peláez ⁴ , Enrique García-Álvarez ¹ ,
Eva del Valle ^{1,2,3}, Jorge Tolivia ^{1,2,3,*} , Ignacio M. Larráyoiz ⁴ and Ana Navarro ^{1,2,3}

¹ Department of Morphology and Cell Biology, University of Oviedo, 33003 Oviedo, Spain; nuria199510@hotmail.com (N.R.-S.); garal.enrique@gmail.com (E.G.-Á.); valleeva@uniovi.es (E.d.V.); anavarro@uniovi.es (A.N.)

² Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), 33003 Oviedo, Spain

³ Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Spain

⁴ Biomarkers and Molecular Signaling Group, Neurodegeneration Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), 26006 Logroño, Spain; rpelaez@riojasalud.es (R.P.); ilarrayoz@riojasalud.es (I.M.L.)

* Correspondence: martinezpinillaeva@gmail.com (E.M.-P.); jtolivia@uniovi.es (J.T.)

Abstract: Apolipoprotein D (Apo D) overexpression is a general finding across neurodegenerative conditions so the role of this apolipoprotein in various neuropathologies such as multiple sclerosis (MS) has aroused a great interest in last years. However, its mode of action, as a promising compound for the development of neuroprotective drugs, is unknown. The aim of this work was to address the potential of Apo D to prevent the action of cuprizone (CPZ), a toxin widely used for developing MS models, in oligodendroglial and neuroblastoma cell lines. On one hand, immunocytochemical quantifications and gene expression measures showed that CPZ compromised neural mitochondrial metabolism but did not induce the expression of Apo D, except in extremely high doses in neurons. On the other hand, assays of neuroprotection demonstrated that antipsychotic drug, clozapine, induced an increase in Apo D synthesis only in the presence of CPZ, at the same time that prevented the loss of viability caused by the toxin. The effect of the exogenous addition of human Apo D, once internalized, was also able to directly revert the loss of cell viability caused by treatment with CPZ by a reactive oxygen species (ROS)-independent mechanism of action. Taken together, our results suggest that increasing Apo D levels, in an endo- or exogenous way, moderately prevents the neurotoxic effect of CPZ in a cell model that seems to replicate some features of MS which would open new avenues in the development of interventions to afford MS-related neuroprotection.

Keywords: breast cystic fluid; clozapine; endocytosis; glia; neurons; ROS



Citation: Martínez-Pinilla, E.; Rubio-Sardón, N.; Peláez, R.; García-Álvarez, E.; del Valle, E.; Tolivia, J.; Larráyoiz, I.M.; Navarro, A. Neuroprotective Effect of Apolipoprotein D in Cuprizone-Induced Cell Line Models: A Potential Therapeutic Approach for Multiple Sclerosis and Demyelinating Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1260. <https://doi.org/10.3390/ijms22031260>

Academic Editor: Anne Vejux

Received: 20 January 2021

Accepted: 22 January 2021

Published: 27 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Apolipoprotein D (Apo D) is a well-known lipocalin family member that plays a key role in the transport, metabolism and homeostasis of some lipids due to its ability to bind cholesterol, arachidonic acid, steroids, retinoic acid or anandamide, among other small hydrophobic ligands [1–3]. In the past decades, increasing evidence at biochemical and functional level suggested that Apo D acts as an antioxidant, being part of the body's defense system against oxidative stress, and also as an endogenous neuroprotective agent. Indeed, crystallographic analysis revealed that this 29 kDa glycoprotein comprises an eight-stranded antiparallel β -barrel flanked by a singled α -helix that encloses a fat specific ligand-binding pocket. Moreover, Apo D shows various exposed hydrophobic residues located in three of its extended loops which may contribute to Apo D association with lipids and seem to explain its potential as multiligand and multifunctional protein [4,5]. Most importantly, they have been linked to the ability of Apo D to bind and reduce oxidized lipids, and thereby inhibit radical-propagation of lipid hydroperoxides [6–8].

Studies in cell systems reported that different stress signal pathways may modulate Apo D transcription. In fact, stressful stimuli such as H₂O₂, Rose Bengal, kainic acid, ultraviolet (UV) light, paraquat or lipopolysaccharide, leading to extended growth arrest and apoptosis, increase Apo D expression in a dose and time-dependent manner [9,10]. The potential neuroprotective and prosurvival roles for Apo D have also been proven in animal models where the overexpression of this protein confers greater protection against oxidative stress and contributes significantly to the regulation of longevity; the experimental lack of Apo D causes opposite results [11,12].

In humans, Apo D is expressed in neural and peripheral tissues, detected in cerebrospinal fluid (CSF), in plasma as an important component of high-density lipoproteins (HDL), and in breast cyst fluid (BCF) [1,2,13–15]. In nonpathological conditions of the central and peripheral nervous system (CNS and PNS, respectively), Apo D is widely expressed in neurons, glia (astrocytes, oligodendrocytes (OLGs), and Schwann cells), perivascular cells and pericytes [13,16–18], contributing to maintain neuronal homeostasis and myelin extracellular leaflet compaction [19,20]. Remarkably, Apo D is upregulated in neural cells and CSF during aging, and in brains affected by neurodegenerative diseases characterized by cellular stress and excitotoxicity such as multiple sclerosis (MS), Spongiform encephalopathy, Parkinson's disease (PD), Niemann–Pick disease, or Alzheimer's disease (AD) as well as psychiatric disorders (schizophrenia and bipolar disorder) [8,21,22].

MS is a devastating neurodegenerative disease that affects more than 2 million young adults worldwide, mainly women, with a complex and unknown etiology [23]. This demyelinating, autoimmune and inflammatory disease is manifested clinically in the form of multiple fully or partially reversible symptomatic episodes (reviewed in [24–26]), which reflect the progressive focal degeneration of OLGs and myelin membranes around axons in both white and grey matter areas throughout the brain and spinal cord [27–30]. Classically, OLG dysfunction has been linked to an exacerbated adaptive immune response, involving the recruitment of autoreactive T cells through a defective and permeable blood–brain barrier (BBB), and the activation of B cells [31–33]. The consequent inflammatory process activates microglia, astrocytes, and infiltrated macrophages that are able, in turn, to generate oxidative stress-related molecules as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) [34], which promote demyelination, compromise the neuro-axonal functional unit and contribute to the progressive tissue damage in MS [26,35,36]. However and contrary to what was thought, recent evidence shows that the biochemical alteration of myelin could be the initial event that triggers a secondary autoimmune response that results in the demyelinating inflammatory reaction taking place in the diseased brains, the so-called “inside-out” model of MS pathogenesis [37–39]. In the last two decades, extensive research has been carried out to find efficacious neuroprotective therapies in an attempt to alleviate symptoms and/or slow down or delay the progression of the MS [26,40–44]. Therefore, it is essential to know the root cause of the MS pathology in order to properly select the target for developing efficacious therapeutic interventions. For this purpose, a number of neurotoxin-induced in vivo and in vitro models of demyelination and MS-related neurodegeneration are used. Among all, neuronal and glial cell lines exposed to cuprizone (CPZ), a copper chelator that reversibly impacts on mitochondrial function, may be a convenient experimental approach instrumental in the advance of understanding of the functioning of the nervous system [45–48].

Previous studies showed that Apo D is upregulated in the CSF of MS patients [49,50], reactive astrocytes, and exhibits a characteristic expression pattern in MS lesions of the brain [51]. In this regard, levels of OLG-derived Apo D are lower in demyelinating plaques but appear to recover in areas of remyelination [51]. This study aims to assess the potential of Apo D (either by triggering its endogenous synthesis or by its exogenous addition), as well as its mechanism of action, to prevent the neurotoxic effect of CPZ in two cell models that mimic biochemical features of MS.

2. Results

2.1. Apo D Expression in HOG and SH-SY5Y Cells in Response to Cuprizone Treatment

Taking advantage of our experience in the CPZ-induced cell model, some previous results showing that CPZ was able to induce cytotoxic damage mediated by a mitochondrial dysfunction in the HOG and SH-SY5Y cell lines (data not shown), and the findings reported in this work (see next figures), we aimed to analyze the potential effect of CPZ on Apo D expression in these oligodendrogloma and neuroblastoma cell lines by qRT-PCR and immunocytochemistry. As shown in Figure 1, the analysis of Apo D gene expression (Figure 1a) and the immunosignal quantification (Figure 1b–d) revealed that CPZ induced changes in Apo D expression and, interestingly, only at the highest concentration (1000 μM) and at 48 h of treatment. In fact, a constant and almost invariable fluorescence signal was observed in control and treated cells (Figure 1b).

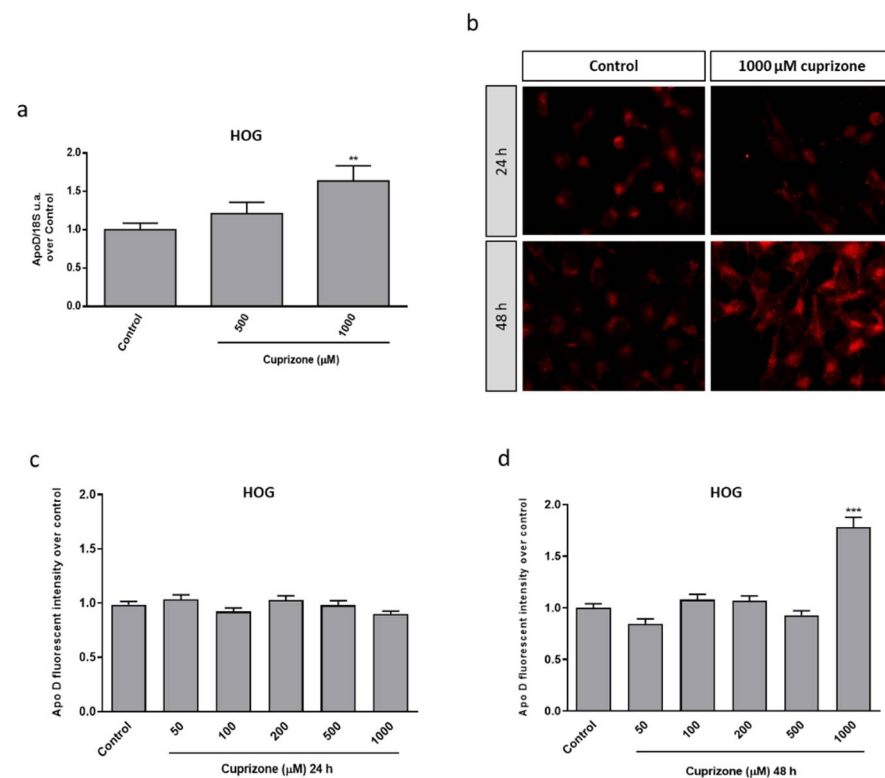


Figure 1. Relative Apo D gene expression in HOG cells treated with 0–1000 μM of CPZ following 24 h. Data represent the quotient between the gene and the expression of the housekeeping gene 18S rRNA. Bars represent the mean \pm SEM of all measurements ($n = 6–8$) (a). Representative fluorescence microscopy images of Apo D levels in HOG cells treated or not with 1000 μM of CPZ during 24 and 48 h. 40 \times magnification (b). Densitometric quantification of Apo D immunocytochemical signal after 24 (c) and 48 h (d) of treatment with increasing concentrations of CPZ (50–1000 μM) in HOG cells ($n = 6$). Bars represent mean density per cell in a 40 \times field \pm SEM (over control). Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control.

As expected in the case of SH-SY5Y neuroblastoma cells, which according to previous studies show a negligible expression of Apo D [52], we found that these cells exhibited a very scarce endogenous expression of Apo D only detected by immunocytochemistry, and that CPZ did not influence the apolipoprotein synthesis as observed in the images (Figure 2a) and the immunocytochemical quantification (Figure 2b,c).

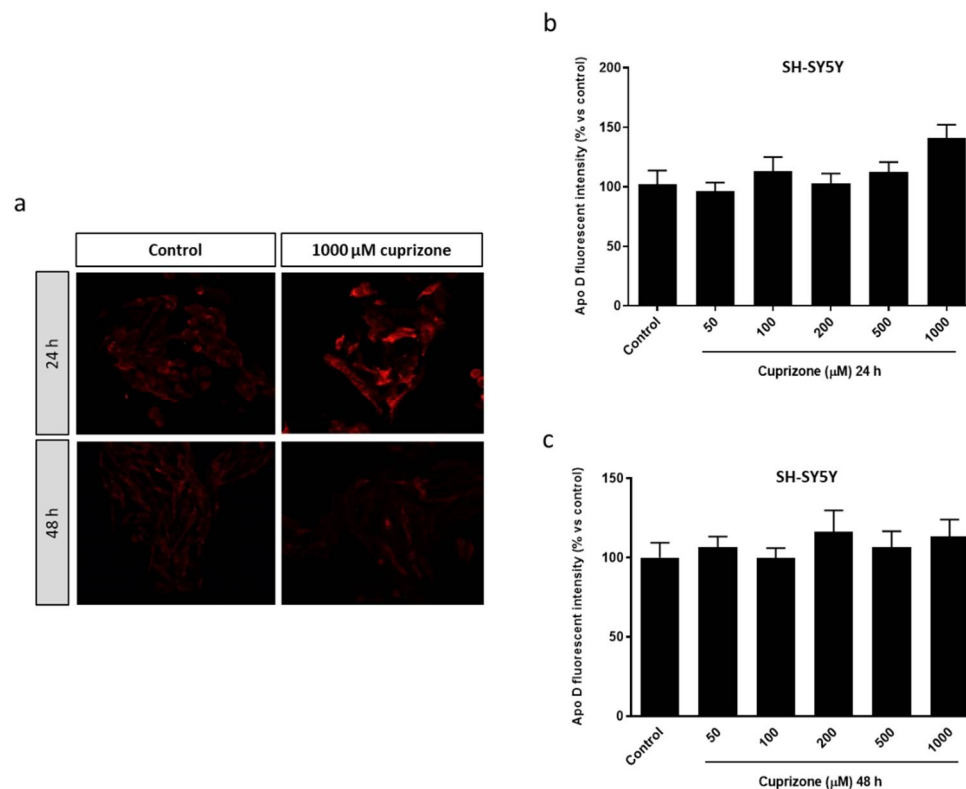


Figure 2. Representative fluorescence microscopy images of Apo D levels in SH-SY5Y cells treated or not with 1000 μM of CPZ during 24 and 48 h. 40× magnification (a). Densitometric quantification of Apo D immunocytochemical signal after 24 (b) and 48 h (c) of treatment with increasing concentrations of CPZ (50–1000 μM) in SH-SY5Y cells ($n = 6$). Bars represent mean density per cell in a 40× field ± SEM (% versus control).

2.2. Clozapine Prevents Loss of Mitochondrial Functionality and Cell Viability in Oligodendroglial and Neuronal CPZ-Induced Models of MS

The atypical antipsychotic drug, clozapine (CLO), widely used in the treatment of schizophrenia, among other psychiatric disorders, is considered as a therapeutic agent that seems to exert its beneficial effects by its ability to increase Apo D levels in the brain [53,54]. Therefore, we first evaluated the potential neuroprotective effect of CLO in the CPZ-induced cell models. For this purpose, a wide range of CLO concentrations, from 0.1 to 100 μM, was used to treat HOG or SH-SY5Y cells during 24 and 48 h in absence of CPZ. Once it was established that CLO did not cause loss of cell viability, except in extremely high doses and/or prolonged exposures (Figures A1 and A2), we assessed whether the addition of CLO could avoid the CPZ cytotoxicity. Of note, the two cell lines were differentially affected by CLO, being neurons more sensitive than glial cells to the same concentrations. Our findings demonstrated that CLO was able to prevent the mitochondrial dysfunction caused by the toxic in both HOG and SH-SY5Y cells. As shown in Figure 3, cell viability assessed by the MTT assay revealed that CLO (0.1–1 μM) prevented about 15–30% loss of cell viability when added 24 h before 500 μM of CPZ (Figure 3a,b). Similar results were obtained when cells were treated with CLO and CPZ at the same time. In contrast, this neuroprotective effect was not noticeable when cells were incubated with 500 μM of CPZ for 24 h and subsequently with increasing concentrations of CLO for, at least, another 24 h (data not shown).

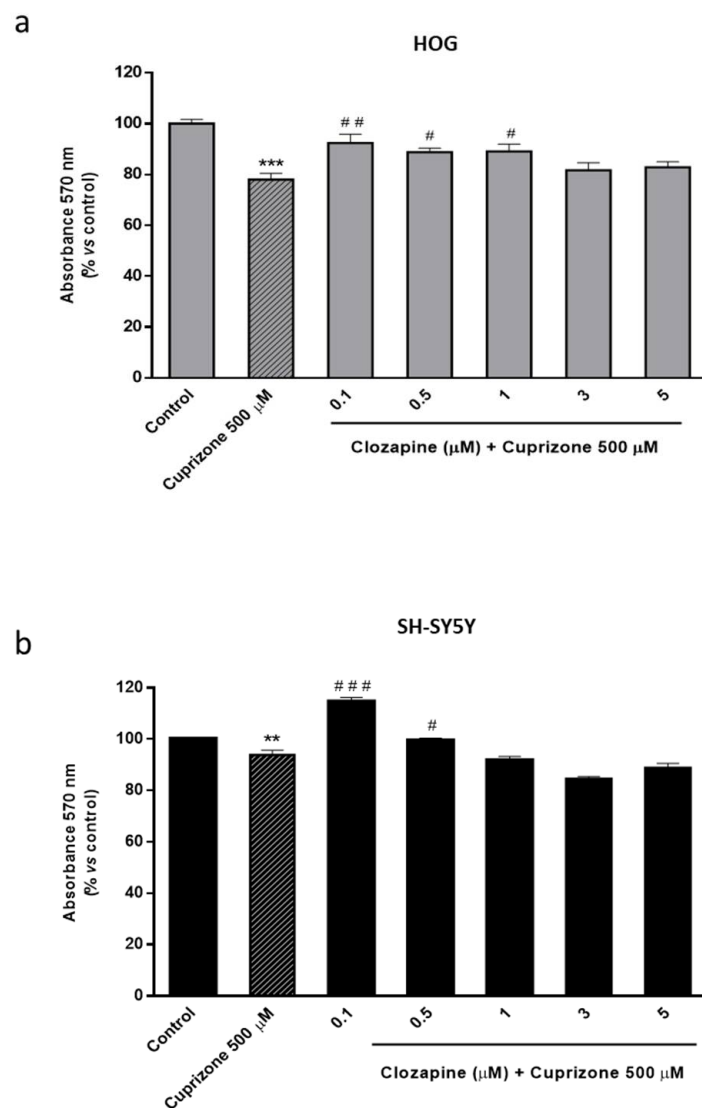


Figure 3. MTT assay in HOG (a) and SH-SY5Y cells (b) treated with increasing concentrations of CLO (0.1–5 μM) followed by 24 h with 500 μM of CPZ. Cell damage is represented as the percentage of viability versus control. Data are the mean \pm SEM of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with CPZ treatment.

2.3. Neuroprotective Doses of Clozapine Increase Apo D Expression in the CPZ-Induced Cell Models of MS

Then, and in order to check the possible link between the neuroprotective effect observed for CLO and the endogenous Apo D levels, the expression of this apolipoprotein was analyzed in HOG cells upon CLO treatment. qPCR and immunocytochemical analyses demonstrated that this antipsychotic drug did not produce changes in Apo D expression by itself, at least in the tested concentrations and times of treatment (Figure 4). However, CLO (0.1–3 μM) induced an increase in Apo D synthesis when it was coadministered with CPZ in OLGs at the same concentrations that prevented the loss of viability caused by the toxin. As shown in Figure 5, the increase in Apo D signal was higher than the control values when added 24 h before 500 μM of CPZ.

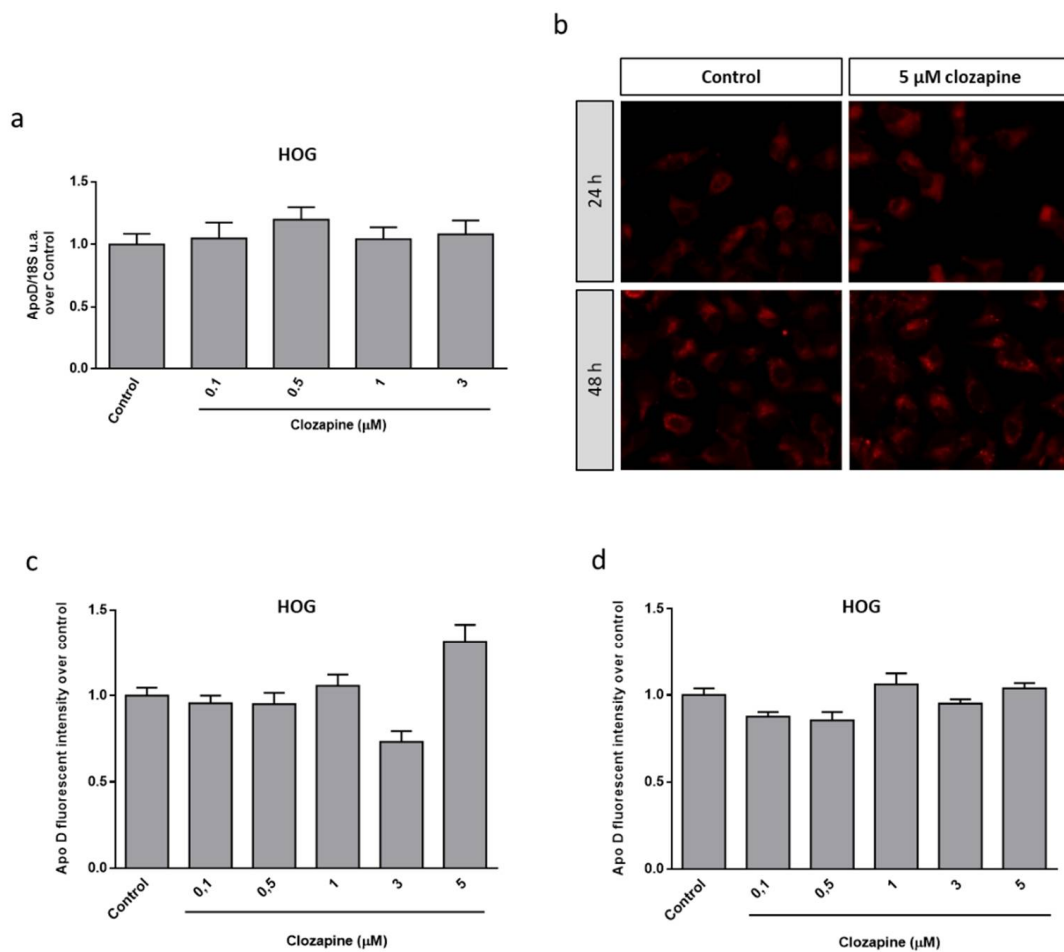


Figure 4. Relative Apo D gene expression in HOG cells treated or not with 5 μM of CLO during 24 h. Data represent the quotient between the gene and the expression of the housekeeping gene 18S rRNA. Bars represent the mean \pm SEM of all measurements ($n = 6\text{--}8$) (a). Representative fluorescence microscopy images of Apo D expression in HOG cells treated or not with 3 μM of CLO during 24 and 48 h. 40 \times magnification (b). Densitometric quantification of Apo D immunocytochemical signal after 24 (c) and 48 h (d) of treatment with increasing concentrations of CLO (0.1–5 μM) in HOG cells ($n = 6$). Bars represent mean density per cell \pm SEM (over control) in a 40 \times field.

Similar results, but with some nuances, were obtained in the neuroblastoma cell line. In fact, immunocytochemical assays revealed that CLO induced changes in Apo D expression in SH-SY5Y cells but only at the highest concentration (5 μM), at 24 and 48 h of treatment, as observed in the images (Figure 6a) and the immunocytochemical quantification (Figure 6b,c). When CLO was added 24 h before 500 μM of CPZ the Apo D immunosignal increased from 1.5 to 2-fold (compared to control) in the concentrations of the antipsychotic drug associated with the neuroprotective effects (Figure 7a,b). Interestingly, the treatment with 5 μM of CLO, which almost doubled Apo D levels in SH-SY5Y cells (Figure 7), was unable to prevent the cytotoxic effect of CPZ (Figure 3b).

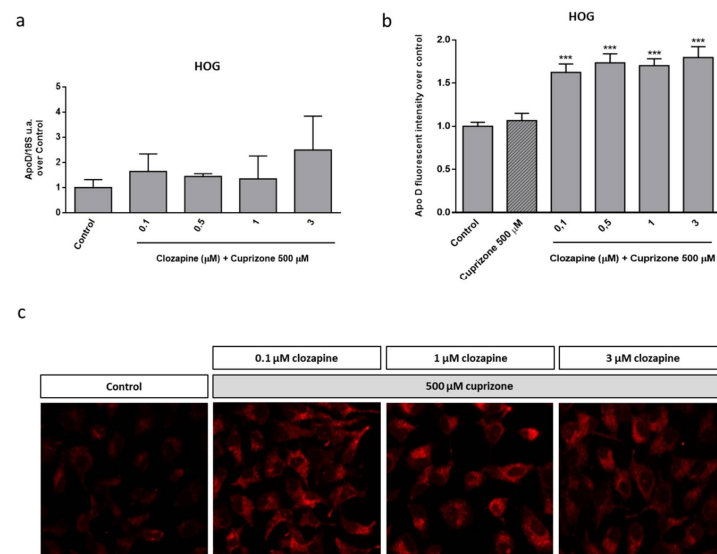


Figure 5. Relative Apo D gene expression in HOG cells treated with increasing concentrations of CLO (0.1–3 μM) during 24 h followed by 24 h with 500 μM of CPZ. Data represent the quotient between the gene and the expression of the housekeeping gene 18S rRNA. Bars represent the mean ± SEM of all measurements ($n = 6-8$) (a). Densitometric quantification of Apo D immunocytochemical signal after 24 h of treatment with increasing concentrations of CLO (0.1–3 μM) followed by 24 h with 500 μM of CPZ ($n = 6$). Bars represent mean density per cell in a 40× field ± SEM (over control) (b). Representative fluorescence microscopy images of Apo D expression in HOG cells treated with increasing concentrations of CLO (0.1–3 μM) followed by 24 h with 500 μM of CPZ. 40× magnification (c). Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey’s test. *** $p < 0.001$ compared with control.

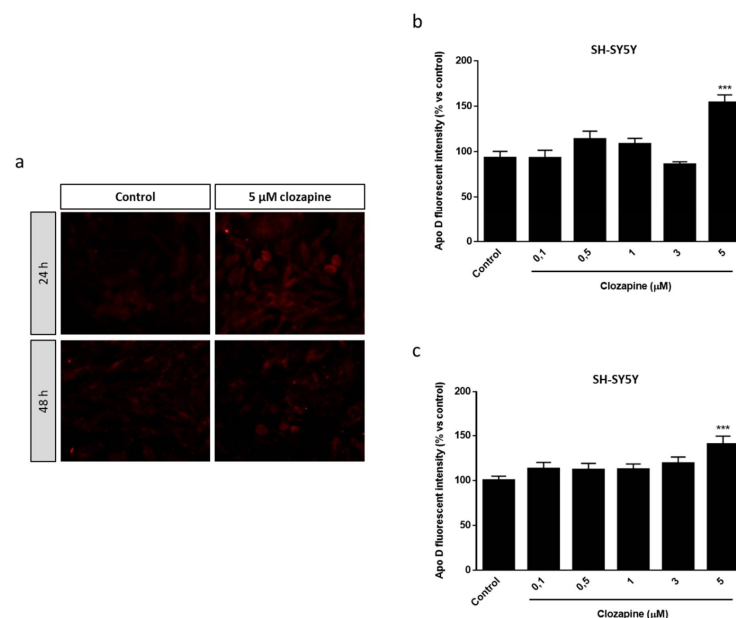


Figure 6. Representative fluorescence microscopy images of Apo D expression in SH-SY5Y cells treated or not with 5 μM of CLO during 24 and 48 h. 40× magnification (a). Densitometric quantification of Apo D immunocytochemical signal after 24 (b) and 48 h (c) of treatment with increasing concentrations of CLO (0.1–5 μM) in SH-SY5Y cells ($n = 6$). Bars represent mean density per cell ± SEM (% versus control) in a 40× field. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey’s test. *** $p < 0.001$ compared with control.

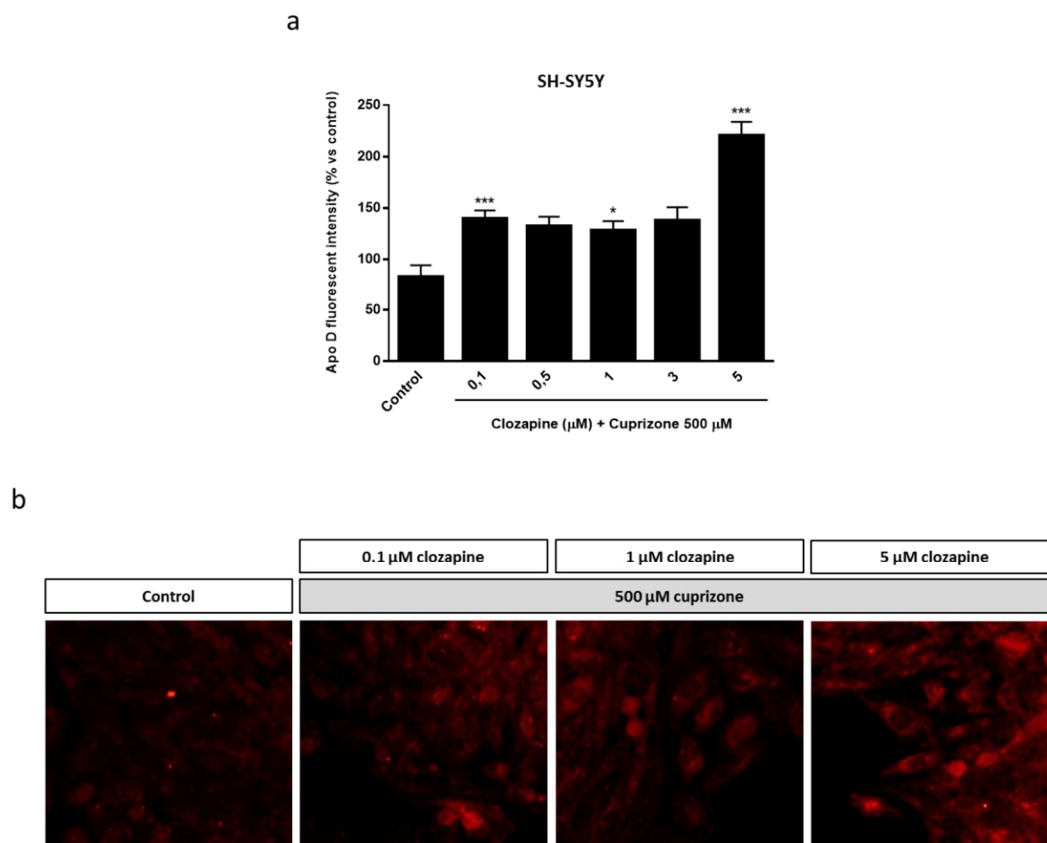


Figure 7. Densitometric quantification of Apo D immunocytochemical signal in SH-SY5Y cells after 24 h of treatment with increasing concentrations of CLO (0.1–5 μM) followed by 24 h with 500 μM of CPZ ($n = 6$). Bars represent mean density per cell in a 40× field \pm SEM (% versus control). Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with control (a). Representative fluorescence microscopy images of Apo D expression in SH-SY5Y cells treated with increasing concentrations of CLO (0.1–5 μM) followed by 24 h with 500 μM of CPZ. 40× magnification (b).

2.4. Neuroprotective Effect of the Exogenously Added hApo D in Oligodendroglial and Neuronal CPZ-Induced Models of MS

The next step to assess the neuroprotective potential of Apo D was to check the impact of the exogenous addition of human Apo D (hApo D), hApo D purified from BCF or human recombinant Apo D (hrApo D), in the CPZ-based cell models of MS. On the one hand, we found that both apolipoproteins induced some improvement in mitochondrial oxidation and, consequently, an increase in OLGs (Figure 8) and neurons (Figure 9) viability under normal conditions. On the other hand, the analysis revealed that treatment with hApo D (5–100 nM) totally prevented the loss of viability caused by the addition of 500 μM CPZ for 24 h in the HOG cells (Figure 8c). Although to a lesser extent, similar results were found in cells pretreated with hrApo D (Figure 8d). Noteworthy, these findings were confirmed in the SH-SY5Y neuroblastoma cells that lack endogenous Apo D expression. Accordingly, both hApo D and hrApo D were able to prevent the toxic effect of CPZ after 24 h of treatment in neuroblastoma cells as well (Figure 9c,d).

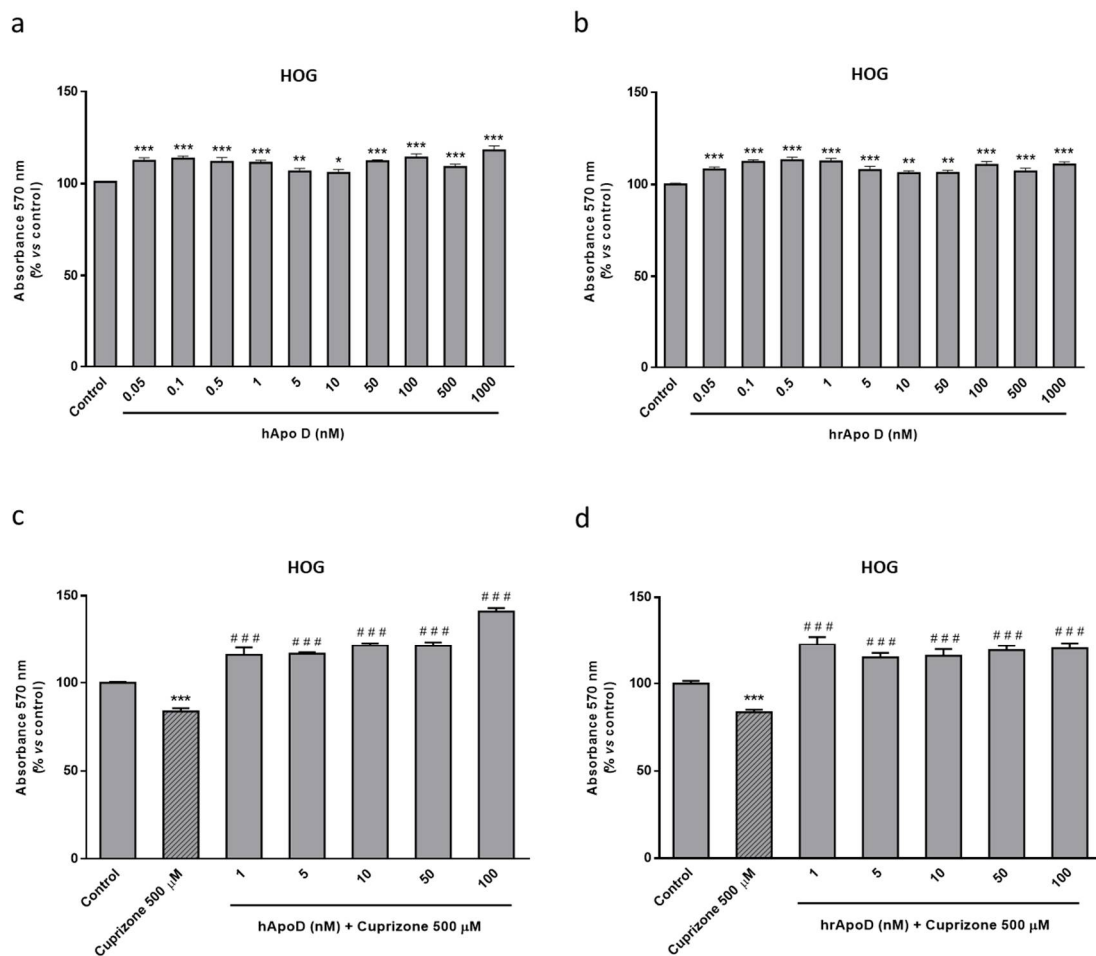


Figure 8. Top panel: MTT assays in HOG cells treated with increasing concentrations (0.05–1000 nM) of hApo D (a) or of hrApo D during 24 h (b). Bottom panel: MTT assays in HOG cells treated with increasing concentrations (1–100 nM) of hApo D (c) or of hrApo D (d) for 24 h followed by 24 h with 500 μ M of CPZ. Cell damage is represented as the percentage of viability versus control. Data are the mean \pm SEM of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control; ### $p < 0.001$ compared with CPZ treatment.

Finally, and in order to test whether Apo D exerts its antioxidant activity intra- or extracellularly by sequestering/blocking CPZ or oxidative stress-induced molecules, we subjected SH-SY5Y to different pharmacological inhibitors of endocytosis. First, we examined the above-described neuroprotective effect of Apo D against CPZ upon perturbation of clathrin-mediated endocytosis (CME), or upon alteration of actin-dependent phagocytosis and micropinocytosis by pretreatment of cells with chlorpromazine (5 μ g/mL) and cytochalasin D (8 μ g/mL), respectively. As shown in Figure 10, these conditions did not seem to influence the effect exerted by hApo D (50–100 nM), even they significantly enhance it, as demonstrated by the MTT assay. However, when cells were pretreated with dynasore (80 μ M), a compound that blocks GTPase activity of dynamin and vesicle scission, hApo D was not able to prevent the significant decrease of about 20–25% in cell viability after 24 h of treatment with 500 μ M CPZ (Figure 10). Nevertheless, it should be noted that dynasore drastically magnifies, in some way, the cytotoxic effect of CPZ.

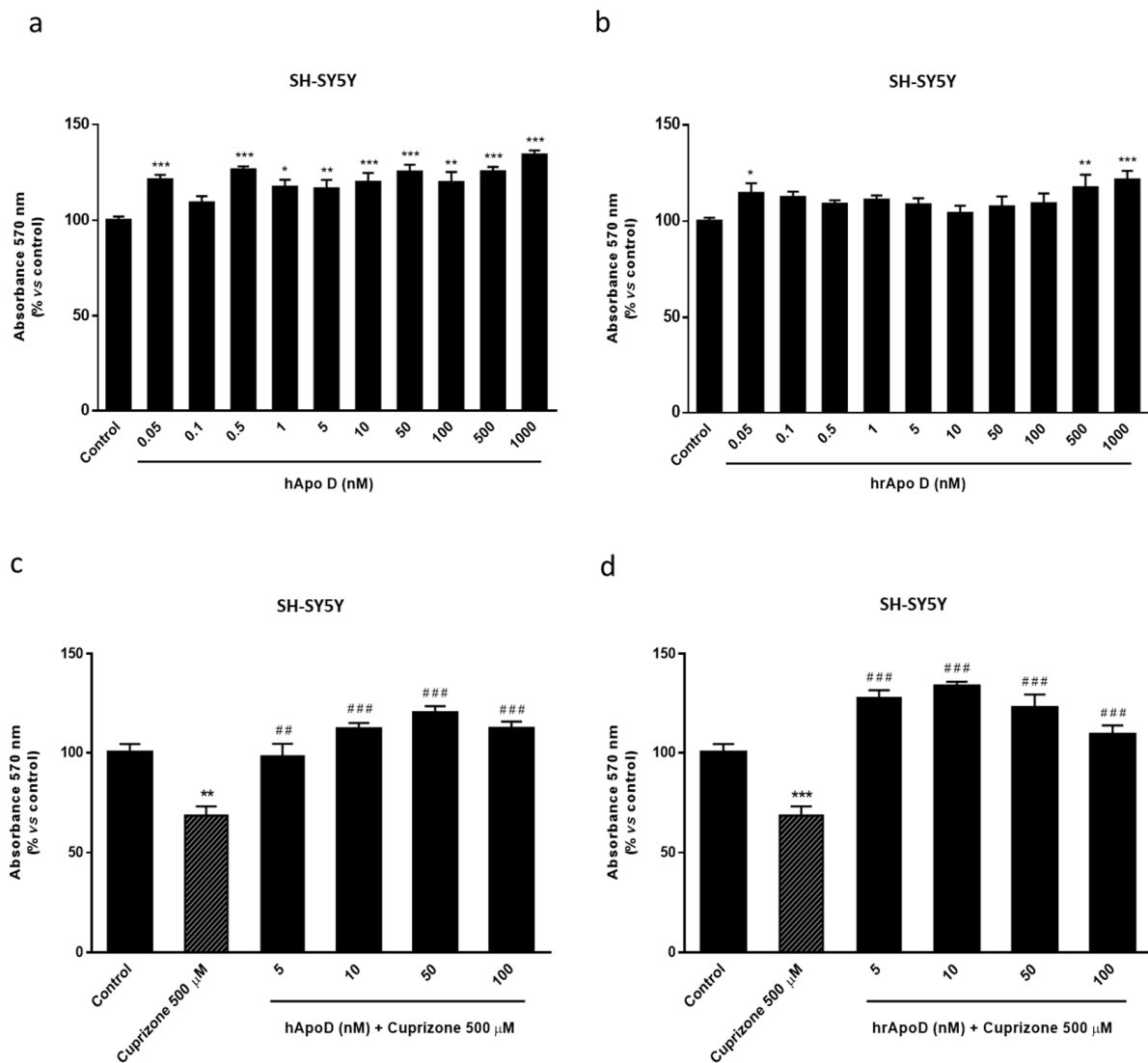


Figure 9. Top panel: MTT assays in SH-SY5Y cells treated with increasing concentrations (0.05–1000 nM) of hApo D (a) or of hrApo D (b) during 24 h. Bottom panel: MTT assays in SH-SY5Y cells treated with increasing concentrations (1–100 nM) of hApo D (c) or of hrApo D (d) for 24 h followed by 24 h with 500 μ M of CPZ. Cell damage is represented as the percentage of viability versus control. Data are the mean \pm SEM of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control; ### $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with CPZ treatment.

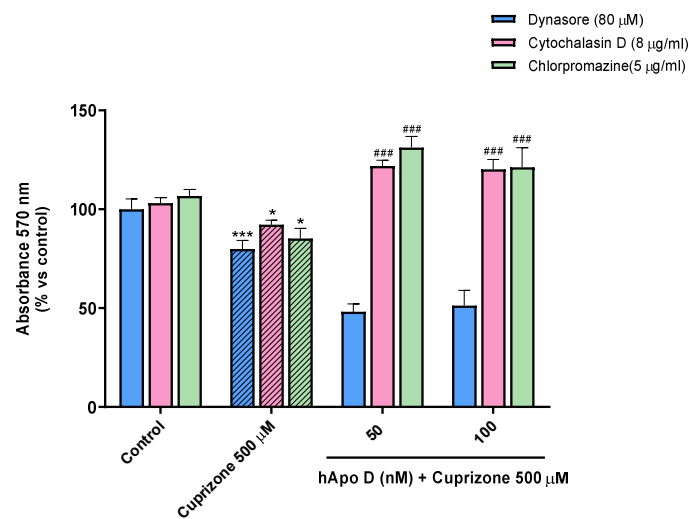


Figure 10. MTT assay in SH-SY5Y cells treated with 8 μg/mL cytochalasin D, 5 μg/mL chlorpromazine hydrochloride, or 80 μM dynasore prior to the addition of increasing concentrations (50–100 nM) of hApo D for 24 h followed by 24 h with 500 μM of CPZ. Cell damage is represented as the percentage of viability versus control. Data are the mean ± SEM of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with control; ### $p < 0.001$ compared with CPZ treatment.

2.5. Neuroprotective Effect of hApo D is not Related to a Decrease in CPZ-Induced ROS Levels

We previously demonstrated that CPZ affects mitochondrial function and aerobic cell respiration in neurons and glial cells which could lead to an increase in intracellular ROS production. In fact, the data summarized in Figure 11 show that treatment of HOG and SH-SY5Y cells with CPZ concentrations of 500 and 1000 μM significantly increased the levels of intracellular ROS. In the MTT assays Apo D totally prevented the loss of viability caused by CPZ so the next step was to measure ROS formation in these conditions. However, we did not find significant differences in the levels of intracellular ROS production between cells pretreated or not with hApo D (Figure 11a,b).

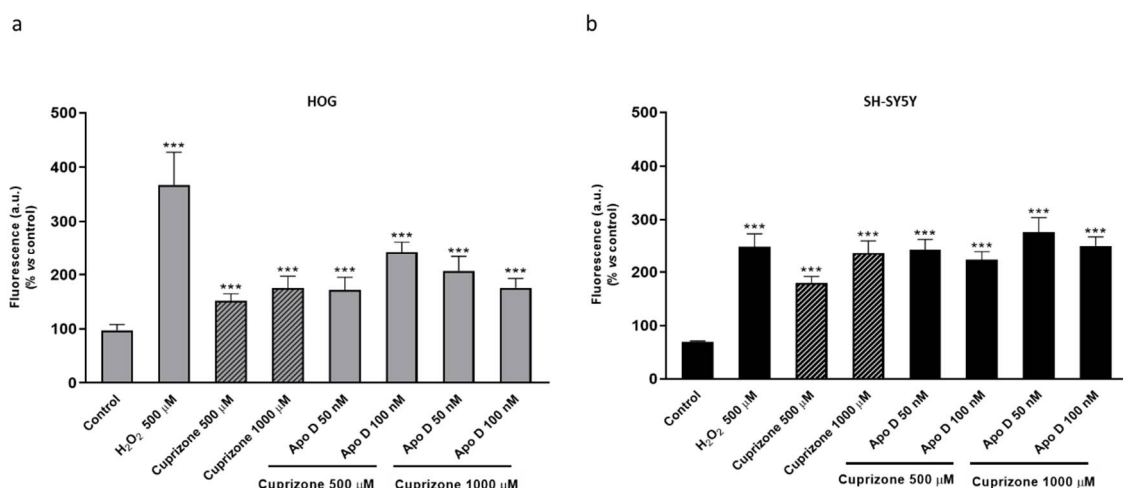


Figure 11. ROS production in HOG (a) and SH-SY5Y cells (b) treated with increasing concentrations (50–100 nM) of hApo D for 24 h followed by 24 h with 500 or 1000 μM of CPZ. Changes in ROS levels, measured with the oxidant-sensitive dye H₂DCFDA, are represented as the percentage of fluorescent DCF production versus control. H₂O₂ 500 μM was used as positive control. Data are the mean ± SEM of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. *** $p < 0.001$ compared with control.

3. Discussion

Thirty years of research have provided significant insights to unravel the function of Apo D, which has helped to elucidate its antioxidant and anti-inflammatory role and a better understanding of the mechanisms whereby this specific apolipoprotein may exert its beneficial effects. To elucidate the function of Apo D requires the development of cellular models that allow studying the actions of this protein in a physiologically relevant but simple context. The data here presented aims to make progress in the knowledge of potential neuroprotective effect of Apo D in MS and other demyelinated diseases by both indirect and direct *in vitro* approximations.

A common trend in multiple pathological and nonpathological conditions of the nervous system, from neural development and aging to diverse neurodegenerative processes such as those observed in MS, is the Apo D upregulation with a seemingly neuroprotective purpose [12,20,51,55,56]. Valuable information has been gained concerning the Apo D expression in MS, i.e., it is increased in the CSF of MS patients and exhibits a characteristic pattern in the brain lesions [49–51]. However, mechanisms involved in the Apo D function in this pathology have been not fully elucidated until now. By taking advantage of the CPZ-induced model of MS, we aimed to analyze the expression of Apo D in HOG cells treated with CPZ. Our results showed that the changes induced by CPZ in Apo D expression are minimal despite the dose and time-dependent cytotoxic damage previously reported for CPZ in the same conditions. Unsurprisingly, a similar CPZ effect was demonstrated in the SH-SY5Y, a cell line that does not efficiently express Apo D at least in nonpathological conditions. In fact, we only found negligible levels of this apolipoprotein in the neuroblastoma cells by immunocytochemistry but not by other techniques, probably due to methodological differences. During the last decades, various authors, including us, have used *in vitro* assays to demonstrate that H₂O₂, amyloid beta-peptide, lipopolysaccharide, paraquat as well as other acute short-term oxidative stressors induce a time- and dose-dependent effect on Apo D expression [55–59]. At least in astrocytes, this effect seems to be regulated by the stress responsive JNK signaling pathway [9]. Here, we found that CPZ by itself does not promote a significant increase in Apo D levels in oligodendrogloma cells. Although the exact mechanism of action of CPZ is not completely understood, we previously demonstrated that the ion chelator impacts on functional state of mitochondria and aerobic cell respiration in neurons and glial cells. Now, we have also shown that these processes are accompanied by a significant increase in intracellular levels of ROS. Interestingly, the consequent compromise of mitochondrial function, cell metabolism, and the increase in oxidative stress are not immediately apparent in *in vivo* CPZ models. In this regard, the toxic/demyelinating effect induced by CPZ in mice does not peak until the third week of treatment [59,60], so it is reasonable to assume that CPZ may trigger the Apo D expression in the longer term.

Neuroprotection by Apo D may be afforded by either an indirect or a direct manner. On the one hand, it has been shown that CLO, an atypical antipsychotic drug used in the treatment of schizophrenia and bipolar syndrome, is able to increase Apo D levels in the brain [53,54]. However, the exact mechanism by which CLO regulates Apo D expression is still unknown. Our findings demonstrated that CLO induces an increase in Apo D synthesis in OLGs and neurons only in the presence of CPZ, at the same time that moderately prevents the loss of viability caused by the toxin, i.e., at neuroprotective doses of CLO. An important aspect, according to the findings obtained in SH-SY5Y cells, is that low concentrations of CLO would be the ones that may exert an Apo D-related neuroprotection against CPZ. In this way, we hypothesize that the great increase in Apo D synthesis induced by the treatment with 5 μ M of CLO, unable to prevent the cytotoxic effect of CPZ, may be a consequence of some cell stress/damage caused by this dose of antipsychotic drug.

Based on our data, it seems that Apo D may contribute to the protective effect of the drug. This idea is sustained by some *in vivo* studies postulating that the effect of CLO in pathological situations would be related to the protective function of Apo D,

thanks to its ability to (i) bind hydrophobic ligands, (ii) minimize their release, (iii) prevent their peroxidative degradation, and (iv) stabilize plasma membranes [53,61]. In particular, some authors propose that mechanism of action of CLO depends on the role of Apo D in arachidonic acid metabolism [6,62]. Therefore, targeting neural cells to increase Apo D and prevent further death would be one promising choice for MS modifying approaches.

On the other hand, this study was designed to test the effect of Apo D when it is added exogenously. The results obtained, using either a purified or a recombinant version of the hApo D, were interesting as these compounds afforded some neuroprotection against the CPZ insult. In fact, our analysis revealed that the exogenous addition of hApo D, purified from BCF or produced in a mammalian expression system, induces an increase in cell viability/proliferation in normal conditions. At the same time, this apolipoprotein also completely prevents the mitochondrial damage and loss of viability caused by the treatment with moderate to high doses of CPZ in oligodendroglial cells and, more importantly, in a neuroblastoma cell line that lacks endogenous Apo D expression [52]. Moreover, and in order to check the possibility that Apo D exerts, in this case, its protective activity in an extracellular way, a chemical perturbation of endocytosis in SH-SY5Y cells was carried out. Our data showed that Apo D neuroprotection is largely independent of CME, phagocytosis and macropinocytosis, but it is significantly reduced by inhibitors of dynamin, i.e., dynamin-dependent mechanisms that are consistent with clathrin-independent endocytosis (CIE) modes (caveolae- and RhoA-dependent) [63]. The above-mentioned results may have several implications. First, these results suggest that OLGs and neurons would be able to capture and internalize hApo D from the medium, triggering an increase in the cell metabolic activity and/or proliferation rate. Apo D uptake by some cells is not an unknown phenomenon. For instance, it is clearly demonstrated that astrocytes and OLGs synthesize and secrete this protein [16,18,64] which is captured by certain neurons in some specific situations [9,64–66]. Although technically challenging, pioneering studies in last years stated that Apo D may enter cells as a clathrin-independent cargo mediated by a specific cell surface receptor, basigin [67]. The recent discovery that Apo D is located inside the endosome-lysosome-autophagosomal compartment [66] and the results here presented support this hypothesis. Second, the effect of exogenous Apo D, once internalized, turns neuroprotective in pathological situations, which is consistent across studies. For example, Najyb et al. (2017) demonstrated that hApo D internalization and accumulation in primary hippocampal neurons were accentuated by kainate treatment. In addition, these authors reported that hApo D could act by decreasing abnormally increased cholesterol levels in damaged neurons [68]. In this line, He et al. (2009) showed that hApo D purified from BCF was able to bind arachidonic acid and cholesterol, attenuating the increase in oxidants and proinflammatory derivatives as F(2)-isoprostanes and 7-ketocholesterol in similar pathological conditions [69]. These neuroprotective and antioxidant roles of Apo D may be closely associated with its capacity of reducing radical-propagating lipid hydroperoxides by three methionine (Met) residues (Met49, Met93, and Met157), highly conserved in mammals [70]. Alternatively, Apo D has an extra cysteine, Cys116, with a thiol group that can be implicated in a direct antioxidant activity [70,71]. Despite this, and according with our findings, the protective mechanism of Apo D against oxidative damage induced by CPZ may directly target mitochondrial function but would not act through the production levels of ROS.

Noteworthy, although Apo D has been generally described as a monomeric protein [4,72], it dimerizes when reducing peroxidized lipids [7,15]. Thus, small-angle X-ray scattering analysis revealed that this apolipoprotein is mainly present as a tetramer in BCF or an oligomer in CSF [15]. As a general rule, heteromers are currently considered as novel molecular entities with new ligand and signaling characteristics, and probably different antioxidant properties which could explain the greater neuroprotective effect of hApo D, compared with hrApo D, demonstrated here.

In summary, valuable information has been gained in this work concerning neuroprotective effect of Apo D against CPZ, a neurotoxin used to produce models of MS. Although

the development of simpler models, as the ones shown in this work, constitutes a way to provide reliable answers in some pathological situations, these results must be validated on more physiological models such as primary cultures in order to check whether increasing either endogenously and/or exogenously the levels of Apo D could be a feasible intervention as part of medical therapy in neurodegenerative diseases. In this regard, the origin and the native structure of this protein must be taken into account in order to design the most effective approach.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines

HOG cell line, established from a surgically removed human oligodendroglioma by Dr. A. T. Campagnoni (University of California, UCLA, Berkeley, CA, USA) [73] was kindly provided by Dr. J. A. López-Guerrero (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain) [74]. Cells were grown in DMEM, low glucose, pyruvate, HEPES (22320-022, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 100 units/mL penicillin/streptomycin (17-602E, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 10% (*v/v*) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (10270-106, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was obtained from Sigma (ref 94030304, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and was grown in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (61965-059, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 100 units/mL penicillin/streptomycin (17-602E, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), 1% nonessential amino acids (11140-035, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 10% (*v/v*) heat inactivated FBS (10270-106, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and were passaged when they were 80–90% confluent, i.e., approximately twice a week for no more than 20 passages.

4.2. Human Apo D Purification

Human Apo D (hApo D) was purified from BCF samples provide by the Pathology Unit of the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). First, a cell fractionation was performed by differential centrifugation. Then, Amicon[®] Ultra-15, 100 kDa, centrifugal filter units (Z740211, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used. The solution containing the protein was flow through two consecutively ion-exchange chromatographic columns (HiTrap[®] Q Fast Flow, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) with 25 mM Tris pH 8.0, followed by a size-exclusion chromatography (HiLoad[®] 16/60 Superdex[®] 200 prep grade, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) in 50 mM Tris pH 8.0, 75 mM NaCl. Elution fractions with the protein of interest can be further concentrated using an appropriate 30 kDa cut-off Amicon[®] centrifuge filter (Z717185, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The presence of hApo D in these fractions was checked by Western blot, the amount of this apolipoprotein (concentration in the fraction) was quantified and its functionality was tested.

4.3. Cell Treatments

For CPZ treatment, a stock solution of 30 mM CPZ (C9012-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared freshly. For this, CPZ powder was dissolved in 50% ethanol/medium and shaken at 225 rpm at 60 °C for 15–20 min until its complete dissolution. Working solutions were prepared by diluting the stock in the specific medium for each cell type in a series of sequential solutions to reduce the ethanol concentration [72,73]. After 24–48 h of plating (30–40% cellular confluence), cellular toxicity was induced by the addition of CPZ in growing concentrations (50–1000 µM; see corresponding figure legends), for 24, 48, or 72 h. In order to prove that results are only attributable to CPZ not ethanol, the vehicle effect was also tested for each sequential solution in the cell models. As it can be observed in the graphs (Figure A3), we demonstrated that even the highest concentration of ethanol used to dissolve CPZ did not negatively affect, in a statistically significant way, cell viability of HOG and SH-SY5Y cells after 24 and 48 h of treatment.

To investigate the effect of the antipsychotic drug CLO (C6305-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the Apo D expression, cells were treated with different concentrations (0.1–5 nM; see corresponding figure legends) for 24 h, before fresh addition of CPZ. For the exogenous addition of Apo D, hApo D purified from BCF or hrApo D derived from human cells (P05090, Novoprotein, Summit, NJ, USA) were added (0.05–1000 nM; see corresponding figure legends) to cell cultures 24 h prior to CPZ.

For inhibition of endocytic mechanisms, SH-SY5Y cells were treated with different chemical inhibitors, cytochalasin D (8 µg/mL; C2618, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), chlorpromazine hydrochloride (5 µg/mL; C8138, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and dynasore (80 µM; 324410, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in serum-free medium supplemented with 30 mM HEPES on the day of the experiment. The final DMSO concentration added was kept <0.1%. Cells were washed in serum-free medium and treated with the respective inhibitors (see corresponding figure legends) for 30 min before Apo D addition. H₂O₂ was used as positive control.

Drug concentrations and times of treatments were based on the bibliography and on our previous experience [75,76].

4.4. MTT Assay

Cell viability was studied by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay, a method based on the activity of mitochondrial NAD dependent oxidoreductases as indicator of the functional state of mitochondria. For this, 3000–5000 cells/well were seeded in 96-well plates and grown in 100 µL/well of complete medium. Once treatments were completed, 10 µL of MTT (5mg/mL in phosphate buffered saline (PBS; 10010-023, Gibco, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK)) (M5655; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to each well. Four hours later, 100 µL of lysis solution (20% sodium dodecyl sulfate (SDS); 50% dimethylformamide; pH 4) were added to the culture and incubated overnight at 37 °C. Absorbance at 570 nm was measured using a Multiskan EX Microplate Reader (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Values from blank wells, containing only medium, were subtracted from the values of the samples. Cell viability was expressed as the percentage of the controls.

4.5. Determination of ROS

The intracellular level of ROS, as an important biomarker for oxidative stress, was estimated with the dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA; D399, Molecular Probes, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), a nonpolar compound that easily penetrates into the cell where it is hydrolyzed to the nonpermeant H₂DCF. This nonfluorescent compound becomes oxidized by various ROS to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). For determination, 3000–5000 cells/well were seeded in 96-well plates and grown in 100 µL/well of complete medium. Once treatments were completed, medium was removed and prewarmed PBS containing the probe (final working concentration of 10 µM dye) was added to the cells. After incubation for 60 min at 37 °C, the dye was removed and cells were returned to prewarmed growth medium. Then, fluorescence was measured in a microplate fluorimeter FLX-800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm.

4.6. Immunocytochemistry

Cells were seeded over glass coverslips (10 mm diameter) in 6-well plates at a density of 50,000 cells/well in a final volume of 2 mL of medium. Once the treatments were concluded, cells were washed three times with PBS and fixed in bouin solution for 15 min. After fixation, cells were washed three times and then permeabilized by incubation with 1% Triton X-100 at room temperature for 15 min. Nonspecific binding was blocked by incubation with bovine serum 30 min at room temperature. Incubation with anti-human Apo D antibody 1:2000 (provided by Dr. Carlos López-Otín, department of Biochemistry

and Molecular Biology, University of Oviedo; see [58,77,78]) was carried out overnight in a humid chamber at 4 °C. After three washes in PBS, coverslips were incubated 30 min at room temperature using a biotinylated horse universal antibody (Universal quick, PK-8800, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) diluted 1:50. After that, cells were incubated with streptavidin Alexa Fluor® 550 conjugate (1:500; S2138, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). Finally, cells were washed in distilled water, dehydrated, cleared in eucalyptol and mounted with Fluoromount. The fluorescence was visualized in a Nikon Eclipse E400 microscope equipped with a Nikon G2-A and recorded by a digital camera (Nikon DN-100). The resulting immunocytochemical signal was selected with Photoshop and quantified with ImageJ 1.57 software (NIH, Bethesda, MD, USA) [79]. Images were acquired under the same conditions of illumination, diaphragm and condenser adjustments, exposure time, and background correction. For control purposes, representative cell cultures were processed in the same way with a nonimmune serum or with specifically absorbed sera instead of the primary antibody. Under these conditions no specific immunostaining was observed.

4.7. RNA Purification

Cells were recovered from culture dishes using scrapers and TRIzol (15596018, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), then total RNA was purified using the RNeasy mini-kit (74104, Qiagen, Valencia, CA, USA) with a DNase digestion step performed (79204, Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

4.8. Quantitative Real-Time PCR

Random primers and the SuperScript III kit (11752050, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) were used to reverse-transcribe 1 µg of total RNA into first-strand cDNA in a total volume of 20 µL according to the manufacturer's instructions. SYBR Green PCR Master Mix (a25778, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) was mixed with cDNA for quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using 0.3 µM forward and reverse oligonucleotide primers (Table 1). 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) was used for quantitative measure of gene expression. Cycling conditions were an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s 60 °C for 1 min. At the end, a dissociation curve was implemented from 60 to 95 °C to validate amplicon specificity. Relative quantification of gene expression was calculated by interpolation into a standard curve. All values were divided by the expression of the house keeping gene 18S rRNA.

Table 1. Primers used for qRT-PCR in this study.

Oligonucleotide	Sequence
R2-ApoD-F	TGCATCCAGGCCAACTACTC
R2-ApoD-Rev	GGGTGGCTTCACCTTCGATT
18S-Fw	ATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCG
18S-Rev	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG

The annealing temperature was 60 °C for all primers. 18S rRNA was used as a housekeeping gene.

4.9. Data Analysis

The data in the graphs are presented as the mean ± S.E.M, from at least five independent experiments. The normality of population and the homogeneity of variance were evaluated by the test of Kolmogorov–Smirnov with the correction of Lilliefors and the test of Levene, respectively. Then one- or two-way ANOVA tests followed by post hoc Tukey's test for multiple comparisons were used to compare the values. Statistical analysis was carried out with SPSS 18.0 software (IBM, Armonk, NY, USA). Significant differences were considered when $p < 0.05$.

Author Contributions: Conceptualization was agreed by J.T., I.M.L. and A.N., who also participated in the design of the project and analyzed the results. E.M.-P., N.R.-S. and E.G.-Á. performed the majority of the experiments; E.d.V. performed some of the immunocytochemistry assays and participated in data analysis; R.P. performed the qRT-PCR, participated in data analysis and in providing data for final figures; E.M.-P. and J.T. did many of the imaging assays in the confocal microscope, took images and participated in data analysis; E.M.-P., A.N. and I.M.L. wrote the first draft of the manuscript that was further edited by all coauthors, who agreed with submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto de Salud Carlos III through the project (PI15/00601) (co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund “Investing in your future”). This work was also funded in part by a grant (PI19/01805) from the Instituto de Salud Carlos III, co-funded by European Regional Development Fund (ERDF) “A way to build Europe” and by Fundación Rioja Salud. I.M.L. is supported by a Miguel Servet contract (CPII20/00029) from the Instituto de Salud Carlos III, co-funded by European Social fund (ESF) “Investing in your future”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AD	Alzheimer’s disease
Apo D	Apolipoprotein D
BBB	Blood–brain barrier
BCF	Breast cyst fluid
CIE	Clathrin-independent endocytosis
CLO	Clozapine
CME	Clathrin-mediated endocytosis
CNS	Central nervous system
CPZ	Cuprizone
CSF	Cerebrospinal fluid
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal bovine serum
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
hApo D	Human Apo D
HDL	High-density plasma lipoproteins
hrApo D	Human recombinant Apo D
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
MS	Multiple sclerosis
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OLGs	Oligodendrocytes
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Parkinson’s disease
PNS	Peripheral nervous system
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
UV	Ultraviolet

Appendix A

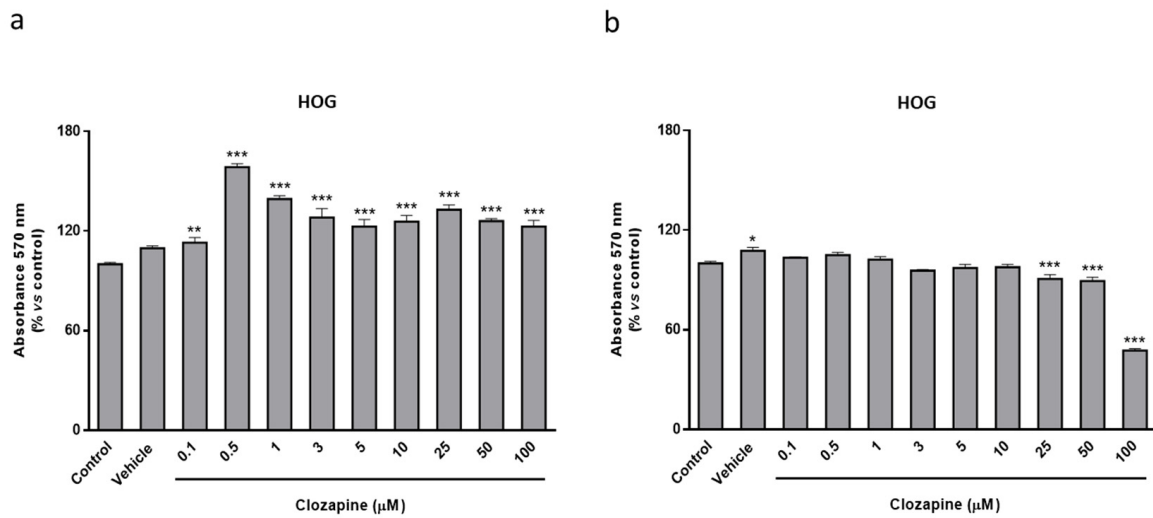


Figure A1. MTT assay in HOG cells treated with increasing concentrations of CLO (0.1–100 µM) during 24 h (a) and 48 h (b). Cell damage is represented as the percentage of viability versus control. Data are the mean \pm SEM of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control.

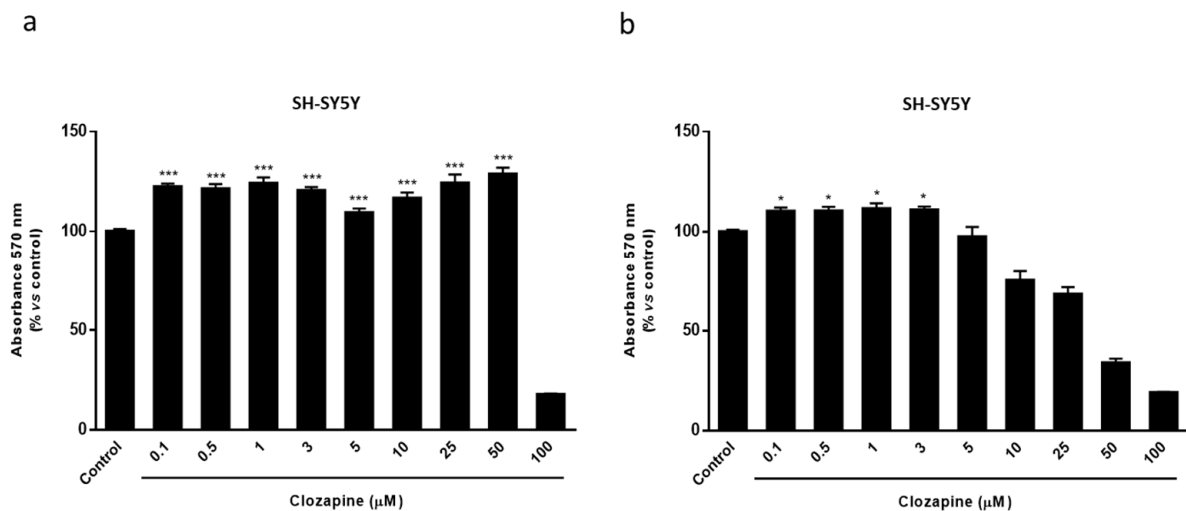


Figure A2. MTT assay in SH-SY5Y cells treated with increasing concentrations of CLO (0.1–100 µM) during 24 h (a) and 48 h (b). Cell damage is represented as the percentage of viability versus control. Data are the mean \pm SEM of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control.

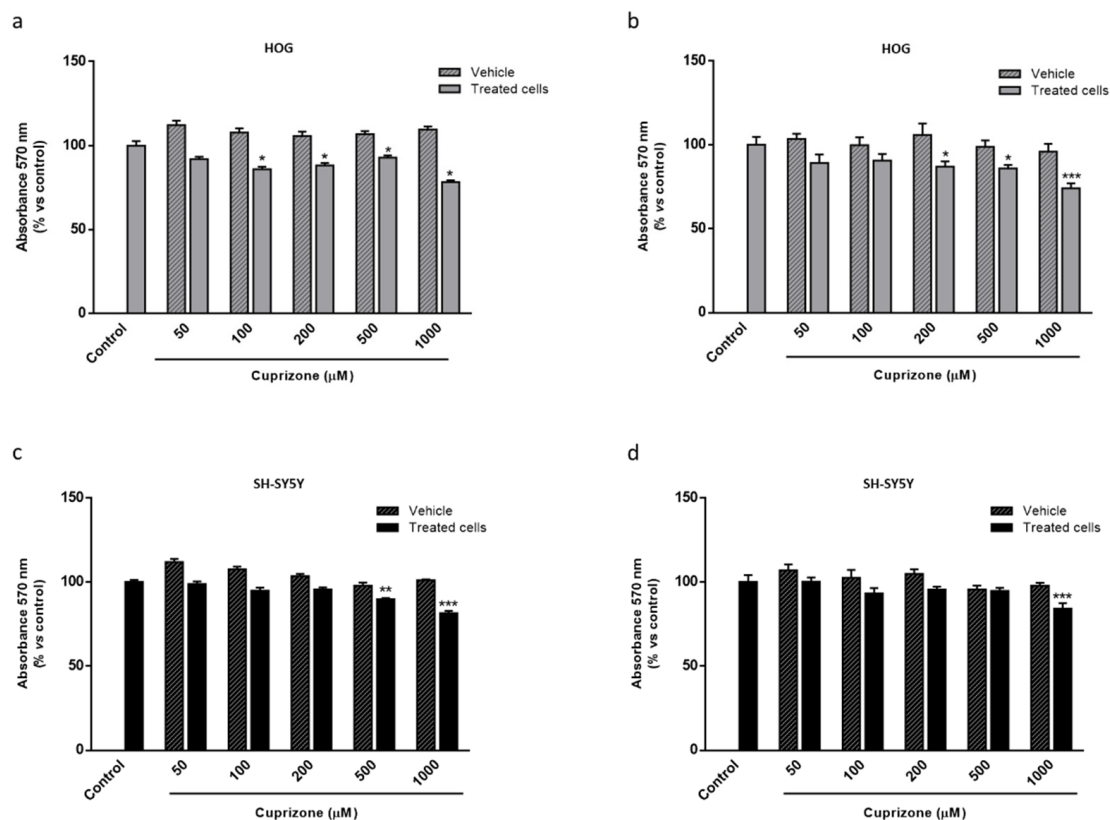


Figure A3. MTT assay in HOG (a,b) and SH-SY5Y (c,d) cells treated with increasing concentrations of CPZ (50–1000 μM) and their respective vehicles for 24 h (a,c) or 48 h (b,d). Cell damage is represented as the percentage of viability versus control. Data are the mean \pm S.E.M of five independent experiments. Significant differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control.

References

- Rassart, E.; Bedirian, A.; Do Carmo, S.; Guinard, O.; Sirois, J.; Terrisse, L.; Milne, R. Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1482*, 185–198. [[CrossRef](#)]
- Rassart, E.; Desmarais, F.; Najyb, O.; Bergeron, K.F.; Mounier, C. Apolipoprotein D. *Gene* **2020**, *756*, 144874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fernández-Ruiz, J.; Gómez-Ruiz, M.; García, C.; Hernández, M.; Ramos, J.A. Modeling Neurodegenerative Disorders for Developing Cannabinoid-Based Neuroprotective Therapies. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 593, pp. 175–198.
- Nasreen, A.; Vogt, M.; Kim, H.J.; Eichinger, A.; Skerra, A. Solubility engineering and crystallization of human apolipoprotein D. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 190–199. [[CrossRef](#)]
- Eichinger, A.; Nasreen, A.; Kim, H.J.; Skerra, A. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31068–31075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thomas, E.A.; George, R.C.; Gregor Sutcliffe, J. Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: Implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2003**, *69*, 421–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bhatia, S.; Knoch, B.; Wong, J.; Kim, W.S.; Else, P.L.; Oakley, A.J.; Garner, B. Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: Implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. *Biochem. J.* **2012**, *442*, 713–721. [[CrossRef](#)]
- Waldner, A.; Dassati, S.; Redl, B.; Smania, N.; Gandolfi, M. Apolipoprotein D Concentration in Human Plasma during Aging and in Parkinson's Disease: A Cross-Sectional Study. *Parkinsons. Dis.* **2018**, *2018*. [[CrossRef](#)]
- Bajo-Grañeras, R.; Ganfornina, M.D.; Martín-Tejedor, E.; Sanchez, D. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia* **2011**, *59*, 1551–1566. [[CrossRef](#)]
- Do Carmo, S.; Levros, L.C.; Rassart, E. Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2007**, *1773*, 954–969. [[CrossRef](#)]
- Ganfornina, M.D.; Do Carmo, S.; Lora, J.M.; Torres-Schumann, S.; Vogel, M.; Allhorn, M.; González, C.; Bastiani, M.J.; Rassart, E.; Sanchez, D. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* **2008**, *7*, 506–515. [[CrossRef](#)]

12. Sanchez, D.; Bajo-Grañeras, R.; Del Caño-Espinel, M.; Garcia-Centeno, R.; Garcia-Mateo, N.; Pascua-Maestro, R.; Ganfornina, M.D. Aging without apolipoprotein d: Molecular and cellular modifications in the hippocampus and cortex. *Exp. Gerontol.* **2015**, *67*, 19–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, H.; Ruberu, K.; Karl, T.; Garner, B. Cerebral apolipoprotein-D Is hypoglycosylated compared to peripheral tissues and is variably expressed in mouse and human brain regions. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Scheen, L.; Brandt, L.; Bodén, R.; Tiihonen, J.; Andersen, M.; Kieler, H.; Reutfors, J. Predictors for initiation of pharmacological prophylaxis in patients with newly diagnosed bipolar disorder-A nationwide cohort study. *J. Affect. Disord.* **2015**, *172*, 204–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kielkopf, C.S.; Low, J.K.K.; Mok, Y.-F.; Bhatia, S.; Palasovski, T.; Oakley, A.J.; Whitten, A.E.; Garner, B.; Brown, S.H.J. Identification of a novel tetrameric structure for human apolipoprotein-D. *J. Struct. Biol.* **2018**, *203*, 205–218. [[CrossRef](#)]
16. Navarro, A.; Tolivia, J.; Astudillo, A.; Del Valle, E. Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neurosci. Lett.* **1998**, *254*, 17–20. [[CrossRef](#)]
17. Navarro, A.; Del Valle, E.; Juárez, A.; Martínez, E.; Ordóñez, C.; Astudillo, A.; Tolivia, J. Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *Age (Omaha)* **2010**, *32*, 85–96. [[CrossRef](#)]
18. Hu, C.Y.; Ong, W.Y.; Sundaram, R.K.; Chan, C.; Patel, S.C. Immunocytochemical localization of apolipoprotein D in oligodendrocyte precursor-like cells, perivascular cells, and pericytes in the human cerebral cortex. *J. Neurocytol.* **2001**, *30*, 209–218. [[CrossRef](#)]
19. García-Mateo, N.; Pascua-Maestro, R.; Pérez-Castellanos, A.; Lillo, C.; Sanchez, D.; Ganfornina, M.D. Myelin extracellular leaflet compaction requires apolipoprotein D membrane management to optimize lysosomal-dependent recycling and glycocalyx removal. *Glia* **2018**, *66*, 670–687. [[CrossRef](#)]
20. Bhatia, S.; Kim, W.S.; Shepherd, C.E.; Halliday, G.M. Apolipoprotein D Upregulation in Alzheimer’s Disease but Not Frontotemporal Dementia. *J. Mol. Neurosci.* **2018**, *67*, 125. [[CrossRef](#)]
21. Muffat, J.; Walker, D.W. Apolipoprotein D: An overview of its role in aging and age-related diseases. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 269–273. [[CrossRef](#)]
22. Dassati, S.; Waldner, A.; Schweigreiter, R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1632–1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Feigin, V.L.; Nichols, E.; Alam, T.; Bannick, M.S.; Beghi, E.; Blake, N.; Culpepper, W.J.; Dorsey, E.R.; Elbaz, A.; Ellenbogen, R.G.; et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
24. Noseworthy, J.H.; Lucchinetti, C.; Rodriguez, M.; Weinshenker, B.G. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 938–952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gelfand, J.M. Multiple sclerosis: Diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 122, pp. 269–290.
26. Correale, J.; Gaitán, M.I.; Ysrraelit, M.C.; Fiol, M.P. Progressive multiple sclerosis: From pathogenic mechanisms to treatment. *Brain* **2017**, *140*, 527–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Haines, J.D.; Inglese, M.; Casaccia, P. Axonal damage in multiple sclerosis. *Mt. Sinai J. Med.* **2011**, *78*, 231–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. McLaughlin, J.E. Practical Review of Neuropathology.: Gregory N, Fuller J, Goodman C. 2001, Lippincott Williams & Wilkins, \$69.95. ISBN 0 7817 2778 2. *J. Clin. Pathol.* **2011**, *55*, 158. [[CrossRef](#)]
29. Bö, L.; Geurts, J.J.G.; Mörk, S.J.; Van Der Valk, P. Grey matter pathology in multiple sclerosis. In *Acta Neurologica Scandinavica*; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2006; Volume 113, pp. 48–50.
30. Zindler, E.; Zipp, F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2010**, *24*, 551–562. [[CrossRef](#)]
31. McQualter, J.L.; Bernard, C.C.A. Multiple sclerosis: A battle between destruction and repair. *J. Neurochem.* **2007**, *100*, 295–306. [[CrossRef](#)]
32. McGuire, C.; Beyaert, R.; van Loo, G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci.* **2011**, *34*, 619–628. [[CrossRef](#)]
33. Disanto, G.; Morahan, J.M.; Barnett, M.H.; Giovannoni, G.; Ramagopalan, S.V. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* **2012**, *78*, 823–832. [[CrossRef](#)]
34. Ohl, K.; Tenbrock, K.; Kipp, M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp. Neurol.* **2016**, *277*, 58–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Dendrou, C.A.; Fugger, L.; Friese, M.A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 545–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Reich, D.S.; Lucchinetti, C.F.; Calabresi, P.A. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 169–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Stys, P.K.; Zamponi, G.W.; Van Minnen, J.; Geurts, J.J.G. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 507–514. [[CrossRef](#)]
38. Caprariello, A.V.; Rogers, J.A.; Morgan, M.L.; Hoghooghi, V.; Plemel, J.R.; Koebel, A.; Tsutsui, S.; Dunn, J.F.; Kotra, L.P.; Ousman, S.S.; et al. Biochemically altered myelin triggers autoimmune demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 5528–5533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Titus, H.E.; Chen, Y.; Podojil, J.R.; Robinson, A.P.; Balabanov, R.; Popko, B.; Miller, S.D. Pre-clinical and Clinical Implications of “Inside-Out” vs. “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ontaneda, D.; Hyland, M.; Cohen, J.A. Multiple Sclerosis: New Insights in Pathogenesis and Novel Therapeutics. *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 389–404. [[CrossRef](#)]
41. Leibowitz, S.M.; Yan, J. NF- κ B pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and the therapeutic implications. *Front. Mol. Neurosci.* **2016**, *9*, 84. [[CrossRef](#)]
42. Vandembark, A.A.; Culbertson, N.E.; Bartholomew, R.M.; Huan, J.; Agotsch, M.; LaTocha, D.; Yadav, V.; Mass, M.; Whitham, R.; Lovera, J.; et al. Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis. *Immunology* **2008**, *123*, 66–78. [[CrossRef](#)]
43. Goldberg, P.; Fleming, M.C.; Picard, E.H. Multiple sclerosis: Decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Med. Hypotheses* **1986**, *21*, 193–200. [[CrossRef](#)]
44. Kappos, L.; Bar-Or, A.; Cree, B.A.C.; Fox, R.J.; Giovannoni, G.; Gold, R.; Vermersch, P.; Arnold, D.L.; Arnould, S.; Scherz, T.; et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): A double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet* **2018**, *391*, 1263–1273. [[CrossRef](#)]
45. Denic, A.; Johnson, A.J.; Bieber, A.J.; Warrington, A.E.; Rodriguez, M.; Pirko, I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* **2011**, *18*, 21–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Vega-Riquer, J.M.; Mendez-Victoriano, G.; Morales-Luckie, R.A.; Gonzalez-Perez, O. Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Curr. Neuropharmacol.* **2019**, *17*, 129–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Nyamoya, S.; Schweiger, F.; Kipp, M.; Hochstrasser, T. Cuprizone as a model of myelin and axonal damage. *Drug Discov. Today Dis. Model.* **2017**, *25–26*, 63–68. [[CrossRef](#)]
48. Procaccini, C.; De Rosa, V.; Pucino, V.; Formisano, L.; Matarese, G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *759*, 182–191. [[CrossRef](#)]
49. Stoop, M.P.; Singh, V.; Dekker, L.J.; Titulaer, M.K.; Stingl, C.; Burgers, P.C.; Sillevius Smitt, P.A.E.; Hintzen, R.Q.; Luider, T.M. Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12442. [[CrossRef](#)]
50. Reindl, M.; Knipping, G.; Wicher, I.; Dilitz, E.; Egg, R.; Deisenhammer, F.; Berger, T. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2001**, *119*, 327–332. [[CrossRef](#)]
51. Navarro, A.; Rioseras, B.; Del Valle, E.; Martínez-Pinilla, E.; Astudillo, A.; Tolivia, J. Expression Pattern of Myelin-Related Apolipoprotein D in Human Multiple Sclerosis Lesions. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*, 254. [[CrossRef](#)]
52. Pascua-Maestro, R.; González, E.; Lillo, C.; Ganfornina, M.D.; Falcón-Pérez, J.M.; Sanchez, D. Extracellular vesicles secreted by astroglial cells transport apolipoprotein D to neurons and mediate neuronal survival upon oxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *12*, 526. [[CrossRef](#)]
53. Thomas, E.A.; Danielson, P.E.; Austin Nelson, P.; Pribyl, T.M.; Hilbush, B.S.; Hasel, K.W.; Gregor Sutcliffe, J. Clozapine increases apolipoprotein D expression in rodent brain: Towards a mechanism for neuroleptic pharmacotherapy. *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 789–796. [[CrossRef](#)]
54. Mahadik, S.P.; Khan, M.M.; Evans, D.R.; Parikh, V.V. Elevated plasma level of apolipoprotein D in schizophrenia and its treatment and outcome. *Schizophr. Res.* **2002**, *58*, 55–62. [[CrossRef](#)]
55. Do Carmo, S.; Séguin, D.; Milne, R.; Rassart, E. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5514–5523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sarjeant, J.M.; Lawrie, A.; Kinnear, C.; Yablonsky, S.; Leung, W.; Massaelli, H.; Prichett, W.; Veinot, J.P.; Rassart, E.; Rabinovitch, M. Apolipoprotein D Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-BB-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferated by Preventing Translocation of Phosphorylated Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2 to the Nucleus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 2172–2177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Martínez, E.; Navarro, A.; Ordóñez, C.; Del Valle, E.; Tolivia, J. Amyloid- β_{25-35} induces apolipoprotein D synthesis and growth arrest in HT22 hippocampal cells. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *30*, 233–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Martínez, E.; Navarro, A.; Ordóñez, C.; Del Valle, E.; Tolivia, J. Oxidative stress induces apolipoprotein d overexpression in hippocampus during aging and alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *36*, 129–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Pasquini, L.A.; Calatayud, C.A.; Bertone Uña, A.L.; Millet, V.; Pasquini, J.M.; Soto, E.F. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 279–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Benetti, F.; Ventura, M.; Salmini, B.; Ceola, S.; Carbonera, D.; Mammi, S.; Zitolo, A.; D'Angelo, P.; Urso, E.; Maffia, M.; et al. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *Neurotoxicology* **2010**, *31*, 509–517. [[CrossRef](#)]
61. Yao, J.K.; Thomas, E.A.; Reddy, R.D.; Keshavan, M.S. Association of plasma apolipoproteins D with RBC membrane arachidonic acid levels in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **2005**, *72*, 259–266. [[CrossRef](#)]
62. Thomas, E.A.; Yao, J.K. Clozapine specifically alters the arachidonic acid pathway in mice lacking apolipoprotein D. *Schizophr. Res.* **2007**, *89*, 147–153. [[CrossRef](#)]
63. Dutta, D.; Donaldson, J.G. Search for inhibitors of endocytosis. *Cell. Logist.* **2012**, *2*, 203–208. [[CrossRef](#)]

64. Patel, S.C.; Asotra, K.; Patel, Y.C.; McConathy, W.J.; Patel, R.C.; Suresh, S. Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuroreport* **1995**, *6*, 653–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ong, W.Y.; Lau, C.P.; Leong, S.K.; Kumar, U.; Suresh, S.; Patel, S.C. Apolipoprotein d gene expression in the rat brain and light and electron microscopic immunocytochemistry of apolipoprotein D expression in the cerebellum of neonatal, immature and adult rats. *Neuroscience* **1999**, *90*, 913–922. [[CrossRef](#)]
66. Pascua-Maestro, R.; Diez-Hermano, S.; Lillo, C.; Ganfornina, M.D.; 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*, e1006603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Najyb, O.; Brissette, L.; Rassart, E. Apolipoprotein D internalization is a basigin-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 16077–16087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Najyb, O.; Do Carmo, S.; Alikashani, A.; Rassart, E. Apolipoprotein D Overexpression Protects Against Kainate-Induced Neurotoxicity in Mice. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 3948–3963. [[CrossRef](#)]
69. He, X.; Jittiwat, J.; Kim, J.H.; Jenner, A.M.; Farooqui, A.A.; Patel, S.C.; Ong, W.Y. Apolipoprotein D modulates F2-isoprostane and 7-ketocholesterol formation and has a neuroprotective effect on organotypic hippocampal cultures after kainate-induced excitotoxic injury. *Neurosci. Lett.* **2009**, *455*, 183–186. [[CrossRef](#)]
70. Zhang, Y.; Cong, Y.; Wang, S.; Zhang, S. Antioxidant activities of recombinant amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) apolipoprotein D. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 1847–1851. [[CrossRef](#)]
71. Oakley, A.J.; Bhatia, S.; Ecroyd, H.; Garner, B. Molecular dynamics analysis of apolipoprotein-D - lipid hydroperoxide interactions: Mechanism for selective oxidation of Met-93. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34057. [[CrossRef](#)]
72. Åkerstrom, B.; Flower, D.R.; Salier, J.P. Lipocalins: Unity in diversity. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1482*, 1–8. [[CrossRef](#)]
73. Post, G.R.; Dawson, G. Characterization of a cell line derived from a human oligodendrogloma. *Mol. Chem. Neuropathol.* **1992**, *16*, 303–317. [[CrossRef](#)]
74. Bello-Morales, R.; Crespillo, A.J.; García, B.; Dorado, L.Á.; Martín, B.; Tabarés, E.; Krummenacher, C.; De Castro, F.; López-Guerrero, J.A. The effect of cellular differentiation on HSV-1 infection of oligodendrocytic cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 303–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Cammer, W. The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. *J. Neurol. Sci.* **1999**, *168*, 116–120. [[CrossRef](#)]
76. Bénardais, K.; Kotsiari, A.; Škuljec, J.; Koutsoudaki, P.N.; Gudi, V.; Singh, V.; Vulinović, F.; Skripuletz, T.; Stangel, M. Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotox. Res.* **2013**, *24*, 244–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Díez-Itza, I.; Vizoso, F.; Merino, A.M.; Sánchez, L.M.; Tolivia, J.; Fernández, J.; Ruibal, A.; López-Otín, C. Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am. J. Pathol.* **1994**, *144*, 310–320.
78. Navarro, A.; Del Valle, E.; Tolivia, J. Differential expression of apolipoprotein D in human astroglial and oligodendroglial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **2004**, *52*, 1031–1036. [[CrossRef](#)]
79. Tolivia, J.; Navarro, A.; Del Valle, E.; Perez, C.; Ordoñez, C.; Martínez, E. Application of photoshop and scion image analysis to quantification of signals in histochemistry, immunocytochemistry and hybridocytochemistry. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **2006**, *28*, 43–53.



Review

Apolipoprotein D as a Potential Biomarker in Neuropsychiatric Disorders

Eva del Valle ^{1,2,3} , Nuria Rubio-Sardón ^{1,2,3} , Carlota Menéndez-Pérez ^{1,2,3} , Eva Martínez-Pinilla ^{1,2,3,*} and Ana Navarro ^{1,2,3}

¹ Department of Morphology and Cell Biology, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain; valleeva@uniovi.es (E.d.V.); nuria199510@hotmail.com (N.R.-S.); menendezperezcarlota@gmail.com (C.M.-P.); anavarro@uniovi.es (A.N.)

² Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), 33006 Oviedo, Spain

³ Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33006 Oviedo, Spain

* Correspondence: martinezeva@uniovi.es

Abstract: Neuropsychiatric disorders (NDs) are a diverse group of pathologies, including schizophrenia or bipolar disorders, that directly affect the mental and physical health of those who suffer from them, with an incidence that is increasing worldwide. Most NDs result from a complex interaction of multiple genes and environmental factors such as stress or traumatic events, including the recent Coronavirus Disease (COVID-19) pandemic. In addition to diverse clinical presentations, these diseases are heterogeneous in their pathogenesis, brain regions affected, and clinical symptoms, making diagnosis difficult. Therefore, finding new biomarkers is essential for the detection, prognosis, response prediction, and development of new treatments for NDs. Among the most promising candidates is the apolipoprotein D (Apo D), a component of lipoproteins implicated in lipid metabolism. Evidence suggests an increase in Apo D expression in association with aging and in the presence of neuropathological processes. As a part of the cellular neuroprotective defense machinery against oxidative stress and inflammation, changes in Apo D levels have been demonstrated in neuropsychiatric conditions like schizophrenia (SZ) or bipolar disorders (BPD), not only in some brain areas but in corporal fluids, i.e., blood or serum of patients. What is not clear is whether variation in Apo D quantity could be used as an indicator to detect NDs and their progression. This review aims to provide an updated view of the clinical potential of Apo D as a possible biomarker for NDs.

Keywords: bipolar disorders; lipocalins; major depression disorders; serum; schizophrenia



Citation: del Valle, E.; Rubio-Sardón, N.; Menéndez-Pérez, C.; Martínez-Pinilla, E.; Navarro, A. Apolipoprotein D as a Potential Biomarker in Neuropsychiatric Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15631. <https://doi.org/10.3390/ijms242115631>

Academic Editors: Noemí Rotllan and Joan Carles Escolà-Gil

Received: 8 October 2023

Revised: 24 October 2023

Accepted: 25 October 2023

Published: 26 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the past decades, there has been growing interest in the study of neuropsychiatric disorders (NDs) since they have become the first cause of disability and the second cause of death worldwide [1]. A European meta-analysis published in 2011 estimated that 38.2% of the population suffers from at least one brain disorder each year, i.e., mood or developmental, which means around 164 million people [2–4]. The most frequent disorder is anxiety (14%), followed by insomnia (7%), major depression (6.9%), somatoform disorders (6.3%), and alcohol and drug dependence (4%); however, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) stands out in the youngsters (5%) [2]. Most recent studies, based on data from the World Health Organization (WHO), place the incidence of this group of pathologies at almost 50%, an increase that would be related to increasingly frequent natural disasters or conflict-induced humanitarian crises in numerous countries, as well as the recent Coronavirus Disease (COVID-19) pandemic, among many other factors [5–7].

From a clinical point of view, there are several circumstances that could be behind the neuropsychiatric symptoms, including metabolic alterations, the consumption of poisons/toxins, and general medical conditions such as neoplasm, trauma or infections [8]. This complexity constitutes a handicap for the diagnosis and treatment of NDs. Primary

information provided from gene expression or brain activity imaging techniques is useful but with limitations. Thus, there is a current effort focusing on the discovery of potential biomarkers for improving prevention, diagnosis, drug response, and drug development for NDs. In this sense, finding biomarkers for NDs would help to predict outcomes, stratify groups of patients, and make decisions regarding treatments and therapies. Undoubtedly, an ideal biomarker is an intracellular or extracellular molecule that shows measurable differences between physiological and pathological states. Protein profiling in serum, plasma, urine, saliva, or cerebrospinal fluid (CSF) in NDs is a promising field of research [4]. In addition, not only proteomics but all the “omics”, including genomics, transcriptomics, metabolomics, and epigenetic techniques, are powerful tools in the search of biomarkers [9]. The big question is whether there is any molecule that meets all these requirements and can be used in clinical practice.

The apolipoprotein (Apo) family is a specialized group of proteins that associates with lipids and mediates several steps in lipid metabolism. So far, there are 22 known members of the family but only Apo E [10], Apo J [11], and Apo D [12] are expressed at high levels in the nervous system [13]. Several studies indicate that of candidate psychiatric biomarkers detected using proteomic techniques, cholesterol and associated proteins, specifically apolipoproteins, may be of interest. Cholesterol is necessary for brain development and its synthesis continues at a lower rate in the adult brain. Specifically, Apo D is the component of lipoproteins responsible for lipid transport [14,15], whose implication in NDs has gained interest in recent years [16–21]. In this review, we will focus on what is known so far about the relationship between Apo D and NDs, and which are the features of this protein that could make it feasible to be used as a new biomarker for these pathologies.

2. Apolipoprotein D

2.1. Basic Information

Apo D is an “atypical” apolipoprotein since its molecular structure revealed that it belongs to the lipocalin superfamily [12,22]. Human Apo D was first isolated and partially characterized by McConathy and Alaupovic in 1973 from plasma HDLs [22] and subsequently by Albers et al. in 1981 [23], but is widely expressed throughout the human body, as reported by Drayna et al. in 1986 [12]. These authors found Apo D mRNA in the brain, liver, kidney, intestine, pancreas, placenta, spleen, and adrenal and lachrymal glands. Apart from plasma, Apo D has been detected in different human fluids such as tears [24], CSF [25], perilymph [26], sweat [27], urine [28], breast gross cyst fluid [29], and in cerumen [30]. Sites of N-glycosylation were found at Asn45 and Asn78. Interestingly, Apo D glycosylation patterns are tissue specific, with a molecular weight ranging from 29 to 32 kDa depending on glycosylation level. This feature is important because while 29 kDa Apo D is synthesized in the central nervous system (CNS), the 32 kDa form is found in the CSF and plasma. Therefore, detection of 29 kDa Apo D in human fluids would be a direct consequence of its leakage across an injured blood–brain barrier (BBB), making Apo D a perfect biomarker for BBB damage [31].

At the molecular level, Apo D shows the lipocalin characteristic ligand binding structure, which classifies it as a kernel lipoprotein able to bind arachidonic acid (AA), cholesterol, and steroids. No specific ligand has been identified, but Apo D binds with high affinity to AA, progesterone, and retinoic acid, whereas with reduced affinity to pregnenolone and some eicosanoids [32–34]. Moreover, Apo D also forms a complex with LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase), the main enzyme responsible for plasma cholesterol esterification. This association allows Apo D to regulate AA metabolism, preventing its transformation in cholesterol esters [35]. Although Apo D is usually found as a monomeric protein, it has also been described in dimeric and tetrameric forms [36,37]. In fact, the Apo D dimers seem to be related to the antioxidant function of this lipocalin, protecting cells from lipid hydroperoxides [36]. Since Apo D could exert different roles depending on its location, it has been defined as a multi-ligand multi-function protein [21].

Apo D expression is regulated by various factors as its promoter region contains several response elements (estrogens, glucocorticoids, progesterone, vitamin A, and vitamin D). In vitro experiments have shown that the gene is under the control of serum-responsive elements during cellular growth arrest [38]. Apo D is also modulated by Apo E3 and Apo E4 isoforms, but not Apo E2. It has been observed that isoforms E3 and E4 inhibited Apo D promoter activity in normal and stress conditions. An inverse correlation between Apo D and Apo E mRNA expression during development and in the cortex, hippocampus, plexus choroid, and cerebellum of the mouse brain was also demonstrated [39]. Recently, a new promoter region in the Apo D gene that, according to authors, would work in tandem with a 5'UTR has been discovered in the nervous system in response to oxidative stress [40].

2.2. Apo D in Nervous System

The mammalian brain is one of the organs of major expression for Apo D, but this lipocalin is also expressed in the peripheral nervous system during regeneration and remyelination [41]. As a lipid carrier, Apo D could have an important role in lipid transport during axonal regeneration. In fact, Apo D, together with A-IV, A-I, and E, accumulates in the sciatic nerve of rats during the regenerative period following a lesion as a part of a crucial complex for the mobilization and metabolic regulation of lipids [42–44]. Ganfornina et al., in 2010, studying sciatic nerves of Apo D-KO mice, demonstrated that it is necessary for the correct maintenance of myelin sheaths and for the functional integrity of axons along aging [41]. These authors also confirmed that Apo D is upregulated after an injury of the nerve. At this point, Apo D would contribute to the recovery of the axonal function, favoring the lipid exchange during degenerative and regenerative phases and controlling the magnitude and duration of the inflammatory response in the damaged area [41,44].

In the human CNS, Apo D is located in perivascular cells, astrocytes, oligodendrocytes, and some neurons in both physiological and pathological conditions [45,46]. Of note, Apo D has been identified as the most upregulated gene in humans, mice, rats, and rhesus macaques along the aging brain process [47,48] and, more importantly, Apo D levels are increased under pathological situations, i.e., after kainate damage [49] or traumatic brain injury [50].

2.3. Apo D in Neurodegenerative Diseases

During the last decades, numerous in vitro [51–55] and in vivo [21,56–60] studies in different neuropathologies such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), or multiple sclerosis (MS) have postulated that Apo D would be part of the cellular defense machinery against oxidative stress and inflammation, with a clear neuroprotective function [21,61–63]. For example, Apo D is upregulated in the CSF, hippocampus, and cerebral cortex of AD patients in correlation with the Braak degeneration stage [64]. Interestingly, increased Apo D expression was found in oligodendrocytes and astrocytes, and also a colocalization with amyloid plaques, probably in an attempt to protect neurons against β -amyloid-induced cytotoxicity [36,65]. In the case of PD, the glial cells surrounding dopaminergic neurons of the substantia nigra show an increased Apo D immunosignal [58]. In addition, changes in Apo D levels were described in both the plasma and brain of a murine model of Niemann–Pick Type C disease [21].

Analyses of CSF from patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and Guillain–Barré Syndrome revealed an increase in Apo D content [66]. Similar data, as well as an intrathecal increment of Apo D, were found in MS patients [66,67]. Intriguingly, Apo D indices (calculated to exclude any influence of blood–CSF barrier leakage) measured in CSF correlate with MS duration but not with disability or age [66]. The increase in Apo D presence could respond to a protective mechanism, being the highest at the time of the first clinical exacerbation. Another example is the study of Do Carmo et al. (2008), whose results in a mouse model of acute encephalitis by coronavirus infection showed that Apo D is upregulated in the brain of these animals, returning to normal levels when the virus is cleared [68].

Finally, Apo D has also been associated with other neurodegenerative lesions, as it has been shown in different experimental models of stroke, entorhinal cortex lesions, or maternal hyper and hypothyroidism [21,60].

3. Role of Apo D as a Biomarker in Neuropsychiatric Disorders

Current evidence strongly suggests the increase of Apo D expression in NDs such as Schizophrenia (SZ), Bipolar Disorders (BPD), Major Depressive Disorders (MDD), or Autism Spectrum Disorder (ASD), a group of diseases that shares some cardinal pathological features including oxidative stress, excitotoxicity, myelin dysfunction, cholesterol imbalance, and apoptosis, and where it seems to play a fundamental role as a neuroprotective protein. The existing lack of biomarkers for the effective and early detection of NDs makes it necessary to search for new predictive molecules, and, in this sense, Apo D could be a good candidate. An updated view of the role of Apo D as a potential biomarker for different NDs, summarized in Figure 1, will be treated in the following sections.

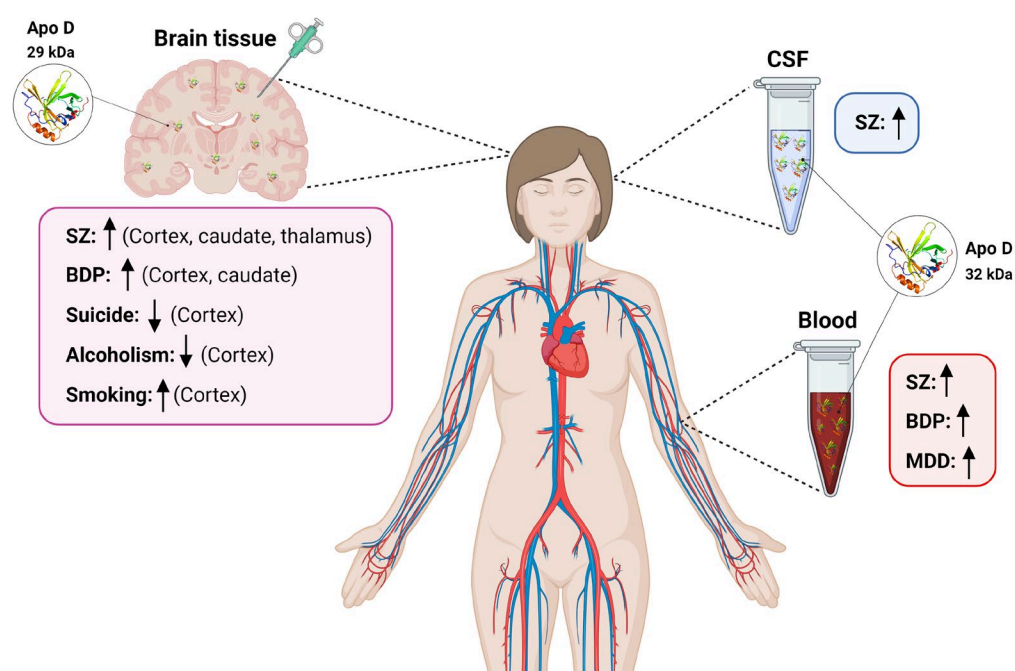


Figure 1. Scheme summarizing variations in Apo D levels in blood, CSF, and human brain tissues found in different neuropsychiatric diseases. SZ: schizophrenia; BPD: Bipolar disorders; CSF: cerebrospinal fluid; MDD: Major depressive disorder. ↑: increased Apo D levels; ↓: decreased Apo D levels. Created with BioRender.com.

3.1. Apo D in Schizophrenia

SZ is a severe and long-term brain condition characterized by changes in how a person thinks, perceives, and interprets reality that affects approximately 20 million individuals globally [69]. Major symptoms that may appear continuously or in relapsing episodes include psychosis, hallucinations, delusions, disorganized speech, lack of motivation, or cognitive deficits [70]. Researchers speculate that a variety of genetic and environmental factors contribute to the development of SZ [71]. While there is no cure for SZ, ongoing research is paving the way for innovative and more secure treatment options. However, the success of these treatments involves, without a doubt, adequate diagnostic methods. Nowadays, clinical diagnosis predominantly relies on subjective evidence, encompassing self-reported experiences and observed behavioral abnormalities, followed by psychiatric evaluations [72]. Consequently, there is a pressing need for objective and specific diagnostic tests based on biomarkers to enhance the accuracy of SZ diagnosis in clinical practice [69]. Although the pathological mechanisms of the disease are not fully understood, multi-

ple lines of evidence indicate that disruptions in membrane lipids and their metabolism caused by excessive oxidative stress likely play a role in the development of SZ, affecting neurotransmission and complex brain function [70,73].

Taking this into consideration, Thomas et al., in 2001, described, for the first time, a selective increase of Apo D quantity in some brain areas of patients with SZ [74]. They took samples from the left hemisphere of 20 subjects diagnosed with SZ and analyzed Apo D levels using Western blot (WB) and ELISA techniques. They found significant increases in Apo D amount in the prefrontal cortex (BA9 and BA46; 46% increase), orbitofrontal cortex (BA11; 23.9%), amygdala (42.8%), thalamus (31.7%), and caudate, precisely the brain areas most affected by the pathophysiological changes related with SZ [75]. Remarkably, Apo D serum levels were lower in these patients than in control ones, suggesting that the local Apo D increment may act as a kind of compensatory response against systemic insufficiencies in lipid metabolism. However, it is important to keep in mind that most of the patients in these studies were medicated with neuroleptic drugs, and a gradual accumulation in both Apo D mRNA and protein was reported in response to chronic clozapine (CLZ) administration in the brains of rodents [76]. In humans, a significant increment of Apo D serum levels was found in never-medicated patients when compared with controls and even higher in those chronic patients treated with the atypical antipsychotic drug CLZ versus drug-free ones [77]. These findings seem to support the view that Apo D could be acting as an antioxidant neuroprotective molecule to prevent AA peroxidation and, at the same time, as a biological marker in an indirect way [62].

Furthermore, Apo D high levels have also been found in a study that looked for biomarkers of psychosis risk in blood. In fact, Apo D has been identified, together with matrix metalloproteinase 7, as the only two molecules of 117 (related to hormonal responses, inflammation, growth, oxidative stress, and metabolism) that showed a significant difference between people with clinical high-risk symptoms who developed psychosis and those who, despite presenting symptoms, did not do so [78]. A meta-analysis for exploring potential biomarkers of SZ in human peripheral fluids confirmed Apo D as one of the 20 proteins that were altered in the serum and plasma of SZ patients compared with controls. Despite these results, authors proposed several proteins as possible biomarkers for SZ, but Apo D was not among them [79]. Relatedly, Raiszadeh et al., in 2012, performed a proteomic analysis of sweat in SZ subjects [80]; Apo D was one of the five proteins that sweat and serum had in common. However, expression levels of Apo D in sweat samples were not high enough to take into consideration the analysis of this lipocalin as an SZ biomarker. These results are quite surprising as Apo D has been reported by other authors, after dermicidin and Apo J, as the third most abundant protein in human sweat, representing 15% of the total of secreted proteins [81].

The differences in the results of the mentioned studies could be explained by different factors such as the analysis methodologies, the number of subjects, the phase of the disease, or the medication. Once again, data about pharmacological treatments of patients is interesting since it has been shown that some drugs, like haloperidol (HAL), reduce Apo D expression in the hippocampus, piriform cortex, and caudate-putamen, while others, such as risperidone (RISP) or olanzapine (OLZ), produce the opposite effects in rat brain [82]. In fact, the negative effects of HAL over cell morphology, as well as Apo D quantities, could be restored with RISP or OLZ post-treatment. Even more, pre-treatments with these atypical antipsychotic drugs also prevent Apo D reduction caused by HAL but not in such an effective way as post-treatments. It is known that CLZ, RISP, and OLZ are better choices than HAL for SZ treatment due to the negative effects on cognition and extra-pyramidal symptoms caused by the last one. Therefore, Apo D increase could be involved in the molecular mechanisms that underlie the positive effects of CLZ, RISP, and OLZ in SZ treatment, e.g., to sequester free AA in the cell, preventing its release and its entry into inflammatory pathways such as the cyclooxygenase [18,35,82,83]. Anyway, it would be interesting to know the effect of more drugs on Apo D expression to determine if this lipocalin could be a good biomarker for SZ.

In the CSF, Apo D has been identified as a potential biomarker for cerebral amyloid angiopathy [84], chronic pain [85], MS [86], and idiopathic normal pressure hydrocephalus [87], among other brain-related pathologies. When CSF was analyzed in the search for SZ markers, using iTRAQ-based proteomic and mass spectrometry techniques, Apo D was identified as one of the ten proteins that showed differential expression across the clinical dopaminergic spectrum but did not show linearity or statistical significance to be considered as a biomarker probably due to the low number of patients included in these experiments [88].

While it is true that due to the invasiveness of the techniques, using Apo D as a biomarker for diagnosing SZ in brain tissue or CSF does not provide an advantage over other biomarkers, the ability to detect changes in Apo D levels with just a blood sample and a protein profiling assay places it in an advantageous position compared to other molecular markers whose detection involves methodologically complex and expensive assays, such as RNA sequencing.

3.2. Apo D in Bipolar Disorders

BPDs are a group of chronic mental health conditions that cause abnormal shifts in mood, ranging from extreme highs (mania) to extreme lows (depression) episodes [71]. BPDs affect the quality of life of millions of adults worldwide, negatively impacting day-to-day social interactions and potentially leading to premature mortality from cardiovascular disease or suicide [89]. The exact cause of these pathologies is unknown, but genetics play a key role, accounting for 70% of the risk for BPD as heritable [90]. Regarding BPD pathophysiology, recent studies suggest that immune-inflammatory changes induce structural brain alterations at the limbic network that compromise dopamine and serotonin neurotransmitter signaling, which would explain the symptoms and the cognitive deterioration of patients [90,91].

The study of the Apo D brain levels in post-mortem samples of BPD subjects, in the same areas as the authors did previously for SZ, demonstrated differences between the two NDs [75]. In the case of BPD, an increase of Apo D expression was observed in the dorsolateral prefrontal (BA9; 273% increment), lateral prefrontal (BA46; 111% increment), and in the parietal cortices (BA40; 123% increment) of BPD patients vs. healthy controls. In contrast, no significant increase was observed in the orbitofrontal (BA11; 37.9% increment) and cingulate cortices (BA24; 57.7% increment), and no changes were appreciated in the amygdala or the thalamus [74,75].

In regard to the potential of Apo D as a serum biomarker for BPD, results found in the literature are quite contradictory. Dean and co-workers, in 2008, using ELISA immunological assays, did not observe differences in Apo D levels between BPD vs. SZ patients or their controls [92]. Interestingly, medications did not seem to have an effect on the amount of Apo D in the plasma of BPD subjects. Contrarily, Knöchel et al., in 2017, performed a nanoliquid chromatography–multiple reactions monitoring mass spectrometry (nano-LC–MRM-MS) and observed that BPD patients exhibited higher Apo D levels in serum than those diagnosed with SZ ($p < 0.050$) [93]. Similar results have been reported in a recent study; Apo D is found elevated in the serum of BPD patients compared to controls [94]. In this case, the proteins were separated by gel electrophoresis and then analyzed by mass spectrometry. At this point, it would be interesting to know the type of BPD of the patients and the number of subjects included in these studies, as well as to explore a little further the real influence of methodologies on the results obtained.

Notwithstanding, it is important to remember that Apo D conformation is not the same in the post-mortem brains and in plasma, and, consequently, their behavior may be completely different. Thus, a systematic review and a meta-analysis on MS-based proteomics applied to human peripheral fluids to assess potential biomarkers of BPD showed that Apo D is present in plasma and serum, and it was among the 258 proteins differentially expressed in blood-related samples (plasma, serum, and PBMCs) when

studying BPD patients vs. controls [79]. Finally, and as far as we know, Apo D has not been studied in other human fluids from BPD subjects.

3.3. Apo D in Major Depressive Disorder

MDD or clinical depression is a ND characterized by a persistent low mood, feelings of sadness, and loss of interest that condition the daily functioning and quality of life of patients [95]. It is considered the most common mental illness worldwide; the number of cases has increased by almost 50% over the past 30 years [96]. Since MDD is very variable in the lifetime course and recurrences are frequent, the early diagnosis of the initial depressive episode is instrumental in prescribing individualized treatments and preventing multiple episodes [95]. Until today, all attempts carried out to identify an applicable biomarker panel to the disease have failed [97].

The MDD pathophysiology includes dysfunction of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, neurotransmitter metabolism disorder, oxidative stress, and neuroinflammation [98], processes in which Apo D could participate thanks to its function as a neuroprotective protein. However, there is no data about Apo D levels in brain tissue from patients with MDD since all studies have been done in serum samples. In this sense, Apo D was first reported in relation to MDD by Xu et al. in 2012, when these authors observed a 1.69-fold change increase in Apo D levels in MDD first-episode never-medicated patients compared with healthy controls using iTRAQ 2D LC-MS/MS. Nonetheless, when the proteins were studied by WB, the differences were not significant [99]. In a similar study (first-onset drug-naïve MDD patients) using multiplexed immunoassay profiling and LC-MS(E), despite Apo D being present above the limits of detection in all samples studied, no significant changes in Apo D levels were found in MDD patients vs. controls [100]. Surprisingly, in 2016, Apo D was identified as one of the six proteins that could be used as serum biomarkers in MDD, with a 68% accuracy, according to the authors [101]. In this study, blood samples of 50 non-medicated MDD patients and their corresponding controls were analyzed by LC–MS/MS to obtain a serum proteome profiling. With this method, a group of differentially expressed proteins was found, most of them implicated in inflammatory response and lipid transport, Apo D among them [79,99]. Moreover, the authors tested, with a logistic regression model, the robustness of these proteins (Apo B, Apo D, CP, GC, HRNR, and PFN1) in terms of accuracy, sensitivity, and specificity, obtaining values of 68, 67, and 69%, respectively [79]. Overall, the study not only detects a group of proteins that could be used as biomarkers of MDD but also implies that the modulation of inflammatory and immune systems, as well as lipids metabolism, are implicated in the pathophysiology of MDD. In this way, high levels of Apo D in the serum of non-medicated depressed patients may reflect a neuroprotective response to oxidative stress, systemic inflammation, neurovascular dysfunction, and BBB permeability [102]. It is important to bear in mind that certain treatments for depressive disorders have effects on lipid metabolism, so it would be interesting to know what happens with Apo D in MDD-medicated patients [103,104].

The study of Lee et al., performed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and label-free quantification in plasma from BPD and MDD subjects, took into account the effects of medication over protein expression (antipsychotics, mood stabilizers, antidepressants, or benzodiazepines) and demonstrated that Apo D expression was not affected for any of the antipsychotic drugs. However, it was negatively associated with the total scores of the Hamilton depression rating scale (HAM-D) and with the anhedonia/retardation and guilt/agitation scores of this scale [105]. In fact, Apo D expression seems to decrease with the worsening of symptoms, which would make it impossible to exert its neuroprotective role.

Clinical evidence suggests that some people suffering from MDD attempt suicide. It has been reported that alterations in cholesterol levels could play a crucial role in suicidal behavior, as shown by the significant association between (i) low levels of peripheral circulating cholesterol in patients with suicidal and violent conduct [106,107], and (ii) low levels of central cortical cholesterol in violent suicide completers [108]. There is little data

about Apo D and suicidal behavior. Genome-wide expression profiling using DNA from samples of the prefrontal cortex (BA47) of ten suicidal subjects and eight matching controls showed that six genes were downregulated in the suicides, including Apo D (−1.57-fold change). Unfortunately, Apo D data were not validated by real-time PCR, as happened with Apo E (−1.63-fold change) or sortilin 1 (1.86-fold change). Anyway, Apo D and Apo E low levels could be an indicator of failure in cholesterol transport, as expected in this type of disorder [109].

In the last decade, there has been an increasing interest in the use of secreted membrane vesicles, collectively called extracellular vesicles (EVs), as potential diagnostic tools for NDs [110–112]. Although the content of these EVs is cell-specific, it is mainly represented by proteins and nucleic acids, but also by lipids and metabolites (for a review, see [113]). Recently, the possible role of EVs in MDD has been the subject of study. In fact, EVs are packed with RNA (mainly miRNAs) and proteins related to altered processes of MDD, i.e., energy metabolism, neuro-inflammation, neurogenesis, and the maintenance of BBB, Apo D among them [114]. In physiological conditions, EVs secreted by astrocytes transport Apo D to neurons to enhance neuroprotection under oxidative stress [115]. Since EVs can successfully pass the BBB, Li et al. (2023) propose that they may be considered as transport carriers of Apo D and other neuroprotective factors in precise brain-related treatments [114]. Therefore, it would be a priority to study in depth the presence of Apo D in these vesicles in MDD and to investigate the possibility that this protein could act as a biomarker of the pathology.

3.4. Apo D and Other Neuropsychiatric Disorders

In view of the potential role of Apo D as a biomarker for SZ, BPD, or MDD, some laboratories are focusing on this protein but in other NDs, namely ASD, anxiety, and addictions.

3.4.1. Apo D in Autism Spectrum Disorder

ASD is a complex neurodevelopment condition that can manifest with deficits in social communication, restricted interest, and repetitive behaviors. The estimated prevalence of ASD has been increasing in the past two decades, mainly affecting children under 3 years of age, although symptoms may improve over the adult's life [116]. The multifactorial etiology, which includes genetic and non-genetic factors, together with the heterogeneity of its symptoms, complicates early diagnosis and the choice of the most effective and appropriate interventions [117]. Unfortunately, today, there are no biological markers of ASD that are objectively measurable and easily quantifiable to avoid the delay in diagnosis [118].

Lipid peroxidation, abnormalities in prostaglandin metabolic pathways, oxidative stress, and alterations in the formation and maintenance of synaptic structures have been associated with the pathogenesis of ASD, so Apo D could play a role in this pathology due to its ability to interact with AA, as already mentioned in this review [119]. On the one hand, the study of Esnafoglu and Cırrık (2022) demonstrated no significant differences in Apo D serum levels between ASD patients and controls when these were measured using ELISA [120]. The authors pointed out that one of the limitations of the study was the small sample (39 individuals). On the other hand, they also did not find differences in the analysis of the presence of Apo D in some brain tissues of ASD subjects compared to controls. This fact may be attributed to the age of the subjects, ranging from 3 to 13 years old, which makes it more difficult to observe significant variations. First, it has been shown that Apo D expression is age-dependent [121]. Second, Apo D serum level in the controls was $1.39 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$, while in healthy adults, it was between 5 and 23 mg/100 mL [122].

3.4.2. Apo D in Anxiety Disorders

The origin of some anxiety disorders could be traced as early as the three first weeks after birth. In mammals, enhanced postnatal care during this period operates by suppressing microglial inflammation, and is associated with reduced anxiety [123]. Mice lacking inflammation-suppressing factor IRF2BP2 in microglia (KO) and the wild-type (wt) ones,

subjected to enhanced postnatal care, show differential expression of Apo D [123]. Thus, its expression is lower in the hypothalamus of wt than of KO mice, which would prove the implication of Apo D not only in neurodevelopment, as we referred to above, but its contribution to a minor anxiety state. The nucleus accumbens is a brain area studied in relation to anxiety disorders involved in motor function but also in emotion and reward. A mouse model lacking type 5 adenylyl cyclase (AC5) in the nucleus accumbens presents an anxiolytic phenotype. In these mice, Apo D is the second most downregulated gene after cholecystokinin [124]. Once again, a reduction in anxiety levels in an animal model of disease is accompanied by a downregulation of the Apo D gene, which would make it unequivocally a downward marker of the pathology. As far as we know, there are no specific studies on humans about Apo D and anxiety disorders, but the work of Huang et al. gives us some indirect information. These authors analyzed the lipoprotein concentration of patients with anxiety states and found a lower HDL concentration in affected women vs. their respective controls [125]. Since Apo D is a component of HDL, it would be interesting to study this fact in depth.

3.4.3. Apo D in Addictions

Critically, there are noticeable variations between studies examining Apo D levels in patients with addictions to different substances, i.e., drugs of abuse, cigarettes, or alcohol. As we mentioned previously, Apo D levels could be modulated by some medical drugs [76,77,82]. Moreover, some results suggest that astrocytes could be a target for drugs of abuse and casually that this cell type is one of those with the highest expression of Apo D. All this leads to the question of whether this apolipoprotein is also affected by drugs of abuse.

Most of the studies in this field have centered on alcohol and smoking effects. Variations in Apo D gene levels were first reported in 2000 in a study with tissues from the superior prefrontal cortex of alcoholic subjects using four different microarrays [126]. Notwithstanding, the Apo D gene was downregulated in all assays; authors were not sure that the changes observed would be only due to alcoholism and not to the aging process or to other confounding variables [127]. The downregulation of the Apo D gene in the frontal cortex of alcoholics was confirmed by Flatscher-Baden et al. in 2005 [128]. Furthermore, as alcoholism and smoking usually coexist, there are studies about the influence of smoking on the expression of genes modified by alcohol consumption. For instance, Apo D mRNA expression increased in the prefrontal cortex of smokers in a significant way, independently of alcohol ingestion, when compared with the non-smoker alcoholic group [129,130].

Regarding other substances of abuse, references in the literature are scarce, but it has been observed that morphine also upregulates the Apo D gene in the lateral hypothalamus of wt mice vs. those KO for mu opioid receptor after a chronic treatment [131]. Finally, Apo D is also expressed in the hippocampus of cocaine users, although the changes were not significant when compared with controls [132].

4. Final Remarks

In the CNS, Apo D acts not only as a lipid carrier (the typical role of a lipocalin) but also seems to be a neuroprotective molecule in oxidative stress situations, as well as necessary for the correct myelination process. It is clear that Apo D levels (protein or gene) are altered in several NDs (Table 1). Of note, if variations in Apo D amounts in serum from SZ and MDD patients are confirmed, Apo D could be used as a biomarker for the diagnosis of these two NDs. However, the studies of Apo D's usefulness as a biological marker in other NDs are few and not standardized, an essential requirement to create a panel of biomarkers for diagnosis and discrimination between NDs. Obviously, the serum is the ideal media for the analysis of Apo D levels, so larger cohorts are needed for the studies. It should be remembered that Apo D glycosylation patterns are tissue-specific, which makes it a perfect candidate as a serum biomarker of BBB damage. In this sense, it is also important to classify subjects according to the type, stage, or grade of the disorder due to the possibility that Apo

D could act as a “first response” protein with higher levels at the onset of the pathology. As some drugs (medical drugs and substances of abuse) influence Apo D expression, it is a priority to discriminate between drug-naïve and medicated patients, and also know the type of medication that the individuals are receiving and for how long. Furthermore, since the Apo D gene has estrogen response elements in its promoter region, sex must be taken into account when analyzing the results. Finally, to avoid inconsistencies between studies, authors should pay special attention to the chosen methodology. The state-of-the-art mass spectrometry methods and RNA arrays are very useful for selecting candidate biomarker molecules, but the data should always be checked by real-time PCR.

Table 1. Apo D variations in neuropsychiatric disorders.

	Brain Tissue	Serum/Plasma	CSF	Other
SZ	↑ BA9 and Caudate; BA46, BA11 and Thalamus (human) [74,75] = Substantia nigra, BA18, CA1, CA3, Subiculum, Parahippocampal gyrus and Cerebellum; BA40 and BA24 (human) [74,75]	↓ (mouse) [76] ↑ (human) [76]	ns (human) [66]	= Sweat (human) [81]
BPD	↑ BA9 and Caudate; BA46 and BA40 (human) [74,75] = BA18; Thalamus (human) [74,75] Ns BA11 and BA24 (human) [75]	↑ (human) [93,94] = (human) [92]	nd	nd
MDD	nd	↑ (human) [101] ns (human) [99,100]	nd	nd
Suicide	↓ BA10 (*) (human) [109]	nd	nd	nd
ASD	nd	nd	nd	↑ Amniotic fluid (*) (human) [119]
Alcoholism	↓ Superior frontal cortex (*) (human) [126] ↑↓ Frontal cortex (*) (human) [127] ↓ Frontal cortex (*) (human) [128] ↑↓ Motor cortex (*) (human) [127]	nd	nd	nd
Smoking	↑ Prefrontal cortex (*) (human) [129] ↓ Hippocampus (*) (mouse) [130]			
Morphine addiction	↑ Lateral hypothalamus (*) (mouse) [131]			
Cocaine addiction	ns Hippocampus (*) (human) [132]			

(*): gene (otherwise refers to protein); ↑: increases; ↓: decreases; =: does not change; nd: not determined; ns: not significant; SZ: schizophrenia; BPD: Bipolar disorders; MDD: Major depressive disorder; BA: Brodmann's area; ASD: Autism Spectrum Disorders.

Future perspectives in this field of research necessarily involve more studies about the presence of Apo D in human fluids in different NDs to establish an expression pattern that could be used as a biomarker to help in the diagnosis of these pathologies but also to consider Apo D as a neuroprotective molecule that could help in the treatment of NDs due to its antioxidant and anti-inflammatory properties.

Author Contributions: Conceptualization was agreed upon by E.d.V., A.N. and E.M.-P., who also scanned the literature retrieved and extracted information from papers referenced in the review. E.d.V. compiled all the information and wrote the first version of the manuscript. A.N. and E.M.-P. critically read the manuscript and prepared a second version of the paper. N.R.-S. analyzed the literature and also extracted information from articles. C.M.-P. analyzed the literature, extracted information from articles, and prepared the tables/figures in the final version of the paper. All authors edited the manuscript and revised the final submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Feigin, V.L.; Nichols, E.; Alam, T.; Bannick, M.S.; Beghi, E.; Blake, N.; Culpepper, W.J.; Dorsey, E.R.; Elbaz, A.; Ellenbogen, R.G.; et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 459–480. [CrossRef] [PubMed]
2. Wittchen, H.U.; Jacobi, F.; Rehm, J.; Gustavsson, A.; Svensson, M.; Jönsson, B.; Olesen, J.; Allgulander, C.; Alonso, J.; Faravelli, C.; et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2011**, *21*, 655–679. [CrossRef] [PubMed]
3. Susser, E.; Ritsner, M.S. Brain protection in neuropsychiatric disorders: Past, present and future challenges. In *Brain Protection in Schizophrenia, Mood and Cognitive Disorders*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2010; pp. 3–25. ISBN 9789048185535.
4. Woods, A.G.; Sokolowska, I.; Taurines, R.; Gerlach, M.; Dudley, E.; Thome, J.; Darie, C.C. Potential biomarkers in psychiatry: Focus on the cholesterol system. *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 1184–1195. [CrossRef] [PubMed]
5. Charlson, F.; van Ommeren, M.; Flaxman, A.; Cornett, J.; Whiteford, H.; Saxena, S. New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* **2019**, *394*, 240–248. [CrossRef] [PubMed]
6. Harrison, P.J.; Taquet, M. Neuropsychiatric disorders following SARS-CoV-2 infection. *Brain* **2023**, *146*, 2241–2247. [CrossRef] [PubMed]
7. Global Burden of Disease Collaborative Network. VizHub—GBD Results. Available online: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/> (accessed on 26 September 2023).
8. Taber, K.H.; Hurley, R.A.; Yudofsky, S.C. Diagnosis and treatment of neuropsychiatric disorders. *Annu. Rev. Med.* **2010**, *61*, 121–133. [CrossRef] [PubMed]
9. García-Gutiérrez, M.S.; Navarrete, F.; Sala, F.; Gasparyan, A.; Austrich-Olivares, A.; Manzanares, J. Biomarkers in Psychiatry: Concept, Definition, Types and Relevance to the Clinical Reality. *Front. Psychiatry* **2020**, *11*, 432. [CrossRef]
10. Elshourbagy, N.A.; Liao, W.S.; Mahley, R.W.; Taylor, J.M. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 203–207. [CrossRef]
11. De Silva Harshini, V.; Harmony, J.A.K.; Stuart, W.D.; Gil, C.M.; Robbins, J. Apolipoprotein J: Structure and Tissue Distribution. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5380–5389. [CrossRef]
12. Drayna, D.; Fielding, C.; McLean, J.; Baer, B.; Castro, G.; Chen, E.; Comstock, L.; Henzel, W.; Kohr, W.; Rhee, L. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 16535–16539. [CrossRef]
13. Elliott, D.A.; Weickert, C.S.; Garner, B. Apolipoproteins in the brain: Implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin. Lipidol.* **2010**, *5*, 555–573. [CrossRef] [PubMed]
14. Forero, D.A.; López-León, S.; González-Giraldo, Y.; Dries, D.R.; Pereira-Morales, A.J.; Jiménez, K.M.; Franco-Restrepo, J.E. APOE gene and neuropsychiatric disorders and endophenotypes: A comprehensive review. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **2018**, *177*, 126–142. [CrossRef] [PubMed]
15. Charnay, Y.; Imhof, A.; Vallet, P.G.; Kovari, E.; Bouras, C.; Giannakopoulos, P. Clusterin in neurological disorders: Molecular perspectives and clinical relevance. *Brain Res. Bull.* **2012**, *88*, 434–443. [CrossRef] [PubMed]
16. Björkhem, I.; Meaney, S.; Fogelman, A.M. Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 806–815. [CrossRef] [PubMed]
17. Pfrieger, F.W. Outsourcing in the brain: Do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *BioEssays* **2003**, *25*, 72–78. [CrossRef] [PubMed]
18. Davison, J.; O’Gorman, A.; Brennan, L.; Cotter, D.R. A systematic review of metabolite biomarkers of schizophrenia. *Schizophr. Res.* **2018**, *195*, 32–50. [CrossRef] [PubMed]
19. Kim, H.W.; Rapoport, S.I.; Rao, J.S. Altered arachidonic acid cascade enzymes in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Mol. Psychiatry* **2011**, *16*, 419–428. [CrossRef]
20. Parekh, A.; Smeeth, D.; Milner, Y.; Thuret, S. The role of lipid biomarkers in major depression. *Healthcare* **2017**, *5*, 5. [CrossRef]
21. Rassart, E.; Desmarais, F.; Najyb, O.; Bergeron, K.F.; Mounier, C. Apolipoprotein D. *Gene* **2020**, *756*, 144874. [CrossRef]
22. McConathy, W.J.; Alaupovic, P. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: A new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* **1973**, *37*, 178–182. [CrossRef]
23. Albers, J.J.; Cheung, M.C.; Ewens, S.L.; Tollefson, J.H. Characterization and immunoassay of apolipoprotein D. *Atherosclerosis* **1981**, *39*, 395–409. [CrossRef] [PubMed]
24. Holzfeind, P.; Merschak, P.; Dieplinger, H.; Redl, B. The human lacrimal gland synthesizes apolipoprotein D mRNA in addition to tear prealbumin mRNA, both species encoding members of the lipocalin superfamily. *Exp. Eye Res.* **1995**, *61*, 495–500. [CrossRef] [PubMed]
25. Borghini, I.; Barja, F.; Pometta, D.; James, R.W. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Lipids Lipid Metab.* **1995**, *1255*, 192–200. [CrossRef]
26. Sun, Q.; Disher, M.J.; Rustad, T.; Telian, S.A.; Andrews, P.C. AP30, a differential protein marker for perilymph and cerebrospinal fluid in middle ear fluid, has been purified and identified as human apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1384*, 405–413. [CrossRef]

27. Zeng, C.; Spielman, A.I.; Vowels, B.R.; Leyden, J.J.; Biemann, K.; Preti, G. A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6626–6630. [[CrossRef](#)]
28. Holmquist, L. Identification and quantification of apolipoprotein D in normal human urine. *Electrophoresis* **1990**, *11*, 93–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Balbin, M.; Freije, J.M.P.; Fueyo, A.; Sanchez, L.M.; Lopez-Otin, C. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem. J.* **1990**, *271*, 803–807. [[CrossRef](#)]
30. Feig, M.A.; Hammer, E.; Völker, U.; Jehmlich, N. In-depth proteomic analysis of the human cerumen-A potential novel diagnostically relevant biofluid. *J. Proteom.* **2013**, *83*, 119–129. [[CrossRef](#)]
31. Li, H.; Ruberu, K.; Karl, T.; Garner, B. Cerebral apolipoprotein-D Is hypoglycosylated compared to peripheral tissues and is variably expressed in mouse and human brain regions. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148238. [[CrossRef](#)]
32. Dilley, W.G.; Haagensen, D.E.; Cox, C.E.; Wells, S.A. Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid. *Breast Cancer Res. Treat.* **1990**, *16*, 253–260. [[CrossRef](#)]
33. Kielkopf, C.S.; Ghosh, M.; Anand, G.S.; Brown, S.H.J. HDX-MS reveals orthosteric and allosteric changes in apolipoprotein-D structural dynamics upon binding of progesterone. *Protein Sci.* **2019**, *28*, 365–374. [[CrossRef](#)]
34. Lea, O.A. Binding properties of Progesterone-Binding Cyst Protein, PBCP. *Steroids* **1988**, *52*, 337–338. [[CrossRef](#)]
35. Morais Cabral, J.H.; Atkins, G.L.; Sánchez, L.M.; López-Boado, Y.S.; López-Otin, C.; Sawyer, L. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: Implications for the protein's function. *FEBS Lett.* **1995**, *366*, 53–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bhatia, S.; Kim, W.S.; Shepherd, C.E.; Halliday, G.M. Apolipoprotein D Upregulation in Alzheimer's Disease but Not Frontotemporal Dementia. *J. Mol. Neurosci.* **2019**, *67*, 125–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kielkopf, C.S.; Low, J.K.K.; Mok, Y.F.; Bhatia, S.; Palasovski, T.; Oakley, A.J.; Whitten, A.E.; Garner, B.; Brown, S.H.J. Identification of a novel tetrameric structure for human apolipoprotein-D. *J. Struct. Biol.* **2018**, *203*, 205–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Do Carmo, S.; Séguin, D.; Milne, R.; Rassart, E. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5514–5523. [[CrossRef](#)]
39. Levros, L.C.; Labrie, M.; Charfi, C.; Rassart, E. Binding and repressive activities of apolipoprotein E3 and E4 isoforms on the human ApoD promoter. *Mol. Neurobiol.* **2013**, *48*, 669–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Diez-Hermano, S.; Mejias, A.; Sanchez, D.; Gutierrez, G.; Ganfornina, M.D. Control of the neuroprotective Lipocalin Apolipoprotein D expression by alternative promoter regions and differentially expressed mRNA 5'UTR variants. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0234857. [[CrossRef](#)]
41. Ganfornina, M.D.; Do Carmo, S.; Martínez, E.; Tolia, J.; Navarro, A.; Rassart, E.; Sanchez, D. ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia* **2010**, *58*, 1320–1334. [[CrossRef](#)]
42. Boyles, J.K.; Notterpek, L.M.; Anderson, L.J. 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.* **1990**, *265*, 17805–17815. [[CrossRef](#)]
43. Spreyer, P.; Schaal, H.; Kuhn, G.; Rothe, T.; Unterbeck, A.; Olek, K.; Muller, H.W. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J.* **1990**, *9*, 2479–2484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. García-Mateo, N.; Ganfornina, M.D.; Montero, O.; Gijón, M.A.; Murphy, R.C.; Sanchez, D. Schwann cell-derived Apolipoprotein D controls the dynamics of post-injury myelin recognition and degradation. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Navarro, A.; Tolia, J.; Astudillo, A.; Del Valle, E. Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neurosci. Lett.* **1998**, *254*, 17–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Navarro, A.; Rioseras, B.; del Valle, E.; Martínez-Pinilla, E.; Astudillo, A.; Tolia, J. Expression pattern of Myelin-Related Apolipoprotein D in human multiple sclerosis lesions. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*, 254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Loerch, P.M.; Lu, T.; Dakin, K.A.; Vann, J.M.; Isaacs, A.; Geula, C.; Wang, J.; Pan, Y.; Gabuzda, D.H.; Li, C.; et al. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. De Magalhães, J.P.; Curado, J.; Church, G.M. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 875–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ong, W.Y.; He, Y.; Suresh, S.; Patel, S.C. Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* **1997**, *79*, 359–367. [[CrossRef](#)]
50. Franz, G.; Reindl, M.; Patel, S.C.; Beer, R.; Unterrichter, I.; Berger, T.; Schmutzhard, E.; Poewe, W.; Kampfl, A. Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury. *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 1615–1625. [[CrossRef](#)]
51. Martínez, E.; Navarro, A.; Ordóñez, C.; Del Valle, E.; Tolia, J. Oxidative stress induces apolipoprotein d overexpression in hippocampus during aging and alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *36*, 129–144. [[CrossRef](#)]
52. Martínez, E.; Navarro, A.; Ordóñez, C.; Del Valle, E.; Tolia, J. Amyloid- β 25-35 induces apolipoprotein D synthesis and growth arrest in HT22 hippocampal cells. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *30*, 233–244. [[CrossRef](#)]
53. Bajo-Grañeras, R.; Ganfornina, M.D.; Martín-Tejedor, E.; Sanchez, D. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia* **2011**, *59*, 1551–1566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Do Carmo, S.; Levros, L.C.; Rassart, E. Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2007**, *1773*, 954–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Martínez-Pinilla, E.; Rubio-Sardón, N.; Peláez, R.; García-álvarez, E.; Del Valle, E.; Tolivia, J.; Larráyoz, I.M.; Navarro, A. Neuroprotective effect of apolipoprotein d in cuprizone-induced cell line models: A potential therapeutic approach for multiple sclerosis and demyelinating diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Bajo-Grañeras, R.; Sanchez, D.; Gutierrez, G.; González, C.; Do Carmo, S.; Rassart, E.; Ganfornina, M.D. Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 949–960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Dassati, S.; Waldner, A.; Schweigreiter, R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1632–1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ordoñez, C.; Navarro, A.; Perez, C.; Astudillo, A.; Martínez, E.; Tolivia, J. Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol. Histopathol.* **2006**, *21*, 361–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Waldner, A.; Dassati, S.; Redl, B.; Smania, N.; Gandolfi, M. Apolipoprotein D Concentration in Human Plasma during Aging and in Parkinson's Disease: A Cross-Sectional Study. *Parkinsons. Dis.* **2018**, *2018*, 3751516. [[CrossRef](#)]
60. Muffat, J.; Walker, D.W. Apolipoprotein D: An overview of its role in aging and age-related diseases. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 269–273. [[CrossRef](#)]
61. Pascua-Maestro, R.; Diez-Hermano, S.; Lillo, C.; Ganfornina, M.D.; 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*, e1006603. [[CrossRef](#)]
62. Fyfe-Desmarais, G.; Desmarais, F.; Rassart, É.; Mounier, C. Apolipoprotein D in Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1027. [[CrossRef](#)]
63. Sanchez, D.; Ganfornina, M.D. The Lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 1587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Glöckner, F.; Ohm, T.G. Hippocampal apolipoprotein D level depends on Braak stage and APOE genotype. *Neuroscience* **2003**, *122*, 103–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Muffat, J.; Walker, D.W.; Benzer, S. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7088–7093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Reindl, M.; Knipping, G.; Wicher, I.; Dilitz, E.; Egg, R.; Deisenhammer, F.; Berger, T. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2001**, *119*, 327–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Stoop, M.P.; Singh, V.; Dekker, L.J.; Titulaer, M.K.; Stingl, C.; Burgers, P.C.; Sillevius Smitt, P.A.E.; Hintzen, R.Q.; Luider, T.M. Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Do Carmo, S.; Jacomy, H.; Talbot, P.J.; Rassart, E. Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 10330–10338. [[CrossRef](#)]
69. Lin, P.; Sun, J.; Lou, X.; Li, D.; Shi, Y.; Li, Z.; Ma, P.; Li, P.; Chen, S.; Jin, W.; et al. Consensus on potential biomarkers developed for use in clinical tests for schizophrenia. *Gen. Psychiatry* **2022**, *35*, e100685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Jauhar, S.; Johnstone, M.; McKenna, P.J. Schizophrenia. *Lancet* **2022**, *399*, 473–486. [[CrossRef](#)]
71. Mandal, P.K.; Gaur, S.; Roy, R.G.; Samkaria, A.; Ingole, R.; Goel, A. Schizophrenia, Bipolar and Major Depressive Disorders: Overview of Clinical Features, Neurotransmitter Alterations, Pharmacological Interventions, and Impact of Oxidative Stress in the Disease Process. *ACS Chem. Neurosci.* **2022**, *13*, 2784–2802. [[CrossRef](#)]
72. Pagsberg, A.K. Schizophrenia spectrum and other psychotic disorders. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **2013**, *22*, 3–9. [[CrossRef](#)]
73. Li, M.; Gao, Y.; Wang, D.; Hu, X.; Jiang, J.; Qing, Y.; Yang, X.; Cui, G.; Wang, P.; Zhang, J.; et al. Impaired Membrane Lipid Homeostasis in Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **2022**, *48*, 1125–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Thomas, E.A.; Dean, B.; Pavey, G.; Sutcliffe, J.G. Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: Implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4066–4071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Thomas, E.A.; Dean, B.; Scarr, E.; Copolov, D.; Sutcliffe, J.G. Differences in neuroanatomical sites of apoD elevation discriminate between schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **2003**, *8*, 167–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Thomas, E.A.; Danielson, P.E.; Austin Nelson, P.; Pribyl, T.M.; Hilbush, B.S.; Hasel, K.W.; Gregor Sutcliffe, J. Clozapine increases apolipoprotein D expression in rodent brain: Towards a mechanism for neuroleptic pharmacotherapy. *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 789–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mahadik, S.P.; Khan, M.M.; Evans, D.R.; Parikh, V.V. Elevated plasma level of apolipoprotein D in schizophrenia and its treatment and outcome. *Schizophr. Res.* **2002**, *58*, 55–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Perkins, D.O.; Jeffries, C.D.; Addington, J.; Bearden, C.E.; Cadenhead, K.S.; Cannon, T.D.; Cornblatt, B.A.; Mathalon, D.H.; McGlashan, T.H.; Seidman, L.J.; et al. Towards a Psychosis Risk Blood Diagnostic for Persons Experiencing High-Risk Symptoms: Preliminary Results from the NAPLS Project. *Schizophr. Bull.* **2015**, *41*, 419–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Rodrigues, J.E.; Martinho, A.; Santa, C.; Madeira, N.; Coroa, M.; Santos, V.; Martins, M.J.; Pato, C.N.; Macedo, A.; Manadas, B. Systematic Review and Meta-Analysis of Mass Spectrometry Proteomics Applied to Human Peripheral Fluids to Assess Potential Biomarkers of Schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4917. [[CrossRef](#)]

80. Raiszadeh, M.M.; Ross, M.M.; Russo, P.S.; Schaepper, M.A.; Zhou, W.; Deng, J.; Ng, D.; Dickson, A.; Dickson, C.; Strom, M.; et al. Proteomic analysis of eccrine sweat: Implications for the discovery of schizophrenia biomarker proteins. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 2127–2139. [[CrossRef](#)]
81. Csozsz, Emri, G.; Kalló, G.; Tsapraillis, G.; Tozsér, J. Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2015**, *29*, 2024–2031. [[CrossRef](#)]
82. Khan, M.M.; Parikh, V.V.; Mahadik, S.P. Antipsychotic drugs differentially modulate apolipoprotein D in rat brain. *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 1089–1100. [[CrossRef](#)]
83. Thomas, E.A.; George, R.C.; Gregor Sutcliffe, J. Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: Implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2003**, *69*, 421–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kuiperij, H.B.; Hondius, D.C.; Kersten, I.; Versleijen, A.A.M.; Rozemuller, A.J.M.; Greenberg, S.M.; Schreuder, F.H.B.M.; Klijn, C.J.M.; Verbeek, M.M. Apolipoprotein D: A potential biomarker for cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2020**, *46*, 431–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Khoonsari, P.E.; Ossipova, E.; Lengqvist, J.; Svensson, C.I.; Kosek, E.; Kadetoff, D.; Jakobsson, P.J.; Kultima, K.; Lampa, J. The human CSF pain proteome. *J. Proteom.* **2019**, *190*, 67–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Kroksveen, A.C.; Gulbrandsen, A.; Vedeler, C.; Myhr, K.M.; Opsahl, J.A.; Berven, F.S. Cerebrospinal fluid proteome comparison between multiple sclerosis patients and controls. *Acta Neurol. Scand.* **2012**, *126*, 90–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Li, X.; Miyajima, M.; Mineki, R.; Taka, H.; Murayama, K.; Arai, H. Analysis of potential diagnostic biomarkers in cerebrospinal fluid of idiopathic normal pressure hydrocephalus by proteomics. *Acta Neurochir.* **2006**, *148*, 859–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Gupta, A.K.; Pokhriyal, R.; Khan, M.I.; Kumar, D.R.; Gupta, R.; Chadda, R.K.; Ramachandran, R.; Goyal, V.; Tripathi, M.; Hariprasad, G. Cerebrospinal fluid proteomics for identification of α 2-macroglobulin as a potential biomarker to monitor pharmacological therapeutic efficacy in dopamine dictated disease states of Parkinson's disease and schizophrenia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2019**, *15*, 2853–2867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Dong, M.; Lu, L.; Zhang, L.; Zhang, Q.; Ungvari, G.S.; Ng, C.H.; Yuan, Z.; Xiang, Y.; Wang, G.; Xiang, Y.T. Prevalence of suicide attempts in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* **2019**, *29*, e63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. McIntyre, R.S.; Alda, M.; Baldessarini, R.J.; Bauer, M.; Berk, M.; Correll, C.U.; Fagiolini, A.; Fountoulakis, K.; Frye, M.A.; Grunze, H.; et al. The clinical characterization of the adult patient with bipolar disorder aimed at personalization of management. *World Psychiatry* **2022**, *21*, 364–387. [[CrossRef](#)]
91. Magioncalda, P.; Martino, M. A unified model of the pathophysiology of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **2022**, *27*, 202–211. [[CrossRef](#)]
92. Dean, B.; Digney, A.; Sundram, S.; Thomas, E.; Scarr, E. Plasma apolipoprotein E is decreased in schizophrenia spectrum and bipolar disorder. *Psychiatry Res.* **2008**, *158*, 75–78. [[CrossRef](#)]
93. Knöchel, C.; Kniep, J.; Cooper, J.D.; Stäblein, M.; Wenzler, S.; Sarlon, J.; Prvulovic, D.; Linden, D.E.J.; Bahn, S.; Stocki, P.; et al. Altered apolipoprotein C expression in association with cognition impairments and hippocampus volume in schizophrenia and bipolar disorder. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **2017**, *267*, 199–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Smirnova, L.; Seregin, A.; Boksha, I.; Dmitrieva, E.; Simutkin, G.; Kornetova, E.; Savushkina, O.; Letova, A.; Bokhan, N.; Ivanova, S.; et al. The difference in serum proteomes in schizophrenia and bipolar disorder. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Monroe, S.M.; Harkness, K.L. Major Depression and Its Recurrences: Life Course Matters. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **2022**, *18*, 329–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Liu, Q.; He, H.; Yang, J.; Feng, X.; Zhao, F.; Lyu, J. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study. *J. Psychiatr. Res.* **2020**, *126*, 134–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Dadkhah, M.; Jafarzadehgharehzaaddin, M.; Molaei, S.; Akbari, M.; Gholizadeh, N.; Fathi, F. Major depressive disorder: Biomarkers and biosensors. *Clin. Chim. Acta* **2023**, *547*, 117437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Otte, C.; Gold, S.M.; Penninx, B.W.; Pariante, C.M.; Etkin, A.; Fava, M.; Mohr, D.C.; Schatzberg, A.F. Major depressive disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 16065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Xu, H.B.; Zhang, R.F.; Luo, D.; Zhou, Y.; Wang, Y.; Fang, L.; Li, W.J.; Mu, J.; Zhang, L.; Zhang, Y.; et al. Comparative proteomic analysis of plasma from major depressive patients: Identification of proteins associated with lipid metabolism and immunoregulation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2012**, *15*, 1413–1425. [[CrossRef](#)]
100. Stelzhammer, V.; Haenisch, F.; Chan, M.K.; Cooper, J.D.; Steiner, J.; Steeb, H.; Martins-de-Souza, D.; Rahmoune, H.; Guest, P.C.; Bahn, S. Proteomic changes in serum of first onset, antidepressant drug-naïve major depression patients. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2014**, *17*, 1599–1608. [[CrossRef](#)]
101. Lee, M.Y.; Kim, E.Y.; Kim, S.H.; Cho, K.C.; Ha, K.; Kim, K.P.; Ahn, Y.M. Discovery of serum protein biomarkers in drug-free patients with major depressive disorder. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *69*, 60–68. [[CrossRef](#)]
102. Najjar, S.; Pearlman, D.M.; Devinsky, O.; Najjar, A.; Zagzag, D. Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: A review of clinical and experimental evidence. *J. Neuroinflammation* **2013**, *10*, 142. [[CrossRef](#)]

103. Pan, S.J.; Tan, Y.L.; Yao, S.W.; Xin, Y.; Yang, X.; Liu, J.; Xiong, J. Fluoxetine induces lipid metabolism abnormalities by acting on the liver in patients and mice with depression. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 1463–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Benton, C.S.; Miller, B.H.; Skwerer, S.; Suzuki, O.; Schultz, L.E.; Cameron, M.D.; Marron, J.S.; Pletcher, M.T.; Wiltshire, T. Evaluating genetic markers and neurobiochemical analytes for fluoxetine response using a panel of mouse inbred strains. *Psychopharmacology* **2012**, *221*, 297–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Lee, H.; Rhee, S.J.; Kim, J.; Lee, Y.; Kim, H.; Lee, J.; Lee, K.; Shin, H.; Kim, H.; Lee, T.Y.; et al. Predictive protein markers for depression severity in mood disorders: A preliminary trans-diagnostic approach study. *J. Psychiatr. Res.* **2021**, *142*, 63–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Atmaca, M.; Kuloglu, M.; Tezcan, E.; Ustundag, B. Serum leptin and cholesterol values in violent and non-violent suicide attempters. *Psychiatry Res.* **2008**, *158*, 87–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Olić, E.; Picot, M.C.; Guillaume, S.; Abbar, M.; Courtet, P. Measurement of total serum cholesterol in the evaluation of suicidal risk. *J. Affect. Disord.* **2011**, *133*, 234–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Lalovic, A.; Levy, E.; Luheshi, G.; Canetti, L.; Grenier, E.; Sequeira, A.; Turecki, G. Cholesterol content in brains of suicide completers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2007**, *10*, 159–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Freemantle, E.; Mechawar, N.; Turecki, G. Cholesterol and phospholipids in frontal cortex and synaptosomes of suicide completers: Relationship with endosomal lipid trafficking genes. *J. Psychiatr. Res.* **2013**, *47*, 272–279. [[CrossRef](#)]
110. Frühbeis, C.; Fröhlich, D.; Kuo, W.P.; Krämer-Albers, E.M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 182. [[CrossRef](#)]
111. Kumar, A.; Stoica, B.A.; Loane, D.J.; Yang, M.; Abulwerdi, G.; Khan, N.; Kumar, A.; Thom, S.R.; Faden, A.I. Microglial-derived microparticles mediate neuroinflammation after traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation* **2017**, *14*, 47. [[CrossRef](#)]
112. Kano, S.I.; Dohi, E.; Rose, I.V.L. Extracellular vesicles for research on psychiatric disorders. *Schizophr. Bull.* **2019**, *45*, 7–16. [[CrossRef](#)]
113. Basso, M.; Bonetto, V. Extracellular vesicles and a novel form of communication in the brain. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Li, Y.; Gui, Y.; Zhao, M.; Chen, X.; Li, H.; Tian, C.; Zhao, H.; Jiang, C.; Xu, P.; Zhang, S.; et al. The roles of extracellular vesicles in major depressive disorder. *Front. Psychiatry* **2023**, *14*, 1138110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Pascua-Maestro, R.; González, E.; Lillo, C.; Ganfornina, M.D.; Falcón-Pérez, J.M.; Sanchez, D. Extracellular vesicles secreted by astroglial cells transport apolipoprotein D to neurons and mediate neuronal survival upon oxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *12*, 526. [[CrossRef](#)]
116. Hirota, T.; King, B.H. Autism Spectrum Disorder: A Review. *JAMA* **2023**, *329*, 157–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Wang, L.; Wang, B.; Wu, C.; Wang, J.; Sun, M. Autism Spectrum Disorder: Neurodevelopmental Risk Factors, Biological Mechanism, and Precision Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Frye, R.E.; Vassall, S.; Kaur, G.; Lewis, C.; Karim, M.; Rossignol, D. Emerging biomarkers in autism spectrum disorder: A systematic review. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, 792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Edlow, A.G.; Vora, N.L.; Hui, L.; Wick, H.C.; Cowan, J.M.; Bianchi, D.W. Maternal obesity affects fetal neurodevelopmental and metabolic gene expression: A pilot study. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 88661. [[CrossRef](#)]
120. Esnafoglu, E.; Cirrik, S. Apo D and Apo E levels in Autism spectrum disorders. *Asian J. Psychiatr.* **2022**, *73*, 103177. [[CrossRef](#)]
121. Navarro, A.; Del Valle, E.; Juárez, A.; Martínez, E.; Ordóñez, C.; Astudillo, A.; Tolivia, J. Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *Age* **2010**, *32*, 85–96. [[CrossRef](#)]
122. Camato, R.; Marcel, Y.L.; Milne, R.W.; Lussier-Cacan, S.; Weech, P.K. Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J. Lipid Res.* **1989**, *30*, 865–875. [[CrossRef](#)]
123. Hari, A.; Cruz, S.A.; Qin, Z.; Couture, P.; Vilmundarson, R.O.; Huang, H.; Stewart, A.F.R.; Chen, H.H. IRF2BP2-deficient microglia block the anxiolytic effect of enhanced postnatal care. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Kim, K.S.; Lee, K.W.; Baek, I.S.; Lim, C.M.; Krishnan, V.; Lee, J.K.; Nestler, E.J.; Han, P.L. Adenylyl cyclase-5 activity in the nucleus accumbens regulates anxiety-related behavior. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 105–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Huang, T.L.; Wu, S.C.; Chiang, Y.S.; Chen, J.F. Correlation between serum lipid, lipoprotein concentrations and anxious state, depressive state or major depressive disorder. *Psychiatry Res.* **2003**, *118*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Lewohl, J.M.; Wang, L.; Miles, M.F.; Zhang, L.; Dodd, P.R.; Adron Harris, R. Gene expression in human alcoholism: Microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2000**, *24*, 1873–1882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Mayfield, R.D.; Lewohl, J.M.; Dodd, P.R.; Herlihy, A.; Liu, J.; Harris, R.A. Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 802–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Flatscher-Bader, T.; Van Der Brug, M.; Hwang, J.W.; Gochee, P.A.; Matsumoto, I.; Niwa, S.I.; Wilce, P.A. Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 359–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Flatscher-Bader, T.; Wilce, P.A. Chronic smoking and alcoholism change expression of selective genes in the human prefrontal cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2006**, *30*, 908–915. [[CrossRef](#)]
130. Mukhopadhyay, P.; Horn, K.H.; Greene, R.M.; Michele Pisano, M. Prenatal exposure to environmental tobacco smoke alters gene expression in the developing murine hippocampus. *Reprod. Toxicol.* **2010**, *29*, 164–175. [[CrossRef](#)]

131. Befort, K.; Filliol, D.; Darcq, E.; Ghatte, A.; Matifas, A.; Lardenois, A.; Muller, J.; Thibault, C.; Dembele, D.; Poch, O.; et al. Gene expression is altered in the lateral hypothalamus upon activation of the mu opioid receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1129*, 175–184. [[CrossRef](#)]
132. Zhou, Z.; Yuan, Q.; Mash, D.C.; Goldman, D. Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6626–6631. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

