

# ISOFORMAS DE LA APOLIPOPROTEINA E REGULAN LA EXPRESION DE LA CITOQUINA CCL-1 EN CULTIVOS PRIMARIOS HIPOCAMPALES

J Rodríguez<sup>1,2</sup>, J Flores-Cuadra<sup>1,3</sup>, A Madrid<sup>1,2</sup>, K Mata<sup>1,2,3</sup>, R DeJesús<sup>2</sup>, MB Carreira<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Neurociencia, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología AIP (INDICASAT AIP), <sup>2</sup>Bioterio, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología AIP (INDICASAT AIP), <sup>3</sup>Panama Aging Research Initiative (PARI), <sup>4</sup>Sistema Nacional de Investigación (SNI), SENACYT

@memoriaysalud / joserrrodriguez10@hotmail.com

## Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una preocupación global debido a su naturaleza neurodegenerativa. La patología de la EA incluye la acumulación de péptido amiloide beta, fosforilación de tau y neuroinflamación. Un factor de riesgo en la EA es la apolipoproteína E (apoE), que se expresa en tres alelos (apoE2, apoE3 y apoE4) que influyen en el riesgo y la progresión de la enfermedad. La neuroinflamación es también una patología central de la EA donde las citoquinas, pequeñas proteínas de señalización, desempeñan un papel esencial. La quimiocina CCL1 regula procesos celulares como la concentración de calcio intracelular, la migración celular y la apoptosis, un mecanismo de muerte celular programada. Esta investigación se enfoca en la relación entre los alelos de apoE, el péptido amiloide beta y la regulación de la citoquina CCL1 en cultivos primarios neuronales. Evaluamos además, la quimiocina IL-18, cuya expresión disminuye significativamente en una cohorte panameña de personas con EA. La comprensión de estas interacciones podría tener implicaciones importantes para futuras terapias y estrategias de manejo de esta enfermedad neurodegenerativa.

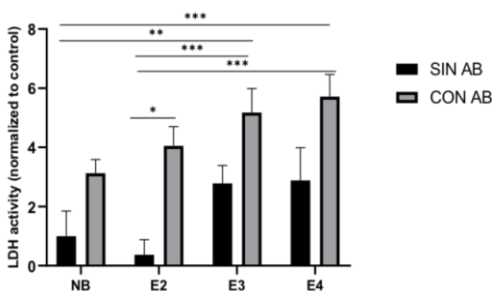
## Métodos

- Se prepararon cultivos celulares primarios de hipocampo a partir de ratas Sprague Dawley de 17 a 19 días de gestación (E17-E19). El tejido se trituró mecánicamente luego de digestión en tripsina. Células viables se sembraron a  $1.2 \times 10^5$  células por pocillo. Los cultivos se estimularon con vehículo (neurobasal, NB), 30  $\mu$ M de ApoE y 10  $\mu$ M de oligómeros amiloide beta (A $\beta$ ) por 24h.
- La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). La actividad de LDH se midió de acuerdo con el protocolo del fabricante en sobrenadantes de los cultivos estimulados.
- Para la detección de las proteínas CCL1 e IL-18 en los sobrenadantes del cultivo celular, se utilizó un ensayo de ELISA de tipo sándwich. Se siguieron las instrucciones del fabricante y utilizando series de dilución de proteínas de rata CCL1 e IL-18 como estándares. Cada condición se evaluó por triplicado y se normalizó a la condición control para evaluar cambios relativos.



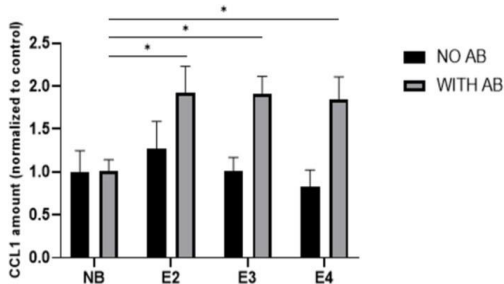
**Figura 1.** Evolución morfológica de neuronas piramidales del hipocampo obtenidas de embriones E17-19 de ratas Sprague Dawley de la colonia del INDICASAT AIP. **A)** Neuronas en día *in vitro* 1, magnificación 400x. **B)** Neuronas en día *in vitro* 3, y **C)** día *in vitro* 6. Magnificación 100x.

## Resultados



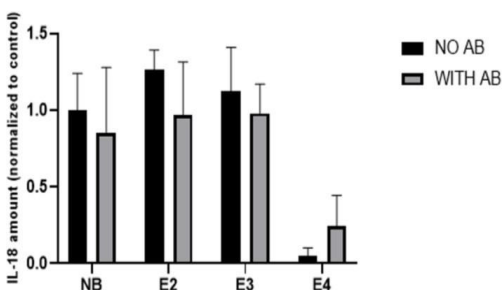
**Figura 1) Viabilidad celular. Actividad de LDH en presencia de alelos de ApoE y A $\beta$**

Los cultivos fueron tratados por 24 horas con 30  $\mu$ M de las isoformas ApoE y 10  $\mu$ M amiloide beta. La viabilidad celular de neuronas hipocámpales disminuye en presencia de las isoformas ApoE y amiloide beta ( $p=0.0038$  y  $p<0.0001$ , respectivamente)



**Figura 2) Expresión de la quimiocina CCL-1 en presencia de isoformas de ApoE y A $\beta$**

CCL-1 se midió mediante ensayo de ELISA en presencia de 30  $\mu$ M de las isoformas de ApoE y 10  $\mu$ M A $\beta$ . observamos un incremento significativo de la expresión de CCL-1 en presencia de A $\beta$  ( $p=0.0003$ ), en la presencia de ApoE3 y A $\beta$  ( $p=0.0348$ ) y ApoE4 y A $\beta$  ( $p=0.0131$ ), más no en presencia de ApoE2.



**Figura 3) Expresión de la quimiocina IL-18 en presencia de isoformas de ApoE y A $\beta$**

IL-18 se midió mediante ensayo de ELISA en presencia de 30  $\mu$ M de las isoformas de ApoE y 10  $\mu$ M A $\beta$ . se observó que A $\beta$ , ApoE 2 y ApoE 3 no afectan los niveles de IL-18. ApoE 4 en ausencia o presencia de A $\beta$  aparenta disminuir la expresión de IL-18 (datos pilotos).

## Conclusión

- La presencia de ApoE y A $\beta$  redujo la viabilidad celular. En estas condiciones, no observamos una regulación diferencial de acuerdo a la isoforma. Este hallazgo puede sugerir que más ApoE, independiente de isoforma, promueve la muerte celular.
- La quimiocina CCL1 se expresa en mayor cantidad en presencia de A $\beta$ , y en presencia de ApoE3 y A $\beta$ , y ApoE4 y A $\beta$ . Estos datos sugieren que CCL-1 es inducida por amiloide y esta involucrada en la patología de la EA.
- La quimiocina IL-18, una proteína proinflamatoria, se encontró disminuida en presencia de ApoE4, lo que sugiere que APOE4 podría limitar procesos neuroinflamatorios necesarios para la homeostasis cerebral.

## Agradecimientos

Este estudio es financiado por el proyecto FID 22-037 de la SENACYT y por el contrato 66- 2021 del SNI.

## Referencias

- Villarreal, A. E., Bryant, S. E. O., Edwards, M., & Grajales, S. (2016). Serum-based protein profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in elderly Hispanics. *Neurodegenerative Disease Management*, 6, 203–213. <https://doi.org/10.2217/nmt-2015-0009>
- Serrano-Pozo, A., Das, S., & B. T. H. (2021). APOE and Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Lancet Neurology*, 20(1), 68-80. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30412-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30412-9)
- Belloy, M. E., Napolioni, V., & Greicius, M. D. (2019). A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron*, 101(5), 820–838. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.056>