

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO D BiOQVÍMiCA Y BiOLOGíA MOLECULAR

**RECEPTORES IMPLICADOS EN EL EFECTO
NEUROTRÓFICO DEL ÁCIDO OLEICO DURANTE
EL DESARROLLO DEL SNC**

**ANDRÉ FÁBIO BENTO ABREU
2008**

D. JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ, Catedrático de Universidad y D^a ARÁNZAZU TABERNERO URBIETA, Profesora Titular de Universidad, adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

AUTORIZAN

La presentación de la Tesis Doctoral: “Receptores implicados en el efecto neurotrófico del ácido oleico durante el desarrollo del SNC”, realizada bajo su dirección por el Licenciado en Bioquímica D. André Fábio Bento Abreu en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, firman el documento en Salamanca, a 11 de Marzo de 2008

Fdo. José María Medina Jiménez

Fdo. Aránzazu Tabernero Urbieta

ILMO. SR. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

ABREVIATURAS

15d-PGJ2 – 15-Desoxi- Δ 12,14-Prostaglandina J2
AINES – antiinflamatorios no esteroideos
AMPS – persulfato amónico
AP2 – proteína adaptadora 2
BSA – albúmina bovina sérica
BHE – barrera hematoencefálica
bHLH – *basic Helix Loop Helix*
CPZ - clorpromazina
CtxB – toxina colérica B
Cy3 – cianina 3
DAPI – 4', 6 – diamidino - 2 – fenilindol dihidrocloruro
DEPC - dietilpirocarbonato
DIV – días *in vitro*
DBD – dominio de unión al DNA
DMEM – medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTPs – desoxinucleótidos trifosfato
DTT – ditioneitol
FBS – suero fetal bovino
FITC – isotiocianato de fluoresceína
GABA – ácido γ -butírico
GAP-43 – proteína asociada al crecimiento 43
GAPDH – gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa
GFAP – proteína ácida fibrilar de la glía
GPI-AP – proteína acoplada a glicosilfosfatidilinositol
GRP78 – proteína relacionada con la glucosa 78
IGF – factor de crecimiento de insulina
IL-2 – interleucina 2
kDa – kilodalton
LBD – dominio de unión al ligando
LPL – lipoproteína lipasa
MAP-2 – proteína asociada a microtúbulos 2
MAPK – proteína kinasa activada por mitógenos

mRNA – ácido ribonucleico mensajero

myr- ψ PKC(20–28) – péptido miristoilado basado en el dominio del pseudosustrato de la
PKC

N-CAM – molécula de adhesión celular neuronal

NF- κ B – factor nuclear κ B

NGF – factor de crecimiento nervioso

OEA - oleoiletanolamida

pb – pares de bases

PBS – tampón fosfato salino

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

PDH – piruvato dehidrogenasa

PI(4,5)P₂ – fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato

PKC – proteína kinasa C

PMSF – fenil-metil-sulfonil-fluoruro

PPARs – receptores activados por proliferadores de peroxisomas

PPRE – elemento de respuesta al PPAR

PTK – proteína tirosina kinasa

p/v – peso/volumen

RT – transcripción inversa

RE – retículo endoplasmático

RXR – receptor del retinoico X

SCD – estearil CoA desaturasa

SDS – dodecilsulfato sódico

SEM – error estándar de la media

Shh – *Sonic hedgehog*

siRNA – RNA de intererencia de cadena corta

SNC – sistema nervioso central

SREBP – proteína que se une al elemento regulado por estrógenos

TBS – tampón Tris salino

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina

TGN38 – proteína del trans-Golgi 38

TNF – factor de necrosis tumoral

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desarrollo celular en el sistema nervioso central	1
1.1.1 Desarrollo neuronal del SNC	1
1.1.1.1 Neurogénesis y migración neuronal	2
1.1.1.2 Agregación celular	6
1.1.1.3 Diferenciación neuronal	6
1.1.1.3.1 Proteína asociada al crecimiento, GAP-43	8
1.1.1.3.2 Proteína asociada a microtúbulos, MAP-2	9
1.1.1.4 Sinaptogénesis	10
1.1.1.5 Muerte neuronal	11
1.1.2. Células gliales en el SNC	12
1.1.2.1. Astrocitos	12
1.1.2.2. Oligodendrocitos	15
1.1.2.3. Microglía	16
1.2 La albúmina: función y captación	17
1.2.1 Estructura y funciones de la albúmina	17
1.2.2 La albúmina en el cerebro	19
1.2.2.1 La albúmina y el factor neurotrófico ácido oleico	22
1.2.2.2 Relevancia clínica de la albúmina	25
1.2.3 Captación de la albúmina	25
1.3 La endocitosis	30
1.3.1 Fagocitosis	31
1.3.2 Macropinocitosis	31
1.3.3 Endocitosis dependiente de clatrina	32
1.3.3.1 Formación, invaginación y escisión de la vesícula de clatrina	32
1.3.3.2 Disociación del recubrimiento de clatrina y destino de la vesícula ..	35
1.3.4 Endocitosis dependiente de caveolas	36
1.3.4.1 Composición de las caveolas	37
1.3.4.2 Ligandos e inducción de la endocitosis	38
1.3.4.3 Formación, escisión e internalización de las caveolas	39
1.3.4.4 Destino de la caveola	40
1.3.4.5 Otras funciones de las caveolinas	40
1.3.5 Endocitosis independiente de clatrina y de caveolas	41
1.3.5.1 Formación, escisión, internalización y destino de los <i>rafts</i>	42

1.3.6 Redundancia en los procesos de endocitosis.....	43
1.4 Los PPARs.....	45
1.4.1 Isoformas y estructura.....	45
1.4.2 Ligandos	46
1.4.3 Activación transcripcional por PPARs.....	47
1.4.4 Expresión del mRNA de los PPARs	50
1.4.5 Papel de los PPARs en el metabolismo lipídico	51
1.4.6 Nuevas funciones de los PPARs	55
1.4.6.1 Los PPARs en las respuestas inflamatorias	56
1.4.6.2 Los PPARs en aterosclerosis	56
1.4.6.3 Los PPARs en inmunidad.....	58
1.4.6.4 Los PPARs y el cáncer.....	58
1.4.6.5 Los PPARs en el cerebro	59
2. PLAN DE TRABAJO	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1 Material	67
3.1.1 Especie ensayada y condiciones del animalario.....	67
3.1.2 Medios instrumentales.....	67
3.1.3 Productos.....	69
3.1.3.1 Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares.	69
3.1.3.2 Productos utilizados en los experimentos para el análisis del mRNA.....	70
3.1.3.3 Productos utilizados en los experimentos para el análisis de proteínas	70
3.1.3.4 Productos utilizados en los tratamientos celulares.....	71
3.1.3.5 Productos empleados para el silenciamiento génico	72
3.1.3.6 Otros productos	72
3.2 Métodos	73
3.2.1 Preparación de los cultivos celulares.....	73
3.2.1.1 Preparación del cultivo primario de astrocitos.....	73
3.2.1.2 Preparación del cultivo primario de neuronas	74
3.2.2 Preparación de la albúmina libre de ácidos grasos.....	75
3.2.3 Tratamientos celulares	75
3.2.3.1 Tratamientos celulares en astrocitos	75
3.2.3.2 Tratamientos celulares en neuronas.....	76

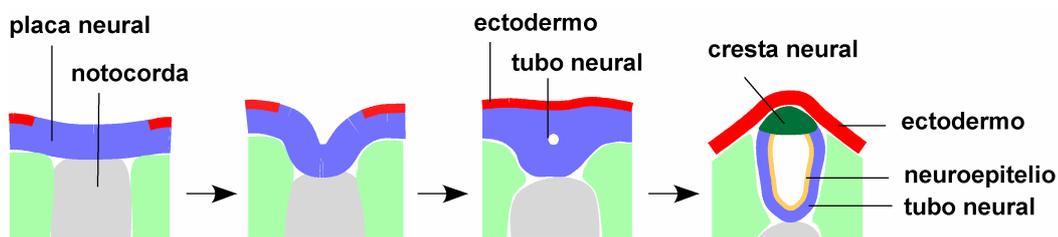
3.2.4 RT-PCR	76
I. Extracción del RNA total de los cultivos	76
II. Cuantificación del RNA.....	77
III. Transcripción inversa (RT)	77
IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	77
V. Electroforesis de DNA.....	78
3.2.5 Transfección del siRNA	78
3.2.6 Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western.....	79
I a. Extracción de proteínas de neuronas.....	79
I b. Extracción de proteínas de astrocitos	80
II. Cuantificación de proteínas	80
III. Preparación de los geles	80
IV. Preparación de las muestras para la electroforesis	81
V. Electroforesis de proteínas.....	81
VI. Electrotransferencia	81
VII. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana	81
VIII. Inmunodetección.....	81
3.2.7 Inmunoprecipitación	82
3.2.8 Inmunocitoquímica	83
3.2.9 Análisis estadístico.....	84
4. RESULTADOS.....	85
4.1 Estudio de la participación del receptor multiligando megalina en la internalización de la albúmina en astrocitos.....	87
4.1.1 La megalina se expresa en astrocitos en cultivo primario.....	87
4.1.2 Evolución de la expresión de la megalina durante el desarrollo postnatal del cerebro	88
4.1.3 La albúmina interacciona con la megalina en la membrana de los astrocitos.....	89
4.1.4 La megalina funciona como receptor de albúmina en astrocitos.....	90
4.1.4.1 Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en astrocitos en cultivo primario	90
4.1.4.2 El silenciamiento de megalina disminuye la unión e internalización de albúmina en astrocitos	91

4.2 Estudio de la vía de endocitosis empleada en la internalización de la albúmina en astrocitos. Participación de la caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina	95
4.2.1 La caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina se expresan en astrocitos en cultivo primario	95
4.2.2 La albúmina y la megalina interaccionan con las caveolinas, pero no con la clatrina, en la unión y en la internalización de la albúmina en los astrocitos	96
4.2.3 La albumina se localiza en las caveolas y no en las vesículas recubiertas de clatrina en los astrocitos.....	100
4.2.4 El silenciamiento de las caveolinas, pero no de la clatrina, disminuye la unión y la internalización de la albúmina en los astrocitos	101
4.2.5 La albúmina se localiza en el retículo endoplasmático y en el trans-Golgi durante su internalización.....	107
4.3 Receptores implicados en el efecto neurotrófico del ácido oleico durante el desarrollo del SNC. Estudio de la participación de los receptores nucleares PPAR	110
4.3.1 Efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas en cultivo primario...	110
4.3.2 PPAR α , PPAR β y PPAR γ se expresan en neuronas en cultivo primario	112
4.3.3 La activación del PPAR β y del PPAR γ por agonistas específicos no induce la diferenciación neuronal	112
4.3.4 Los agonistas del PPAR α , en presencia de albúmina, inducen la diferenciación neuronal	114
4.3.5 Los efectos del ácido oleico y del agonista del PPAR α Wy14643 no son sinérgicos ni aditivos.....	119
4.3.6 El ácido oleico activa PPAR α en neuronas en cultivo primario.....	119
4.3.7 La proteína kinasa C esta implicada en el efecto neurotrófico del ácido oleico y de OEA	121
4.3.8 El silenciamiento de PPAR α previene la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico	122
4.3.8.1 Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en neuronas en cultivo primario.....	123
4.3.8.2 El silenciamiento de PPAR α previene la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico	123

5. DISCUSIÓN	131
5.1 La megalina es el receptor de la albúmina en astrocitos, mediando su internalización a través de endocitosis dependiente de caveolas.....	133
5.2 El PPARα es el receptor del ácido oleico en neuronas.....	138
6. CONCLUSIONES	141
7. BIBLIOGRAFÍA	145

1.1 Desarrollo celular en el sistema nervioso central

Durante el desarrollo embrionario ocurre la formación del sistema nervioso a partir del ectodermo. Este proceso, conocido como neurulación, tiene inicio con la invaginación de la blástula, que origina la placa neural. El cierre de la placa neural forma el tubo neural, compuesto por una capa de células neuroepiteliales denominadas neuroblastos o células madre neurales. Los neuroblastos dan origen a las neuronas funcionales y maduras. Tras la formación de los neuroblastos, ocurre la formación de los glioblastos, que generan los astrocitos y los oligodendroblastos, ambas células inmaduras, que son los precursores de los astrocitos y de los oligodendrocitos, respectivamente. Mientras que las neuronas y las células gliales del sistema nervioso central (SNC) derivan de una región especializada del ectodermo del embrión (la placa neural), las células del sistema nervioso periférico tienen origen en el mesodermo (en la cresta neural). La cresta neural tiene origen a partir de células localizadas en la línea donde el tubo neural se despega del ectodermo y que migran hacia el mesodermo. (Alberts et al. 1996) (Esquema 1).



Esquema 1. Formación del tubo neural. Cambios morfológicos que tienen lugar durante la neurulación.

1.1.1 Desarrollo neuronal del SNC

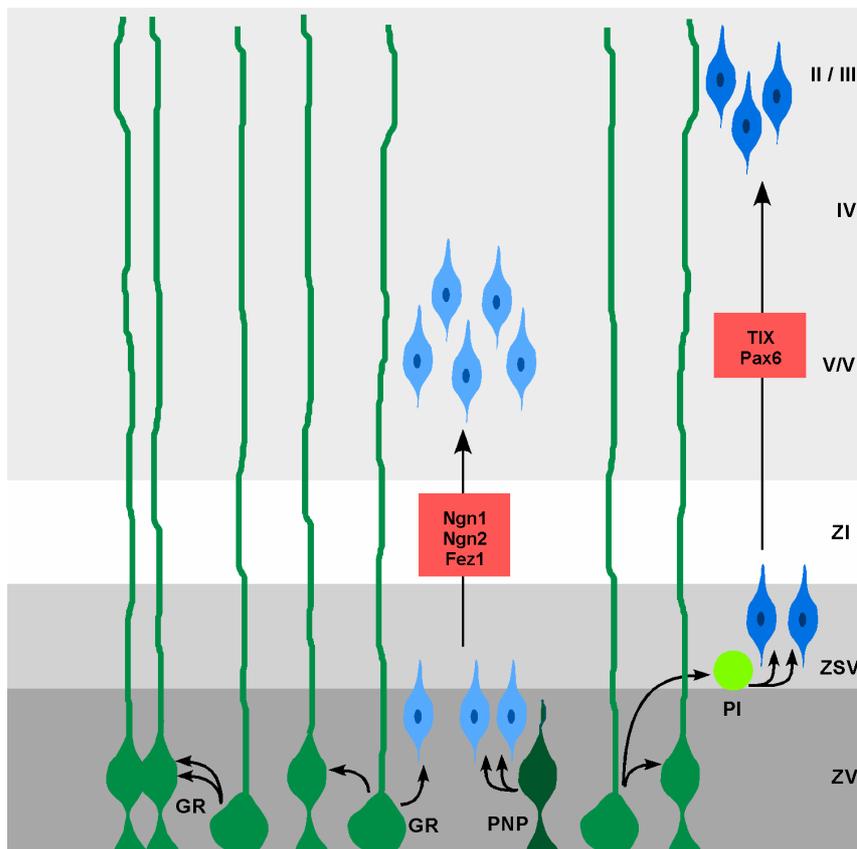
El desarrollo neuronal del sistema nervioso de los mamíferos comprende una sucesión de fenómenos interrelacionados entre sí que, clásicamente, se dividen en las siguientes fases (Cowan 1987; Herschkowitz 1988): neurogénesis y migración neuronal, agregación neuronal, diferenciación celular, sinaptogénesis y muerte neuronal.

1.1.1.1 Neurogénesis y migración neuronal

El período de la neurogénesis es diferente en cada especie. En el hombre está comprendida entre los días 40 y 125 de la gestación (Rakic 1978), mientras que en el ratón ocurre entre los días 10,5 y 19 de la gestación (Caviness and Takahashi 1995) y en la rata comienza el día 14 y finaliza el día 20 de la gestación (Miller 1985). Comparativamente, la neurogénesis en la rata tiene lugar en un período de la gestación posterior al que se produce en el hombre. Las implicaciones de esta neurogénesis temprana en el hombre no se conocen, pero existe la posibilidad de que las neuronas necesiten un período largo de adaptación al medio para poder ejercer funciones altamente especializadas, como son la memoria, el aprendizaje, etc (Rakic 1985). Sin embargo, para una misma especie animal, el período de proliferación neuronal depende de la región del SNC (Bayer 1995). Así, por ejemplo, en el hipocampo de la rata el número de neuronas sigue aumentando hasta el primer año de vida postnatal (Herschkowitz 1988).

La neurogénesis tiene inicio con las primeras divisiones celulares simétricas proliferativas, en que cada célula neuroepitelial origina dos, expandiéndose así el número de estos progenitores neurogénicos (Molyneaux et al. 2007). Estas células se acumulan en la superficie ventricular del tubo neural, designada zona ventricular (ZV). A continuación, ocurren muchas divisiones asimétricas, que generan una célula neuroepitelial y una neurona o una célula neuroepitelial y un progenitor neurogénico diferenciado (sin la capacidad ilimitada de división celular, característica de las células madre), como la glia radial y los precursores neurales pequeños (Noctor et al. 2004; Gotz and Huttner 2005; Gal et al. 2006). Los precursores neurales pequeños sufren solamente divisiones simétricas diferenciadoras, generando dos neuronas, mientras que la glia radial puede, además, dividirse asimétricamente generando una célula de glia radial y una neurona o una célula de glia radial y otro progenitor neurogénico, los progenitores intermedios (o basales) (Esquema 2). Esta expansión celular origina la formación de la otra capa proliferativa, adyacente a la ZV, conocida como zona subventricular (ZSV), formada el día 12,5 de la gestación del ratón. Los progenitores intermedios migran para la ZSV antes de dividirse simétricamente en dos neuronas (Haubensak et al. 2004; Noctor et al. 2004). Así, la glia radial es, directa o indirectamente, la principal fuente de neuronas del córtex cerebral (Gotz and Huttner 2005). Además de las neuronas piramidales glutamatérgicas generadas por los progenitores de las ZV y ZSV, la placa cortical del telencéfalo dorsal está formada por interneuronas (que contienen ácido γ -aminobutírico) generadas por progenitores localizados en el telencéfalo ventral y que migran tangencialmente hacia la PC (Tan et al.

1998). Para migrar desde la zona proliferativa hasta la corteza cerebral, las neuronas se guían por las células de glia radial (Rakic 1972). Al final de la gestación, las células de glia radial se transforman en astrocitos fibrosos (Schmechel and Rakic 1979) o en neuronas (Hartfuss et al. 2001; Noctor et al. 2001).



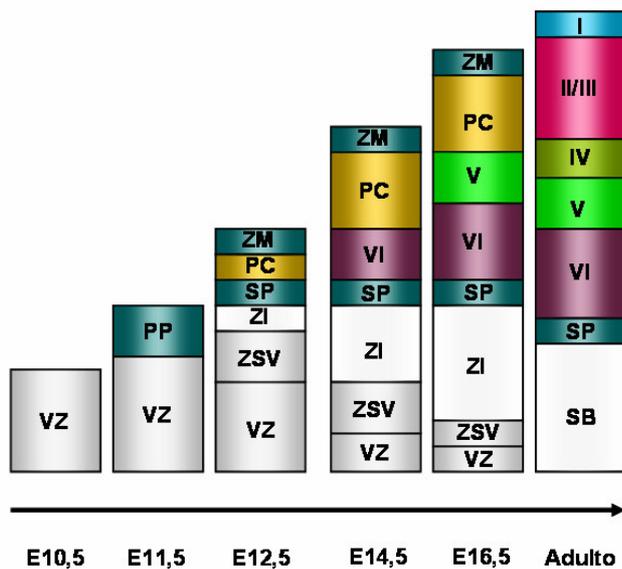
Esquema 2. Neurogénesis y migración neuronal. Representación de los tipos de divisiones celulares de los progenitores neurogénicos que ocurren durante la neurogénesis del ratón y de la migración de las neuronas recién generadas. Por cuestiones de simplificación, se representa en el mismo esquema los dos tipos de migración neuronal y las capas superiores e inferiores del córtex. Tras las divisiones simétricas y asimétricas de las células del neuroepitelio, se generan en la zona ventricular (ZV) los progenitores neurogénicos: glia radial (GR) y precursores neuronales pequeños (PNP). La GR proyecta elongaciones hasta la parte superior del córtex, mientras que los PNP poseen procesos basales pequeños. Los precursores neurales pequeños sufren solamente divisiones simétricas diferenciadoras, generando dos neuronas, mientras que la glia radial puede, además, dividirse asimétricamente generando una célula de glia radial y una neurona o una célula de glia radial y otro progenitor neurogénico, los progenitores intermedios (PI). Los progenitores intermedios migran para la zona subventricular (ZSV) antes de dividirse simétricamente en dos. Los progenitores de la ZV (GR y PNP) dan origen a las neuronas de generación temprana, que migran radialmente para las capas inferiores V y VI de la placa cortical, mientras que los progenitores de la ZSV (PI) dan origen a las neuronas de generación tardía, que migran radialmente para las capas superiores II-IV de la placa cortical (Noctor et al. 2004). Estudios realizados con ratones knockout mostraron que los factores de transcripción neurogenina-1 y neurogenina-2 (Ngn1 y Ngn2, ambos de tipo bHLH) y Fez1 se requieren para la especificación en las capas inferiores de las neuronas generadas en la ZV. Los factores de transcripción Pax6 y Tlx cooperan entre sí para controlar la especificación en las capas superiores de las neuronas generadas en la ZSV (Dehay and Kennedy 2007). ZI, zona intermedia.

Algunos factores como las moléculas de adherencia de la célula nerviosa (N-CAM), junto con las N-caderinas, pueden participar en el reconocimiento entre las neuronas y las células gliales (Edelman 1983; Takeichi 1988). De hecho, experimentos realizados en cultivos celulares muestran el fenómeno de migración de las neuronas a lo largo de las células gliales Bergman en el cerebelo (Hatten and Mason 1986). Sus resultados indican que se establecen puntos de contacto entre las neuronas y las células de la glía y que existen moléculas de naturaleza glicoproteica que regulan el proceso de migración neuronal. La migración neuronal puede seguir otras vías además de las relacionadas con las células gliales radiales (Austin and Cepko 1990; Walsh and Cepko 1992). En este sentido, se ha descrito que moléculas como el GABA pueden actuar como quimioatrayentes para las neuronas embrionarias de la corteza cerebral (Behar et al. 1996).

No se conocen bien los factores que regulan la proliferación de los neuroblastos. Sin embargo, existe la posibilidad de que algunos neurotransmisores, como la serotonina, la noradrenalina, la acetilcolina, el GABA y la dopamina actúen como señales reguladoras de la neurogénesis (Fedoroff 1987; Herschkowitz 1988). Algunos estudios demuestran que el péptido intestinal vasoactivo podría intervenir en la regulación de la mitosis de los neuroblastos (Pincus et al. 1990). Por otra parte, se ha sugerido que el potencial de membrana podría jugar un importante papel en la mitogénesis celular (Cowan 1987). También se cree que la insulina y las hormonas tiroideas pueden actuar en esta fase del desarrollo neuronal. En este sentido, se ha descrito que la máxima expresión de los receptores de insulina y del factor de crecimiento insulínico (IGF) durante el desarrollo del cerebro de la rata, coincide con el período de proliferación neuronal. Sin embargo, los niveles de dichos receptores permanecen relativamente altos durante fases posteriores del desarrollo neuronal (Garofalo and Rosen 1989). Asimismo, en fases embrionarias del cerebro de pollo se han encontrado receptores de insulina y del IGF (De Pablo and Roth 1990). Se ha observado que el IGF-I y el factor de crecimiento derivado de los fibroblastos (bFGF) son factores mitogénicos (Dicicco-Bloom et al. 1998). Asimismo, en trabajos realizados en cultivo se ha demostrado que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimula la proliferación de los neuroblastos siempre y cuando estas células hayan estado previamente en contacto con bFGF (Cattaneo and McKay 1990). También se ha descrito la presencia de receptores de hormonas tiroideas, en concreto de 3,3',5-triiodotironina, en fases tempranas del desarrollo cerebral, aunque la importancia de las hormonas tiroideas es mucho mayor durante fases posteriores y, en concreto, durante la mielinización (Dussault and Ruel 1987; Timiras and Nzekwe 1989; Ferreiro et al. 1990).

La neurogénesis parece estar regulada negativamente por el factor de crecimiento glial (GGF), una proteína codificada por el gen neurregulina (Jessell and Sanes 2001a). También el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) demostró ser un factor antimitogénico (Dicicco-Bloom et al. 1998).

La corticogénesis o desarrollo de la corteza cerebral del ratón (descrita en el esquema 3) difiere de los primates. Comparativamente, las zonas proliferativas (ZV y ZSV) en los primates son mayores. Además, hay una importante expansión de la ZSV, que forma la ZSV exterior (ZSVE), que no existe en los roedores. La ZSVE es, en los primates, la principal área de producción de neuronas, que se destinan a las capas superiores del neocórtex. La existencia de la ZSVE es una evolución adaptativa del córtex cerebral de los primates (Rash and Grove 2006). La regulación de la corticogénesis y del modelado de la corteza cerebral esta, aparentemente, regulado por las moléculas señalizadoras BMPs, Wnt, Shh y Fgf8, que actúan en las zonas proliferativas neurogénicas generando informaciones para el correcto posicionamiento de la corteza (Fukuchi-Shimogori and Grove 2001; Hebert et al. 2002; Garel et al. 2003)



Esquema 3. Corticogénesis en el ratón. En el ratón, las primeras neuronas se generan en el día 10,5 de gestación y forman una capa denominada preplaca (PP). A continuación, las neuronas recién-generadas forman la placa cortical (CP), que divide la preplaca en una zona marginal (ZM) y en una subplaca (SP) de neuronas transitorias que yace bajo la placa cortical (Caviness 1982). Los axones de estas neuronas, junto con axones en crecimiento desde el tálamo, establecen la zona intermedia (ZI). Las neuronas generadas por los progenitores de la zona ventricular (ZV), la glia radial y los precursores neurales pequeños, forman las capas inferiores V y VI de la placa cortical, mientras que las neuronas generadas por los progenitores de la zona subventricular (ZSV), los precursores intermedios, forman las capas superiores II-IV de la CP (Noctor et al. 2004). La zona marginal origina la capa superior I de la placa cortical (CP), que se convierte en la sustancia gris de la corteza cerebral y las ZV y ZSV se convierten en la sustancia blanca de la corteza cerebral del adulto (Jessell and Sanes 2001b).

1.1.1.2 Agregación celular

Cuando las neuronas llegan a su localización definitiva tienden a agregarse formando las diferentes capas de la corteza cerebral o bien grupos nucleares. Algunas moléculas de naturaleza glicoproteica, y/o glicolípida, intervienen en la formación de interacciones entre neuronas (Herschkowitz 1988). Empleando cultivos celulares se ha puesto de manifiesto que las superficies gliales pueden favorecer el proceso de agregación neuronal y que sustancias como la poli-L-lisina también favorecen dicha agregación (Vernadakis 1988). Además, la laminina, una glicoproteína presente en la matriz extracelular, parece ser una molécula que favorece este proceso (Luckenbill 1997).

1.1.1.3 Diferenciación neuronal

La diferenciación neuronal se caracteriza por el crecimiento del cuerpo celular, la elaboración de axones y dendritas seguida de su crecimiento en longitud y grosor y el agrupamiento de los cuerpos neuronales formando acumulaciones de las que parten radialmente las neuritas. Esta distribución da lugar a la disposición en materia blanca y materia gris que adoptan las neuronas en el SNC y a la adquisición de la propiedad de propagar potenciales de acción. En la rata el proceso de diferenciación neuronal comienza prenatalmente y dura también hasta la tercera semana de vida postnatal. En el hombre, la diferenciación neuronal empieza en el período prenatal y puede durar hasta los cuatro años de edad (Meisami and Timiras 1982; Herschkowitz 1988).

En las neuronas existen unas zonas que Ramón y Cajal denominó conos de crecimiento, donde se originan las dendritas y los axones (Herschkowitz 1988; Caviness 1989). Los conos de crecimiento guían a los axones convirtiendo las señales positivas y negativas en órdenes que determinan el trayecto y la rapidez de crecimiento del axón. La capacidad sensitiva del cono de crecimiento depende, en gran medida, de sus filopodios. Los filopodios son estructuras ricas en actina, muy móviles, que poseen receptores para moléculas que sirven como señales de dirección al axón (Sanes and Jessell 2001).

Es necesaria la presencia de un sustrato permisivo que permita el avance de los conos de crecimiento. Los conos de crecimiento reconocen diferencias entre los sustratos en los que crecen y esto puede regular la dirección y la velocidad de su crecimiento. Se han identificado numerosas sustancias capaces de favorecer el crecimiento in vitro de los

axones, tales como el colágeno, la fibronectina y algunos proteoglicanos. Son de especial importancia las lamininas, componentes de todas las láminas basales de los seres vivos. Los conos de crecimiento poseen una serie de proteínas (integrinas) capaces de interactuar con las lamininas de la matriz extracelular (Raper and Tessier-Lavigne 1999) y transmitir esta información al interior de la célula.

La unión con el sustrato permisivo no es suficiente para que se produzca el desarrollo de las neuronas inmaduras. Algunos neuropéptidos, como la somatostatina, la colecistoquinina, la sustancia P o el péptido intestinal vasoactivo, parecen estar estrechamente relacionados con los fenómenos de elongación axónica y de interconexión celular (Hayashi 1992). Por otro lado, factores tróficos como el NGF, neurotransmisores como la serotonina, la dopamina o la acetilcolina, así como interacciones con células gliales, también parecen estar implicados en este proceso (Hatten and Mason 1986; Vernadakis 1988; Ivins and Pittman 1989).

Los axones de larga proyección tienden a crecer juntos en un fascículo común. La fasciculación de los axones está favorecida por la presencia de N-CAM (Caviness 1989).

Durante la diferenciación neuronal se activan los procesos de síntesis de RNA y de proteínas, aumenta la actividad de enzimas como la acetilcolinesterasa, la Na⁺-K⁺-ATPasa, la tirosina hidroxilasa, la GABA transaminasa, etc. Asimismo, aumenta la actividad de las enzimas de la glucólisis, del ciclo tricarboxílico y de la síntesis de lípidos (Meisami and Timiras 1982).

El proceso de diferenciación neuronal está favorecido por la insulina y el IGF. La insulina estimula la síntesis de proteínas, aumenta ciertas actividades enzimáticas en cultivos de neuronas y favorece la producción de neuritas y la adquisición de la capacidad para la neurotransmisión (Baskin et al. 1987). Asimismo, se ha comprobado que algunos neurotransmisores, como el GABA y la serotonina, favorecen el crecimiento de las neuritas y el mantenimiento de las neuronas en cultivo (Spoerri 1988; Hamon et al. 1989; Lipton and Kater 1989; Michler 1990; Barbin et al. 1993). También el NGF ejerce efectos neurotróficos sobre las fibras adrenérgicas periféricas *in vivo* e *in vitro* (Levi-Montalcini 1982) y las colinérgicas del SNC (Houlgatte et al. 1989). Existen pruebas de que la somatostatina aumenta el crecimiento de las neuritas (Bulloch 1987; Grimm-Jorgensen 1987). Asimismo, se sugirió que el piruvato favorece el crecimiento de las neuronas del SNC en cultivo (Varon et al. 1987). También la presencia de astrocitos favorece el crecimiento de las neuronas (Seaton et al. 1988). Recientemente, se ha demostrado que los astrocitos sintetizan ácido oleico que se comporta como un factor neurotrófico (Taberner et al. 2001) (véase, Sección 1.2.2).

1.1.1.3.1 Proteína asociada al crecimiento, GAP-43

Durante los procesos de crecimiento neuronal, tanto durante el desarrollo neuronal como en procesos de regeneración, la expresión de GAP-43 es máxima y encontrarse limitada al sistema nervioso, siendo, así, considerada marcadora de la diferenciación axonal (Skene 1989; Benowitz and Routtenberg 1997; Oestreicher et al. 1997). Esta proteína desaparece durante la vida adulta, quedando confinada en zonas cerebrales de alta plasticidad o en terminales sinápticos relacionados con la llamada potenciación a largo plazo, un proceso que se supone asociado a la memoria (Benowitz and Routtenberg 1997).

Tanto en el SNC como en el SNP, la expresión de la GAP-43 comienza a aparecer en las neuronas postmitóticas, una vez que se han dividido y han migrado a su destino final. La GAP-43 se localiza fundamentalmente en los axones en crecimiento y, sobre todo, en los conos de crecimiento uniéndose a la membrana mediante interacción con la F-actina, formando, así, la estructura interna de los axones (Skene and Virág 1989; Oestreicher et al. 1997).

En el ratón, la GAP-43 alcanza su máxima expresión el día 4 de vida postnatal en el SNP y en las dos primeras semanas de vida postnatal en el SNC. A partir de este momento cae su expresión, aunque en ciertas poblaciones de neuronas se detecta la GAP-43 en estadios posteriores (Benowitz and Routtenberg 1997; Oestreicher et al. 1997).

La expresión del gen de la GAP-43 está muy restringido en las células neurales. La regulación de la actividad del promotor de la GAP-43 está mediada por una serie de factores de transcripción, miembros de la familia bHLH. Estos factores de transcripción se unen a la caja E1, localizada en el promotor P1 del gen de la GAP-43, y modulan positiva o negativamente la expresión del gen. Hasta el momento se han descrito seis factores de transcripción de esta familia, cuatro de ellos son represores de la transcripción (ME1a, E12, MES-1, MASH-1) y dos son activadores (NeuroD y NDRF) (Chiaramello et al. 1996; Ohtsuka et al. 1998). La expresión de la GAP-43 está también regulada a nivel del mRNA. Así, NGF aumenta tres veces la vida media del mRNA de la GAP-43. Además, se ha propuesto que el aumento de la estabilidad del mRNA de la GAP-43 por el NGF está mediado por la activación de la proteína kinasa C (PKC) (Perrone-Bizzozero et al. 1993; Taberner et al. 2001).

Una de las características estructurales más sorprendentes de la GAP-43 es su extrema hidrosolubilidad, hecho que no es habitual en una proteína asociada con membranas. Se sintetiza como proteína soluble y su asociación a la membrana probablemente está

mediada por unión covalente de la región hidrofóbica del extremo amino-terminal a ácidos grasos. Esta región contiene un dominio activador de la proteína G. En la parte intermedia existe el denominado dominio IQ, compuesto de 12-15 aminoácidos, que constituye el sitio de unión a calmodulina. Además, en la parte intermedia existe un sitio de fosforilación para la proteína G, en la serina 41 que, a su vez, regula la unión de la GAP-43 a calmodulina. En el extremo carboxilo-terminal se localiza el motivo F, el cual interacciona con los componentes del citoesqueleto (Skene 1989).

1.1.1.3.2 Proteína asociada a microtúbulos, MAP-2

Las proteínas MAP-2 se expresan en el sistema nervioso, siendo unas de las proteínas más abundantes en el cerebro (Olmsted 1986; Schoenfeld and Obar 1994). La MAP-2 tiene varias isoformas, formadas a partir de un único gen por *splicing* alternativo del pre-mRNA (Maccioni and Cambiasso 1995). Dentro del sistema nervioso, las MAP-2 de alto peso molecular, MAP-2a y MAP-2b (~300 kDa), se expresan específicamente en las dendritas de las neuronas (Schoenfeld and Obar 1994) y raramente en los axones, por lo que se pueden considerar proteínas marcadoras de la diferenciación dendrítica neuronal (Cáceres et al. 1984; Cáceres et al. 1986; Dinsmore and Solomon 1991). Estas isoformas difieren en su patrón de expresión durante el desarrollo cerebral. En fases embrionarias, y hasta el día 10 de vida postnatal, la única MAP-2 de alto peso molecular que se expresa en el cerebro es la MAP-2b. La MAP-2a aparece en etapas más tardías del desarrollo, expresándose mayoritariamente en el cerebro adulto.

Todas las MAP-2 tienen, en la región carboxilo terminal, un dominio de unión a la tubulina y, además, una región rica en prolina. Se piensa que la región carboxilo-terminal de la molécula de MAP-2 está fuertemente unida a los microtúbulos, mientras que el resto de la molécula se proyecta fuera de la superficie de los microtúbulos como brazo, por lo que se le denomina “dominio de proyección” (Sánchez et al. 2000).

Además de asociarse a los microtúbulos para estabilizarlos y promover su ensamblaje, la MAP-2 ejerce un importante papel en el crecimiento de las neuritas (Woolf 1998). Otras funciones de la MAP-2 se resumen en su participación en la morfogénesis neuronal, en la dinámica del citoesqueleto, en el empaquetamiento de los microtúbulos y en el tráfico de orgánulos en los axones y las dendritas (Dinsmore and Solomon 1991).

Los patrones de expresión diferencial de las isoformas de MAP-2 y sus mRNAs durante el desarrollo del sistema nervioso pueden indicar una compleja regulación de su expresión,

tanto a nivel transcripcional o post-transcripcional como traduccional (Sánchez et al. 2000). Hasta el momento, los mecanismos de regulación post-traduccional de MAP-2 son mucho mejor conocidos que la regulación de la expresión de la proteína a otros niveles.

La MAP-2 es modificada post-traduccionalmente, en las neuronas durante el desarrollo, por fosforilación y desfosforilación, provocadas por ciertas señales extracelulares (Ávila et al. 1994). Estas modificaciones condicionan la capacidad de la MAP-2 para unirse a los microtúbulos y estabilizarlos. Se ha sugerido que la asociación de las MAPs con kinasas y fosfatasa puede ser esencial para su anclaje al citoesqueleto, así como para su direccionamiento hacia compartimentos específicos neuronales, donde pueden desempeñar sus funciones específicas (Tsunoda et al. 1998).

Es necesario un equilibrio kinasas/fosfatasa para el adecuado recambio y dinámica de los microtúbulos y, en consecuencia, una función neural satisfactoria. Así una hiperfosforilación de las MAP-2 causa su liberación de los microtúbulos, provocando la retracción neurítica e, incluso, la muerte neuronal a largo plazo (Arias et al. 1998). Entre las diversas proteínas kinasas que pueden fosforilar la MAP-2 están la proteína kinasa A (PKA), la proteína kinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII), la PKC y las proteínas kinasas dirigidas por prolina. La desfosforilación de la MAP-2 se lleva a cabo por diversas serina-treonina fosfatasa, tales como las PP1, 2A, 2B (calcineurina) y 2C. Estas enzimas están muy concentradas en el cerebro y asociadas al citoesqueleto. Se cree que las fosfatasa juegan un papel esencial en la regulación de la plasticidad neuronal y en la transmisión sináptica (Sánchez et al. 2000).

1.1.1.4 Sinaptogénesis

Después de migrar y diferenciarse, las neuronas establecen sinapsis. La mayoría de las sinapsis consisten en una región especializada en el saco axónico presináptico, una región receptora en una dendrita postsináptica y una estrecha hendidura entre ambas regiones (Kalil 1990). La sinaptogénesis es un proceso tardío de la diferenciación neuronal, si bien algunas sinapsis aparecen durante fases más tempranas (Caviness 1989).

Entre los factores que pueden estimular la sinaptogénesis se encuentra la serotonina. En este sentido, se ha observado que algunos neurotransmisores, como el GABA y la serotonina, aumentan el desarrollo de neuropilos y de las sinapsis en neuronas en cultivo (Madtes and Redburn 1983; Hamon et al. 1989; Reisert et al. 1989). Asimismo, conviene señalar que, durante el establecimiento de las sinapsis, se produce un incremento en el metabolismo oxidativo cerebral y aumenta la síntesis de fosfolípidos y de colesterol (Meisami and Timiras 1982; Bayer 1985). El colesterol juega, aparentemente, un papel

clave en la sinaptogénesis. Durante este proceso, en el que se requieren elevadas cantidades de colesterol, su síntesis en las neuronas decrece (Poirier 1994). Sin embargo, las células de la glía sintetizan y aportan a las neuronas el colesterol necesario. La disponibilidad de colesterol parece ser el factor limitante para el desarrollo de la sinapsis maduras. Esto explica el retraso en la producción de sinapsis en el SNC en espera de la diferenciación de la glía, así como los efectos patológicos que se manifiestan por alteraciones en la homeostasis del colesterol o las lipoproteínas (Mauch et al. 2001).

Se cree que en la sinapsis existe, además, una importante transferencia bidireccional de sustancias esenciales para la supervivencia y el normal funcionamiento de las células presinápticas y postsinápticas como, por ejemplo, el NGF (Cowan 1987).

1.1.1.5 Muerte neuronal

La muerte neuronal por necrosis se produce como consecuencia de un trauma, de una isquemia o por acción de una sustancia tóxica. La muerte por apoptosis es una muerte programada por la propia célula, mediante un proceso activo que requiere la inducción de la maquinaria enzimática necesaria. Durante este último proceso, las células disminuyen de tamaño, se produce una condensación de la cromatina, una fragmentación del DNA y, por último, sus restos celulares son fagocitados.

La muerte neuronal por apoptosis es frecuente durante el desarrollo del SNC, en que se generan un gran número de neuronas de las que apenas la mitad van a sobrevivir. Esta pérdida tan elevada de neuronas es común a todos los vertebrados y parece ser un mecanismo de adaptación durante el desarrollo del sistema nervioso (Oppenheim 1991). La hipótesis del factor neurotrófico (Hamburger and Levi-Montalcini 1949) puede explicar este fenómeno. Esta hipótesis propone que la supervivencia de las neuronas en desarrollo depende de una serie de factores neurotróficos secretados por las células diana a las que las neuronas van a inervar. Los factores neurotróficos se encuentran en una cantidad limitada y, por ello, sólo las neuronas que consiguen captarlos van a sobrevivir, el resto morirán por apoptosis (Hamburger and Levi-Montalcini 1949). Esta hipótesis se vio reforzada por el descubrimiento del NGF, factor regulador de la apoptosis (Cohen 1960).

1.1.2. Células gliales en el SNC

En el SNC existen fundamentalmente tres grupos de células: neuronas, células macrogliales y células microgliales. Las células macrogliales se pueden subdividir, a su vez, en astrocitos y oligodendrocitos.

1.1.2.1. Astrocitos

Los astrocitos son la glía mayoritaria del SNC. Constituyen una población celular muy heterogénea, habiéndose clasificado en astrocitos protoplasmáticos y astrocitos fibrosos. Los astrocitos protoplasmáticos son más grandes, poco ramificados y se localizan, fundamentalmente, en la sustancia gris. Los astrocitos fibrosos son más ramificados y se localizan en la sustancia blanca. Además, inmunocitoquímicamente, los astrocitos se han clasificado como astrocitos tipo-1 y astrocitos tipo-2 (Raff 1989). Esta clasificación se ha realizado fundamentalmente en astrocitos en cultivo. In vivo, la presencia de astrocitos tipo-2 es controvertida, se han detectado en las proximidades de los nódulos de Ranvier, por lo que se han considerado funcionalmente como astrocitos fibrosos de las fibras mielínicas (French-Constant et al. 1986). También se han detectado astrocitos tipo-2 en las lesiones cerebrales producidas en la epilepsia experimental desarrollada con ácido kaínico (Represa et al. 1993; Niquet et al. 1994).

Los astrocitos llevan a cabo una gran variedad de funciones en el SNC. Así, inducen la formación de la barrera hematoencefálica (BHE), desempeñan un importante papel durante el desarrollo y la neurogénesis, mantienen una cooperación metabólica con las neuronas, regulan la composición iónica del líquido extracelular del SNC, recaptan neurotransmisores, ejercen una importante función neuroprotectora y presentan excitabilidad en respuesta a la actividad neuronal.

Los astrocitos disponen de apéndices bastantes largos, algunos de los cuales forman los pies terminales que rodean los capilares cerebrales. A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, las células endoteliales de los capilares cerebrales están fuertemente conectadas por las uniones estrechas o "tight junctions". Los astrocitos inducen a las células endoteliales a formar estas uniones, así como la síntesis de los transportadores y de las enzimas característicos de la BHE (Janzer and Raff 1987). La principal función de la BHE es regular el movimiento de nutrientes y otras moléculas entre la sangre y el cerebro. Esta

barrera mantiene un medio estable para las neuronas, evita la entrada de muchas sustancias tóxicas y protege a las neuronas de neurotransmisores circulantes como noradrenalina y glutamato (Kandel et al. 2001). Además, la BHE controla la salida de moléculas tóxicas desde el cerebro hasta la sangre. Este es el caso del glutamato, un neurotransmisor citotóxico en altas concentraciones que posee transportadores en la BHE que facilitan su salida del cerebro cuando la concentración es elevada (O'Kane et al. 1999).

Durante el desarrollo embrionario, una de las funciones principales de los astrocitos es la de servir de soporte y guía en la migración de las neuronas postmitóticas, así como en la emisión de prolongaciones axónicas. Así, para migrar desde las zonas proliferativas hasta la corteza cerebral, las neuronas inmaduras se guían por células de glia radial (Rakic 1972). Además, otro papel de los astrocitos durante el desarrollo es la síntesis de factores neurotróficos como el ácido oleico, que induce la expresión de proteínas marcadoras de la diferenciación neuronal (Taberner et al. 2001).

En el cerebro adulto, los astrocitos también sirven de soporte y guía durante la formación de nuevas sinapsis. Parece ser que entre las sustancias implicadas en este mecanismo están la N-CAM y las N-caderinas (Edelman 1983; Takeichi 1988). Además, los astrocitos promueven en el adulto la neurogénesis en la zona subventricular (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002) y en el hipocampo (Song et al. 2002) dirigiendo la transformación de células madre de adulto en neuronas.

Las neuronas, debido a la transmisión sináptica, liberan una serie de neurotransmisores al medio, tales como glutamato, aspartato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), etc., lo que trae como consecuencia la disminución de la concentración de intermediarios del ciclo tricarboxílico, principalmente oxalacetato y α -cetoglutarato, que son, fundamentalmente, los precursores de estos neurotransmisores. El hecho de que los astrocitos expresen enzimas de las vías metabólicas que no son expresadas por las neuronas sugiere la existencia de cooperación entre las distintas células vecinas, más que una competición de estas células por los sustratos extracelulares. Los astrocitos, en presencia de una variedad de precursores exógenos, producen intermediarios metabólicos que son exportados al medio extracelular y captados por las neuronas. El lactato, resultado de la depleción del glucógeno y los productos del catabolismo de otras hexosas son considerados nutrientes importantes para la producción de ATP en las neuronas (Dringen et al. 1993; Wiesinger et al. 1997; Medina et al. 1999). La comunicación entre los astrocitos facilita esta cooperación con las neuronas, puesto que muchos de estos sustratos metabólicos son permeables a

través de las uniones comunicantes (Taberner et al. 1996b; Giaume and Venance 1998; Medina et al. 1999). Además, en la actividad sináptica se liberan neurotransmisores como el glutamato, el cual, después de realizar su función, es rápidamente inactivado mediante su captación por los astrocitos. La captación de glutamato tiene un importante papel en el metabolismo de los astrocitos, ya que el glutamato es cotransportado con los iones Na^+ incrementando las concentraciones intracelulares de este ión, hecho que tiene sus repercusiones sobre el metabolismo de los astrocitos (véase (Kirchhoff et al. 2001)). El glutamato se transforma en glutamina mediante la reacción catalizada por la glutamina sintetasa, con el consiguiente consumo de ATP. La glutamina sintetasa es una enzima que no se encuentra presente en neuronas. Por tanto, la glutamina que no tiene acción neurotransmisora es liberada por los astrocitos y rápidamente captada por las neuronas, donde se desamina para formar glutamato (Schousboe 1981). De manera similar ocurre con otros neurotransmisores, como el GABA (Minelli et al. 1995).

Los niveles de sodio y potasio deben estar regulados muy finamente en el espacio que rodea a las neuronas para que tengan lugar adecuadamente los potenciales de acción. En otros tejidos, los iones externos residen en el fluido del espacio extracelular. Sin embargo, el espacio existente en el cerebro entre las neuronas está ocupado por las finas prolongaciones astrocíticas. Esto dio lugar a la hipótesis denominada amortiguación espacial de potasio (Orkand et al. 1966). Esta hipótesis propone que los astrocitos retiran el potasio sobrante del espacio extracelular procedente de la actividad neuronal y lo transfieren a otras zonas con baja concentración de potasio. La fuerza determinante de este proceso sería el aumento local de potasio extracelular; los astrocitos captarían el potasio debido a la alta permeabilidad que presentan a este ión (Kuffler et al. 1966) y lo transmitirían de unos astrocitos a otros a través de las uniones comunicantes o "gap junctions" (Gardner-Medwin 1986). En este sentido, Mobbs (Mobbs et al. 1988) puso de manifiesto que el acoplamiento entre astrocitos a través de las uniones comunicantes aumentaba su capacidad de amortiguar espacialmente el potasio. Mediante un mecanismo similar, los astrocitos regulan la homeostasis del calcio y de otros iones en el SNC (Sontheimer 1994).

Además, los astrocitos ejercen una importante función neuroprotectora en el sistema nervioso central a diferentes niveles. Como se ha mencionado anteriormente, los astrocitos retiran del medio extracelular los neurotransmisores, hecho que facilita la actividad neuronal (Srebro and Dziobek 2001). Los astrocitos pueden proteger a las neuronas de los efectos tóxicos de los radicales libres por diferentes mecanismos (Srebro and Dziobek 2001; Vega-Agapito et al. 2002). De hecho, las neuronas son menos susceptibles a los

procesos excitotóxicos en presencia de astrocitos (Mattson 1990). Por otro lado, los astrocitos son capaces de sintetizar un gran número de moléculas con acción neuroprotectora como los estrógenos, el IGF-I (Cardona-Gómez et al. 2001), el péptido intestinal vasoactivo y la interleukina-1 (Brenneman et al. 1997).

Finalmente, es importante poner de manifiesto la función neuromoduladora de los astrocitos. Los astrocitos tienen una comunicación bidireccional en el sistema nervioso central, recibiendo señales de neuronas vecinas y respondiéndolas con la liberación de sustancias neuroactivas (Araque et al. 1999). Así, los astrocitos expresan receptores de diversos neurotransmisores y pueden responder apropiadamente a neurotransmisores liberados en las sinapsis. En este sentido, la actividad neuronal dispara ondas de calcio en la red de astrocitos (Dani et al. 1992), además de producir una corriente de entrada de calcio en las células gliales adyacentes, mediada por la activación de los receptores de NMDA permeables al calcio (Linden 1997). Los astrocitos pueden modular el calcio citosólico libre y, por tanto, las características de transmisión de las neuronas cercanas (Nedergaard 1994; Parpura and Basarsky 1994).

1.1.2.2. Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos constituyen el otro subgrupo más importante de la glía. Se distinguen morfológicamente de los astrocitos por sus pequeños cuerpos celulares, en los que el núcleo ocupa una gran proporción de volumen. Como su propio nombre indica tienen, relativamente, pocos apéndices, de los que surge una extensa red de finísimas ramificaciones y membranas en forma arborescente. El papel principal de los oligodendrocitos es formar y mantener la vaina de mielina alrededor de los axones en el SNC. La mielina es la membrana de los oligodendrocitos en su mayor grado de diferenciación. Está compuesta, aproximadamente, por un 30% de proteínas y un 70% de lípidos. Este enriquecimiento característico en lípidos se debe, sobre todo, al colesterol, los cerebrósidos y la fostatidiletanolamina (Bradford 1986). Los cerebrósidos existentes son glicoesfingolípidos que contienen galactosa, esfingosina y ácidos grasos de cadena larga frecuentemente hidroxilados. El enriquecimiento de la mielina en colesterol controla la fluidez de la membrana, debido a su capacidad de adsorber cadenas de ácidos grasos sobre su estructura rígida, plana e hidrofóbica, regulando así la fluidez de la membrana y reduciendo la permeabilidad al agua y a los iones. Aunque parece ser que la clave del efectivo aislamiento de los axones por la mielina es el alto grado de compactación de las capas de mielina, que excluye el fluido extracelular (Bradford 1986).

A pesar de que la síntesis de mielina es altamente dependiente del contacto axonal, los oligodendrocitos pueden regular algunas actividades eléctricas en las neuronas (Kaplan et al. 1997). Estos autores encontraron que los oligodendrocitos inducen el agrupamiento de los canales de sodio en las neuronas. Por otra parte, la actividad eléctrica de los axones vecinos controla la producción, y/o liberación, de factores de crecimiento, que son responsables de la proliferación de las células progenitoras de los oligodendrocitos y, por tanto, ayudan a controlar el número de oligodendrocitos que se desarrollan en la región (véase (Du and Dreyfus 2002)). Por tanto, los oligodendrocitos y las neuronas pueden modular su respectiva diferenciación.

1.1.2.3. Microglía

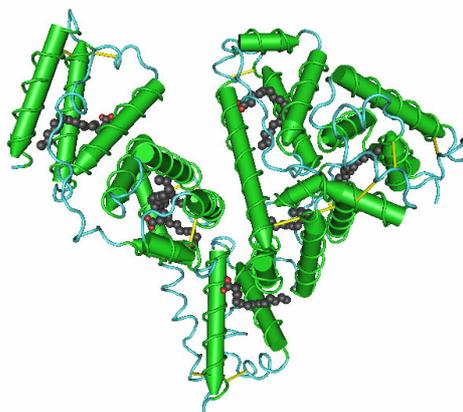
Las células microgliales constituyen, aproximadamente, entre el 5 y el 12% de las células gliales. Considerando que hay diez veces más de células de la glía que de neuronas en el SNC hay, por tanto, como mínimo, tantas células microgliales como neuronas. Fueron descritas por primera vez por Río-Ortega en 1921 y se pueden encontrar en tres estados diferentes: estado de reposo (tal y como se encuentran en condiciones normales en el SNC), activadas (microglía reactiva, presentes en situaciones patológicas) y microglía fagocítica (macrófagos cerebrales) (Streit 1995). Cada estado está caracterizado por una morfología diferente, que abarca desde una forma muy ramificada a una forma ameboide. Como consecuencia de una situación patológica, las células microgliales en reposo se convierten en células activadas y se comportan como el sistema de defensa inmune del SNC. Estas células expresan antígenos MHC de las clases I y II, que son las moléculas que normalmente encontramos en el sistema inmune. Además, muestran una gran actividad fagocitaria y liberan citocinas como, por ejemplo, algunas interleukinas o el factor de necrosis tumoral (TNF).

1.2 La albúmina: función y captación

1.2.1 Estructura y funciones de la albúmina

La albúmina es la proteína plasmática más importante, pues representa cerca del 60% de las proteínas plasmáticas. La albúmina es sintetizada en el hígado como pre-proalbúmina. Este precursor sufre dos cortes consecutivos, en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, respectivamente, obteniéndose la forma madura de la albúmina. La síntesis de la albúmina se encuentra regulada por su propia concentración plasmática y, además, por la ingesta de alimentos (Gekle 2005).

La albúmina está constituida por 585 aminoácidos y tiene un peso molecular de 66,438 KDa. La estructura secundaria de la proteína se define por nueve α -hélices, estabilizadas por 17 puentes disulfuro. La estructura tridimensional de la albúmina, definida por cristalografía, presenta forma de corazón con tres dominios homólogos (designados I, II y III), constituidos cada uno por dos subdominios de 3 α -hélices continuas en paralelo, enfrentándose un par de subdominios para formar un dominio (He and Carter 1992) (Esquema 4). La albúmina tiene una estructura muy resistente y recupera con facilidad su conformación original, principalmente debido a los puentes disulfuro que le proporcionan la rigidez necesaria, especialmente en condiciones fisiológicas.



Esquema 4. Representación tridimensional de la albúmina. Estructura tridimensional de la albúmina sérica humana, con siete moléculas de ácido oleico unidas (Modificado de Sugio y cols, 1999)

La función principal de la albúmina es la unión y transporte de ligandos, tanto endógenos como exógenos. Esto se debe, en gran parte, a la gran flexibilidad de la albúmina, que puede cambiar su conformación fácilmente. Las principales regiones de unión a ligandos se localizan en cavidades hidrofóbicas en los subdominios IIA y IIIA, que muestran una

estructura química similar. De hecho, estudios recientes proponen la existencia de regiones en la molécula de albúmina totalmente inaccesibles al agua (Grdadolnik and Marechal 2005). La albúmina es capaz de unir fuertemente aniones orgánicos, como ácidos grasos de cadena larga, la bilirrubina y la hematina. Sin embargo otras sustancias menos hidrófilas y de menor tamaño, como ácidos grasos de cadena media, el ascorbato o el triptófano, se unen a la albúmina de manera específica, pero con menor afinidad, lo cual favorece su intercambio.

La albúmina humana posee siete sitios de unión a ácidos grasos de cadena larga, tres de los cuales con elevada afinidad para el ácido oleico, y once sitios de unión para ácidos grasos de cadena media (Bhattacharya et al. 2000). Además, la albúmina puede unir sustancias distintas de una manera casi independiente, de forma que la presencia de una sustancia no afecta a la unión de otra. La unión ácido graso-albúmina se produce a través del anión del ácido graso (Spector and Fletcher 1978). Esta unión depende de dos factores fundamentales: es directamente proporcional a la razón molar ácido graso-albúmina y depende de la estructura de la cadena hidrocarbonada del ácido graso. Así, para una misma razón molar ácido graso-albúmina, la fuerza de unión aumenta con la longitud de la cadena y para una misma longitud de la cadena hidrocarbonada, la inserción de un único doble enlace en *cis* aumenta la fuerza de unión. Sin embargo, la inserción de un segundo doble enlace reduce la fuerza de unión con respecto a su ácido graso saturado. En este sentido el ácido graso con más afinidad por la albúmina es el ácido oleico (Curry et al. 1999). La mayoría de los ácidos grasos captados por las células, en complejo con la albúmina, se esterifican y se incorporan a la célula en forma de fosfolípidos, ésteres de colesterol, glicoesfingolípidos o bien se oxidan como fuente de energía. Las membranas plasmáticas mantienen aproximadamente una proporción 1:1 de ácidos grasos saturados e insaturados. Alteraciones en esta proporción producen cambios en la fluidez de la membrana, lo cual altera su funcionalidad (Gurr et al. 2002).

La albúmina es, en condiciones fisiológicas, una molécula electronegativa, pudiendo unir cationes divalentes como el calcio y el magnesio. También es capaz de unir determinadas sustancias endógenas, tales como el folato, eicosanoides, ácidos biliares y metales como el cobre o el zinc. Además, tiene gran importancia su función como transportador secundario o terciario de sustancias normalmente unidas a otras proteínas específicas, tales como la vitamina D, la tiroxina o de grupos de vital importancia fisiológica como es el grupo hemo. De hecho, la albúmina puede actuar como transportador de oxígeno a los tejidos hipóxicos, gracias a la unión de cuatro grupos hemo (Yamamoto et al. 2000).

Además de ligandos endógenos, la albúmina es capaz de unir diferentes fármacos circulantes en el suero, actuando directamente sobre su transporte y eliminación, colaborando así en el papel detoxificador del hígado.

Otra función importante de la albúmina es el mantenimiento de la presión oncótica. En condiciones normales, la albúmina es responsable de hasta un 80% de la presión oncótica normal, regulando el intercambio de fluidos a través de las paredes capilares, dado que es una proteína de alto peso molecular y que se encuentra en altas concentraciones en el plasma sanguíneo (Gekle 2005).

Además, la albúmina constituye la principal defensa antioxidante del plasma, dado que actúa como recolector de radicales libres, de metales de transición y del grupo hemo (Bar-Or et al. 2001).

La albúmina tiene también una función reguladora del pH, al ser capaz de tamponar el pH plasmático gracias a la presencia de un gran número de aminoácidos cargados negativamente. De hecho, ante una disminución de la albúmina en el plasma (por ejemplo como consecuencia de síndrome nefrótico, cirrosis, etc.) ocurre una alcalosis metabólica (Doweiko and Nompleggi 1991).

La albúmina desempeña también un papel en la regulación de la permeabilidad microvascular, al unirse al glicocálix de las células endoteliales. La albúmina actúa como transportador de pequeñas moléculas, mediante su transcitosis a través del endotelio (He and Curry 1993). Además, la albúmina inhibe específicamente la apoptosis en las células endoteliales (Zoellner et al. 1996).

La albúmina posee también efectos anticoagulantes similares a la heparina, uniendo grupos cargados positivamente, como por ejemplo la antitrombina III, a sus grupos sulfato cargados negativamente, inhibiendo, de este modo, la agregación plaquetaria (Joorgensen and Stoffersen 1979).

1.2.2 La albúmina en el cerebro

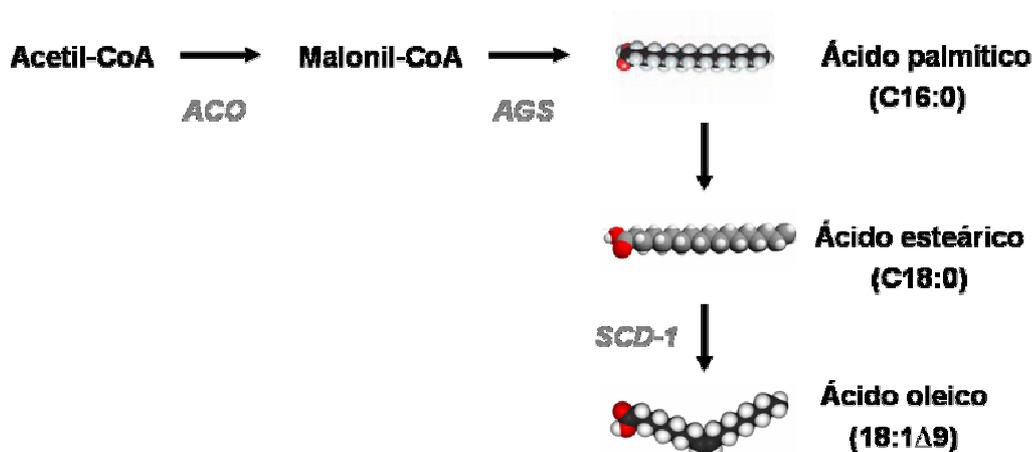
El cerebro del neonato, al contrario que el adulto, capta específicamente albúmina sérica durante el periodo postnatal, coincidiendo con la etapa de máximo desarrollo. Además, varios estudios inmunohistoquímicos realizados en distintas etapas del desarrollo cerebral revelaron la presencia de albúmina en células del cerebro en desarrollo, como neuronas y

astrocitos (Trojan and Uriel 1979; Dziegielewska et al. 1981; Mollgard and Jacobsen 1984), sugiriendo que las células neuronales en desarrollo acumulan albúmina en los estadios iniciales de la diferenciación. Además, tanto las neuronas (Fishman et al. 1990; Granda et al. 2003) como los astrocitos (Juurink and Devon 1990; Tabernero et al. 1999) son capaces de captar albúmina de forma activa.

La presencia de albúmina en el cerebro se puede deber a la existencia de un mecanismo según el cual la albúmina sea transferida de la sangre al cerebro y líquido cefalorraquídeo (LCR). Este mecanismo es específico para la albúmina, puesto que modificaciones químicas de esta proteína impiden su transferencia al cerebro. Además, la albúmina de distintas especies es incapaz de alcanzar el LCR, indicando la existencia de un receptor específico para la albúmina en los capilares sanguíneos, que se expresa sólo durante el desarrollo cerebral (Habgood et al. 1992).

Se ha descrito un papel importante de la albúmina en células cerebrales, como es la regulación de la proliferación astrocítica o el control de los niveles intracelulares de calcio (Nadal et al. 1995). También se ha observado que la albúmina, en ausencia de factores neurotróficos exógenos, es capaz de inhibir *in vitro* la muerte por apoptosis, en un proceso mediado por el glutamato, permitiendo a las neuronas en cultivo mantener su programa de diferenciación (Tabernero et al. 2002b). La albúmina es capaz de promover la síntesis y liberación del glutamato que, una vez en el exterior de la neurona, activa los receptores no NMDA, AMPA/kainato (McDonald and Johnston 1993), promoviendo una cascada de sucesos metabólicos que llevan a la secreción del NGF (Lee et al. 2000). El NGF, en el exterior de la neurona, interacciona con su receptor TrkA, que al autofosforilarse inicia la cadena de inhibición de la apoptosis (Yuan and Yankner 2000). Además, se ha descrito que la albúmina regula el metabolismo de células cerebrales (Vicario and Medina 1992; Tildon 1993). Una de las primeras observaciones relacionadas con el efecto de la albúmina en el desarrollo cerebral fue el efecto drástico de esta proteína en la utilización del lactato por los astrocitos (Vicario et al. 1993). Se observó que, en cultivos primarios de astrocitos, la albúmina aumenta significativamente la utilización de glucosa y lactato mediante la activación de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (Tabernero et al. 1999). Este efecto es específico y dosis-dependiente (alcanza un máximo a concentraciones del 1% (p/v)) y no es mimetizado por otras proteínas, como γ -globulinas, o por compuestos de masa molecular semejante, como el dextrano. Sin embargo, sólo aumenta discretamente otras vías metabólicas, tales como el ciclo tricarboxílico o el ciclo de las pentosas fosfato, indicando que ejerce su efecto específicamente sobre la reacción catalizada por la PDH (Tabernero et al. 1999). Además, el aumento de la actividad de la PDH promovido por la

albúmina es neutralizado por ácidos grasos, sugiriendo que la albúmina aumenta la actividad de la PDH por captación de ácidos grasos o de sus derivados de acil-CoA (Tabernero et al. 1999).



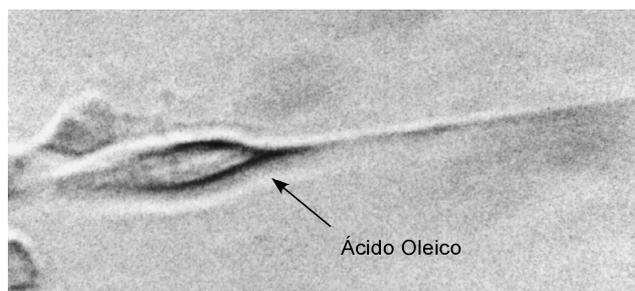
Esquema 5. Biosíntesis del ácido oleico. La primera reacción en la síntesis de los ácidos grasos tiene lugar en el citosol y está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACO), que sintetiza malonil-CoA a partir de acetil-CoA, en una reacción dependiente de la energía liberada por la hidrólisis de ATP. A continuación, mediante una serie de condensaciones y reducciones, el complejo multienzimático ácido graso sintasa (AGS) cataliza la síntesis de una molécula de ácido palmítico a partir de una molécula de acetil-CoA y siete moléculas de malonil-CoA, requiriendo 14 moléculas de NADPH. Enseguida, ocurre la elongación de la cadena de 16 carbonos del palmitil-CoA para formar el estearil-CoA, de 18 carbonos, mediante la adición de un grupo acetilo. Esta elongación se realiza en el retículo endoplasmático, en un proceso similar al catalizado por la ácido graso sintasa. El palmitil-CoA y el estearil-CoA sirven como precursores de los dos ácidos grasos monoinsaturados más comunes en los tejidos de los animales: el ácido palmitoleico, (16:1Δ9) y el ácido oleico (18:1Δ9). Estos ácidos grasos tienen una insaturación en posición *cis* en Δ9 (entre los carbonos 9 y 10), introducida por una reacción de oxidación catalizada por la SCD, la enzima limitante en la síntesis de los ácidos grasos monoinsaturados. Estos ácidos grasos son los principales constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares y una alteración en la expresión de la SCD en el sistema nervioso periférico puede dar lugar a una desmielinización y alteraciones neurológicas. Se debe mencionar que la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa de cerebro de rata tienen una alta actividad durante el período neonatal temprano (Carey 1982), corroborando la importancia de la síntesis del ácido oleico en el desarrollo cerebral.

Dado que la presencia de la albúmina en el cerebro se encuentra regulada en el desarrollo, se ha sugerido que esta proteína pudiera jugar un papel importante en la diferenciación neuronal. Se ha descrito que, en astrocitos, la albúmina aumenta específicamente la biosíntesis del factor neurotrófico ácido oleico, a partir de lactato, glucosa y 3-hidroxi-butirato, de una forma dosis-dependiente (Tabernero et al. 2001). El ácido oleico, o *cis*-9-octadecenoico (18:1cΔ9), es un ácido graso formado por 18 átomos de carbono con una insaturación en posición *cis* en Δ9 (entre los carbonos 9 y 10), introducida por una reacción de oxidación catalizada por la estearil-CoA 9-desaturasa (SCD), la enzima limitante en la síntesis de los ácidos grasos monoinsaturados. La síntesis del ácido oleico se detalla en el esquema 5.

1.2.2.1 La albúmina y el factor neurotrófico ácido oleico

El ácido oleico, sintetizado y liberado por los astrocitos en respuesta a la albúmina, actúa como factor neurotrófico, induciendo la diferenciación neuronal, caracterizada morfológicamente por el agrupamiento neuronal seguido del crecimiento de las neuritas, que terminan diferenciándose en dendritas o axones y, molecularmente, por el aumento de la expresión de las proteínas marcadoras de diferenciación axonal, GAP-43, y dendrítica, MAP-2 (Tabernero et al. 2001; Rodríguez-Rodríguez et al. 2004). El efecto neurotrófico del ácido oleico se ha verificado tanto en cultivos de neuronas en presencia del complejo albúmina-ácido oleico como en co-cultivos de astrocitos y neuronas en presencia de albúmina. La presencia de ácido oleico transforma el cultivo de neuronas en una monocapa, en la que las neuronas se disponen siguiendo los patrones que se observan *in vivo*. En este sentido, se ha observado cómo los somas neuronales se agrupan formando estructuras que se asemejan a la materia gris y prolongan sus axones hasta contactar con las colonias de neuronas adyacentes, dejando un espacio equivalente a la materia blanca en el SNC (Tabernero et al. 2001). El efecto causado por el ácido oleico (18:1 Δ 9) sobre la expresión de la MAP-2 y de la GAP-43 no se observa en presencia de otros ácidos grasos estructuralmente parecidos, tales como el ácido elaidico (18:1 Δ 9) y el ácido palmítico (16:0), lo que demuestra la importancia del doble enlace en *cis* para que el efecto del ácido graso sea específico (Tabernero et al. 2001).

Además, el ácido oleico se incorpora en los fosfolípidos de la membrana neuronal en forma de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Esta incorporación es dependiente de albúmina, lo que sugiere que la albúmina es utilizada como vehículo para el transporte del ácido oleico entre los astrocitos y las neuronas (Tabernero et al. 2001). Es necesario mencionar que la presencia del único doble enlace del ácido oleico es suficiente para incrementar, de forma importante, la fluidez de las membranas biológicas (Alberts et al. 1996). En este sentido, la fluidez de la membrana es muy crítica para las neuronas, por lo que la incorporación de fosfolípidos que contienen oleico puede cambiar sustancialmente las propiedades de la membrana. De acuerdo con esto, el ácido oleico se incorpora preferentemente en las bases de las prolongaciones somáticas denominadas neuritas, (Esquema 6) lo que sugiere que se requiere un incremento en la fluidez de la membrana en los sitios donde emergen nuevos axones y/o dendritas. Este hecho facilita la formación de la membrana durante el crecimiento neurítico, a la vez que incrementa la flexibilidad para la orientación de los axones (Tabernero et al. 2001). Además, el ácido oleico es el principal ácido graso del sistema nervioso periférico, comprendiendo entre el 35 y el 45% de los ácidos grasos del nervio ciático.



Esquema 6. Localización del ácido oleico incorporado por las neuronas en cultivo primario. El ácido oleico se incorpora, preferentemente, en las bases de las neuritas. Modificado de Tabernero (Tabernero et al. 2001).

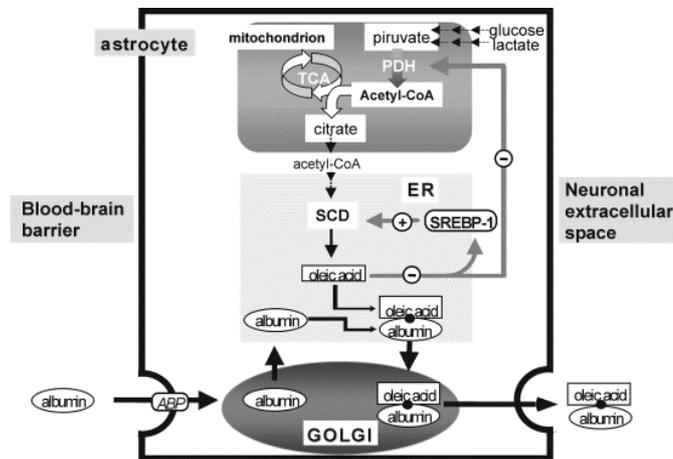
La PKC está implicada en la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico, dado que su inhibición previene los efectos neurotróficos del ácido oleico (Tabernero et al. 2001; Granda et al. 2003; Rodríguez-Rodríguez et al. 2004). De hecho, se ha descrito que varios ácidos grasos *cis*-insaturados, entre los que se incluye el ácido oleico, son capaces de activar la PKC (Khan et al. 1992). Por otra parte, es bien conocido que ciertos factores neurotróficos, como el NGF, activan la PKC y esto induce la expresión de la GAP-43 a través de la estabilización de su mRNA (Perrone-Bizzozero et al. 1993). Asimismo, la PKC colocaliza con la F-actina del citoesqueleto durante el crecimiento de las neuritas e induce el desarrollo de las mismas en células de neuroblastoma (Zeidman et al. 1999).

El ácido oleico aumenta también la expresión del factor de transcripción NeuroD2 (Rodríguez-Rodríguez et al. 2004), una de las isoformas responsable de desencadenar el programa de diferenciación neuronal. Sin embargo, no tiene efecto sobre NeuroD1. Los factores de transcripción neurogénicos de la familia NeuroD, de tipo bHLH, juegan un importante papel en la neurogénesis y en la diferenciación neuronal (Lee 1997). Además, la inhibición de la PKC previene también el aumento de la expresión del factor neurogénico NeuroD2 inducido por el ácido oleico (Granda et al. 2003; Rodríguez-Rodríguez et al. 2004).

A pesar de que se conozca bien el mecanismo por el que el ácido oleico induce la diferenciación neuronal (Tabernero et al. 2001; Rodríguez-Rodríguez et al. 2004), se desconoce la naturaleza del receptor neuronal implicado en este proceso.

El mecanismo por el cual la albúmina induce la síntesis del ácido oleico en astrocitos ha sido también investigado (Tabernero et al. 2002a) (Esquema 7). Se ha observado que los astrocitos internalizan albúmina en estructuras vesiculares, por endocitosis mediada por receptor. Así, el pretratamiento de los astrocitos con un inhibidor de la endocitosis mediada por receptor, el óxido de fenilarsina (PAO), o con proteasas como la tripsina y la pronasa (proteólisis de los receptores), o con lectinas, que bloquean la endocitosis mediada por

glicoproteínas, previene la internalización de la albúmina. Además, el tratamiento con protamina, un inhibidor de la endocitosis absorptiva, no modificó la internalización de la albúmina, excluyendo este tipo de endocitosis. A pesar de que se conozca la existencia de un receptor para la albúmina en astrocitos, se desconoce la naturaleza de dicho receptor.



Esquema 7. Mecanismo de síntesis del ácido oleico en astrocitos. La albúmina es internalizada en los astrocitos por endocitosis mediada por receptor, ocurriendo una transocitosis con paso por el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. En el retículo, la albúmina capta las moléculas de ácido oleico, induciendo de esta forma la activación del factor de transcripción SREBP-1, que promueve la expresión de la enzima SCD-1, enzima limitante de la síntesis del ácido oleico. La albúmina incrementa, además, la actividad de la PDH, aumentando los niveles de acetyl-CoA, sustrato para la síntesis del ácido oleico. Por último, el complejo albúmina-ácido oleico es liberado al espacio extracelular por exocitosis activa.

Tras la captación de la albúmina, ocurre su transocitosis, incluyendo el paso por el retículo endoplásmico (RE). El pretratamiento de los astrocitos con inhibidores del tráfico vesicular entre el Golgi y el RE, como la colchicina y el nocodazol, con un inhibidor del tráfico vesicular entre el RE y el Golgi, como la brefeldina A, o con un inhibidor de la exocitosis, como la monensina, previno la liberación de la albúmina al medio extracelular, confirmando la existencia de un proceso de transocitosis. Además, la síntesis y liberación del ácido oleico en los astrocitos se reduce significativamente por la presencia de inhibidores del tráfico de vesículas, indicando que el paso de la albúmina por el astrocyte promueve la síntesis del ácido oleico (Taberner et al. 2002a).

Tras la internalización de la albúmina y una vez en el RE, la albúmina capta el ácido oleico recién sintetizado, bajando la concentración de este ácido graso y activando el factor de transcripción SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*), que, a su vez, induce la síntesis de la enzima SCD-1 (la enzima limitante de la síntesis del ácido oleico), aumentando así la síntesis del ácido oleico. Este evento está regulado mediante retroinhibición, tanto por inhibición de la PDH (Thewke et al. 2000), como por la inhibición

de SREBP-1 (Tabernero et al. 2002a). La albúmina incrementa, además, la actividad de la PDH, aumentando los niveles de acetil-CoA, sustrato para la biosíntesis del ácido oleico. El complejo albúmina-ácido oleico es transportado del RE a la membrana, donde es liberado por exocitosis activa (Tabernero et al. 2002a).

1.2.2.2 Relevancia clínica de la albúmina

Lo referido anteriormente sugiere que la albúmina podría jugar un papel importante en el desarrollo cerebral, induciendo la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico. Por otra parte, la relevancia clínica de la albúmina en el cerebro ha sido demostrada por un gran número de estudios publicados. Se ha descrito que la albúmina entra en el cerebro adulto en condiciones de hipoxia y tras daño en la barrera hematoencefálica (Plateel et al. 1997). De esta forma, se puede especular que la albúmina puede también tener un papel importante en la reparación neuronal en respuesta a tales daños, mediante la acción del ácido oleico. De hecho, se ha demostrado que la SCD-1 y el propio ácido oleico juegan un papel esencial en la regeneración neuronal tras una lesión en el sistema nervioso periférico, mediante un aumento de la expresión de GAP-43 (Breuer et al. 2004). Todas las propiedades de la albúmina anteriormente mencionadas, juntamente con la capacidad anti-edema (Liu et al. 2001), califican la albúmina como un potente agente neuroprotector. Así, la terapia de albúmina, hasta 4 horas después de la lesión, mejora significativamente la función neurológica y reduce el volumen del infarto en aproximadamente un 60% (Belayev et al. 2001; Liu et al. 2001). De hecho, actualmente el uso clínico de la albúmina para el tratamiento de un infarto cerebral agudo se encuentra en las últimas fases de aprobación, habiendo sobrepasado ya la fase III de ensayos clínicos con un gran éxito (Ginsberg et al. 2006).

1.2.3 Captación de la albúmina

El proceso de captación de la albúmina ha sido estudiado principalmente en el endotelio y en las células del túbulo proximal renal. La transferencia de la albúmina a través del epitelio se consideraba un proceso inespecífico. De hecho, los primeros estudios fisiológicos sobre el transporte de la albúmina en los capilares indicaban que la albúmina fluía por difusión a través de un sistema de poros de distintos tamaños (Pappenheimer et al. 1951). Sin embargo, Ghitescu y cols demostraron que las moléculas de albúmina

marcadas con oro se unían a las vesículas en el endotelio capilar, siendo, a continuación, liberadas en el lumen (Ghitescu et al. 1986). Las vesículas fueron identificadas como vesículas “plasmalemales”, ahora conocidas como caveolas. Además, ésta fue la primera vez que se sugirió la transcitosis de la albúmina mediada por receptor. Más tarde, se han identificado, en las células endoteliales, las glicoproteínas gp18, gp30 y gp60 como proteínas de unión de la albúmina (Schnitzer et al. 1992; Schnitzer and Bravo 1993; Schnitzer and Oh 1994). Sin embargo, actualmente se considera que gp18 y gp30 son receptores que median el catabolismo de la albúmina (Tuma and Hubbard 2003), mientras que gp60 está supuestamente implicada en la transcitosis de la albúmina en el endotelio (Vogel et al. 2001).

Por otra parte, el descubrimiento de que la albúmina era reabsorbida en el túbulo proximal renal indicó que el único mecanismo capaz de mediar este proceso era la endocitosis mediada por receptor, puesto que ni su tamaño ni el gradiente entre el túbulo y la sangre permitían la reabsorción pasiva de la albúmina por las uniones estrechas (Tojo and Endou 1992). Además, se verificó que la captación de la albúmina en el túbulo proximal era específica, dado que la endocitosis de albúmina marcada con oro se inhibía por un exceso de albúmina no marcada y se identificó un sitio de unión de la albúmina en la membrana apical de las células del túbulo proximal, con una constante de afinidad dentro del rango de la concentración fisiológica de la albúmina en el lumen tubular (Gekle et al. 1995). A continuación, se identificó la proteína megalina como el receptor de la albúmina en las células del túbulo proximal de rata (Cui et al. 1996) y también que el mecanismo de captación de la albúmina en estas células ocurría por endocitosis mediada por clatrina (Gekle et al. 1997; Christensen et al. 1998). En los astrocitos, la internalización de la albúmina ocurre en estructuras vesiculares, por endocitosis mediada por un receptor glicoproteico (Tabernerero et al. 2002a). Sin embargo, se desconoce todavía la naturaleza del receptor, así como el tipo de endocitosis empleada en los astrocitos. En la sección 1.3 se describen de forma pormenorizada los tipos de endocitosis.

La megalina (o LRP-2/gp330), una glicoproteína monomérica de 600 kDa, miembro de la familia de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDLR), es un receptor endocítico multiligando expresado principalmente en células polarizadas epiteliales, en la superficie apical de la membrana (Kounnas et al. 1994). La megalina está clasificada como receptor de superficie de tipo I. Contiene un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática C-terminal pequeña (Saito et al. 1994). Esta cola C-terminal integra tres secuencias señal NPXY, dos para la endocitosis mediada por clatrina y una para la orientación apical de la megalina (Takeda et al. 2003). El dominio extracelular está compuesto por cuatro grupos de nueve repeticiones tipo LDLR clase A, ricas en cisteínas,

de unión al ligando, separados entre ellos por repeticiones tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) y por secuencias pobres en cisteínas compuestas por motivos YWTD, implicados en la liberación del ligando dependiente del pH en el endosoma (Christensen and Birn 2002) (Esquema 8). Aparentemente, la región principal de unión al ligando se sitúa entre los aminoácidos 1111-1210, que contienen la cuarta y la quinta repetición clase A del segundo grupo. La megalina es un receptor multiligando, que une albúmina, lactoferrina, retinol, transcobalamina, proteína de unión de la vitamina D, transtirretina, apolipoproteínas B, J, E y H, lipoproteína lipasa, insulina, hormona paratiroidea, mioglobina, calcio y RAP (proteína asociada a receptor), entre otros (Christensen and Birn 2002).

En el individuo adulto, además de en las células del túbulo proximal renal, la megalina se expresa en los enterocitos, en el epitelio mamario, en el epitelio ciliar del ojo, en los tirocitos y en la glándula paratiroidea, en el oído interno, en los neumocitos tipo II de los alvéolos pulmonares, en el endometrio, en la placenta, en el epidídimo y en el epitelio de la vejiga (Christensen and Birn 2002; Fisher and Howie 2006). Además, se ha descrito también la elevada expresión de la megalina en el plexo coroideo del cerebro adulto, donde la megalina tiene un papel importante en la neuroprotección al promover la eliminación del β -amiloide (Zlokovic et al. 1996; Deane et al. 2004; Carro et al. 2005; Tanzi and Bertram 2005). La megalina se encuentra sobreexpresada en el riñón de pacientes con nefritis de Heymann, una enfermedad caracterizada por la producción de autoanticuerpos contra la megalina y, además, en neuronas asociadas con la enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, la disminución de la expresión de la megalina en el riñón está asociada con enfermedades caracterizadas por proteinuria, tal como la enfermedad de Dent (Piwon et al. 2000) y con niveles elevados de las vitaminas A (retinol), B12 y D. La existencia de un receptor endocítico con bastante homología con la megalina en *C. elegans* y en *Drosophila melanogaster*, y además necesario para su crecimiento y desarrollo, sugiere que la megalina es una proteína esencial y altamente conservada evolutivamente. De hecho, la megalina humana y la de rata tienen una homología del 77%. El ratón *knockout* de megalina presenta anormalidades en el pulmón y riñón y muere perinatalmente debido a insuficiencia respiratoria. Además, en el cerebro, la proliferación deficiente del neuroepitelio produce un síndrome holoprosoencefálico, caracterizado por la falta de los bulbos olfatorios, la fusión del cerebro anterior y un sistema ventricular común (Willnow et al. 1996). En conjunto, este fenotipo indica que la megalina es esencial para la formación del sistema nervioso y, en general, para el desarrollo. Asimismo, la expresión de la megalina durante el desarrollo ha sido caracterizada en la rata. La megalina se expresa por primera vez en los embriones de ocho células, aparentemente para surtir al blastocisto de lipoproteínas ricas en colesterol (Assemat et al. 2005). Además, se ha detectado la

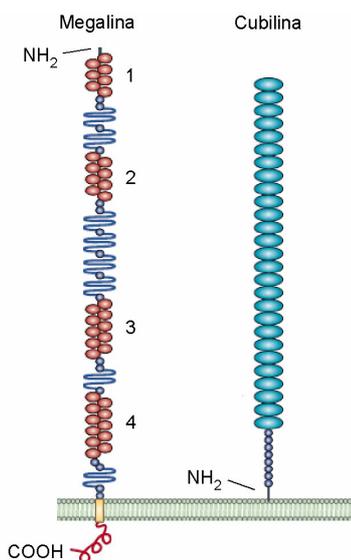
expresión de la megalina a partir del día 11 de gestación (E11) en las células epiteliales de varios órganos en desarrollo, como el pulmón, riñón, tracto gastrointestinal, tráquea, glándulas endocrinas, SNC y órganos sensoriales. En el SNC, la megalina se detecta en el neuroepitelio del tubo neural y en la notocorda el día E11. En el día E13, la megalina se detecta en el diencéfalo ventral, en la columna vertebral ventral, en la zona ventricular del hipocampo y en el plexo coroideo, pero no en la notocorda. En el día E15, la expresión de la megalina empieza a restringirse, limitándose al plexo coroideo, a la zona ventricular de la vesícula ventral lateral, columna vertebral y regiones ventriculares del tercero y cuarto ventrículos (Assemat et al. 2005).

El papel de la megalina en el desarrollo está reforzado por su interacción con la proteína *Sonic hedgehog* (Shh) y con el retinol. Dado que la megalina une e internaliza el retinol en el túbulo proximal (Christensen and Birn 2002) y siendo bien conocida la importancia del retinol en el desarrollo embrionario (Means and Gudas 1995), se ha sugerido que la megalina sea un regulador del metabolismo del retinol, crítico en el desarrollo (McCarthy and Argraves 2003). La Shh es una proteína que actúa como morfógeno durante el desarrollo, controlando la formación del SNC, el sistema pulmonar, el tracto reproductivo, el ojo y otros órganos. Durante el desarrollo embrionario Shh se expresa en la notocorda, el tubo neural y la zona de actividad polarizante del limbo (Marti et al. 1995). El hecho de que el ratón *knockout* de Shh presente, tal como el de megalina, un síndrome holoprosencefálico y que la expresión de Shh se pierda en el día E10,5 en el ratón *knockout* de la megalina, así como que la megalina funcione como receptor de Shh (McCarthy et al. 2002), parece indicar que la megalina tiene un papel crucial en la biología del desarrollo cerebral dirigido por Shh (McCarthy and Argraves 2003).

En algunos tejidos, como la placenta y el túbulo proximal renal y en los enterocitos, la megalina se coexpresa con la cubilina, una glicoproteína de 460 kDa, anclada periféricamente a la megalina. La cubilina está constituida por ocho repeticiones tipo EGF y por 27 dominios CUB y tiene poca homología con otros receptores endocíticos. La cubilina no tiene dominio transmembrana, estando simplemente anclada a la membrana por el extremo N-terminal, que es anfipático, pero es la asociación con la megalina la que la retiene anclada en la membrana (Moestrup et al. 1998) (Esquema 8). En las células del túbulo proximal, la cubilina, juntamente con la megalina, está implicada en la reabsorción de la albúmina (Birn et al. 2000). Otra función bien caracterizada de la cubilina es la reabsorción intestinal del complejo factor intrínseco-vitamina B12 (Moestrup et al. 1998). Otros ligandos de la cubilina son la transferrina, RAP, la proteína de unión de la vitamina D y la apolipoproteína A-I/lipoproteína de alta-densidad. Dado que la cubilina no posee, aparentemente, ninguna señal de internalización y que tiene ligandos comunes a los de la

megalina, se ha propuesto una unión “simbiótica” entre megalina y cubilina, en la cual la cubilina aumenta la internalización de ligandos de la megalina y ésta a su vez internaliza la cubilina y sus ligandos (Moestrup et al. 1998).

Aunque en el hombre la expresión de la cubilina esté más limitada que la de la megalina, en rata y en ratón la cubilina se expresa en los tejidos que también expresan megalina, tanto en adulto como durante la embriogénesis.

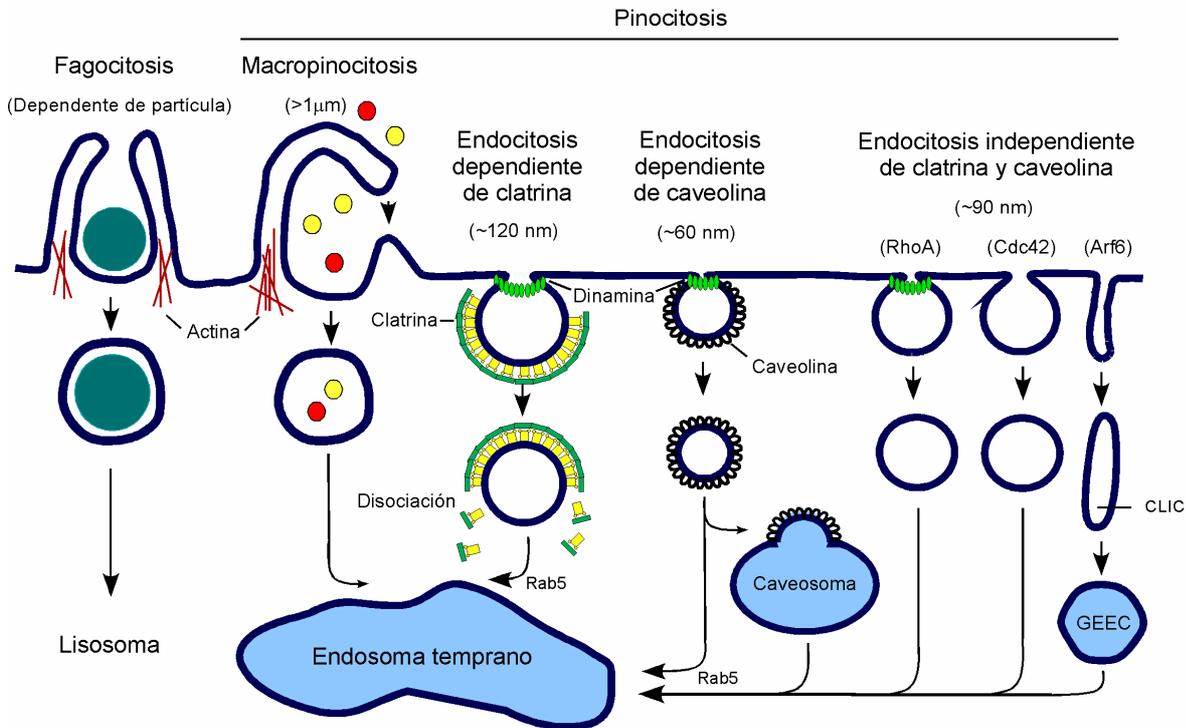


Esquema 8. Estructura de la megalina y de la cubilina. La megalina (izquierda) es una proteína integral transmembranal de ~ 517 kDa (no glicosilada). El dominio extracelular de la megalina (~ 4400 aminoácidos), contiene cuatro grupos de repeticiones tipo LDLR clase A, ricas en cisteína, de unión al ligando, separados entre ellos por repeticiones tipo EGF y por secuencias pobres en cisteína compuestas por motivos YWTD. El dominio transmembrana, único (22 aminoácidos), es seguido de una cola citoplasmática (213 aminoácidos), que contiene dos motivos NPXY. La cubilina (derecha), es una proteína de 400 kDa (no glicosilada). Se encuentra anclada a la membrana por el N-terminal anfipático y su dominio extracelular es constituido por ocho repeticiones tipo EGF seguidas por 27 dominios CUB.

En las células del túbulo proximal renal, además de la megalina y de la cubilina se ha descrito la presencia de proteínas de unión a albúmina de 55kDa y 31kDa (Cessac-Guillemet et al. 1996). Sin embargo, aunque estas proteínas puedan unir albúmina, la reabsorción fisiológica de la albúmina es mediada por la megalina y la cubilina. El hecho de que los ratones *knockout* de megalina presenten una elevada excreción urinaria de albúmina (Christensen and Birn 2002) y de que algunas mutaciones en el gen de la cubilina estén asociadas con proteinuria (Aminoff et al. 1999), lo corroboran. Además, la existencia de una relación entre los tejidos donde se expresa la megalina y los tejidos donde la captación de albúmina ocurre por endocitosis mediada por receptor (Schnitzer and Oh 1994; Christensen et al. 1998; Schubert et al. 2001; Singh et al. 2003; Carro et al. 2005) parece indicar que la captación de albúmina es mediada por la megalina y no por las glicoproteínas gp30 o gp60.

1.3 La endocitosis

La membrana plasmática regula la entrada y salida de partículas y solutos en las células. Moléculas de pequeño tamaño, como los aminoácidos, azúcares e iones, pueden pasar la membrana a través de canales iónicos y bombas. Las macromoléculas necesitan ser transportadas al interior de las células mediante un proceso de invaginación de la membrana y escisión de vesículas, designado como endocitosis. La endocitosis es un proceso celular esencial que, además de permitir el mantenimiento de la homeostasis celular por regulación de la composición de la membrana, permite la entrada de nutrientes y otras sustancias, la transducción de señales intra e intercelulares y también una defensa efectiva contra los microorganismos (Conner and Schmid 2003).



Esquema 9. Mecanismos de endocitosis. Las partículas grandes pueden ser internalizadas por fagocitosis, mientras que la captación de fluidos ocurre por macropinocitosis. Ambos procesos son dependientes del remodelado de la membrana a gran escala mediado por actina. La mayoría de las macromoléculas es internalizada por endocitosis mediada por clatrina o por endocitosis mediada por caveolina, pero algunas moléculas son internalizadas por mecanismos independientes de los dos referidos. En el texto se encuentran descritos los diferentes tipos de endocitosis. Exceptuando la fagocitosis, todas las vías de internalización confluyen en el endosoma temprano, en un proceso mediado por la GTPasa Rab5 (Modificada de (Conner and Schmid 2003)).

El proceso de endocitosis se puede dividir en dos categorías: la internalización de partículas grandes ($>1 \mu\text{m}$), designada fagocitosis y la internalización de fluidos y partículas pequeñas, designada pinocitosis. La pinocitosis ocurre, por lo menos, por cuatro mecanismos distintos: macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolas y endocitosis independiente de clatrina y de caveolas (Esquema 9).

1.3.1 Fagocitosis

La fagocitosis ocurre en células especializadas como los leucocitos fagocíticos del sistema inmune de los mamíferos (macrófagos, monocitos y neutrófilos), o como los protozoarios fagocíticos (*Acanthamoeba*). La fagocitosis es inducida por la unión de patógenos (bacterias o levaduras, o bien restos de células muertas, grasas de depósitos arteriales, entre otros) a receptores específicos de la superficie de membrana. Cada tipo de partícula induce un proceso específico de fagocitosis. La señal fagocítica es transducida por distintos receptores, que inducen cascadas de transducción de señales ligeramente distintas (Underhill and Ozinsky 2002). Además, la fagocitosis depende del citoesqueleto de actina para internalizar en un fagosoma intracelular la partícula unida (Greenberg et al. 1990).

1.3.2 Macropinocitosis

La macropinocitosis es un proceso no selectivo, dado que no existen moléculas específicas para ser transportadas. Igual que en la fagocitosis, las cascadas de señalización que inducen la macropinocitosis implican las GTPasas de la familia Rho, que desencadenan la formación de protrusiones de la membrana dependientes de actina. Estas protrusiones se fusionan con la membrana, generando vesículas endocíticas grandes, llamadas macropinosomas. La macropinocitosis se encuentra restringida a pocos tipos de células, como las células dendríticas, pero puede ser inducida en otros tipos de células por microbios patógenos. En las células dendríticas, su activación tras la presentación del antígeno conlleva una extensa macropinocitosis del antígeno (Steinman and Swanson 1995). La macropinocitosis es también utilizada por varios patógenos bacterianos, como *Legionella* y *Salmonella*, o por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que la utiliza para entrar en los macrófagos (Marechal et al. 2001).

1.3.3 Endocitosis dependiente de clatrina

En la mayoría de las células de mamíferos, la endocitosis dependiente de clatrina ocurre constitutivamente, promoviendo la internalización de ligandos unidos a su receptor (Mellman 1996). Tanto la lipoproteína de baja densidad (LDL) que se une al receptor de LDL, como la transferrina que se une al receptor de transferrina, son dos ejemplos de la endocitosis dependiente de clatrina (Brodsky et al. 2001), conocida anteriormente como *endocitosis mediada por receptor*. Actualmente esta designación es incorrecta, pues, en general, todas las formas de pinocitosis implican una interacción ligando-receptor. La endocitosis dependiente de clatrina es crucial para la comunicación intercelular durante el desarrollo de los tejidos y de los órganos (Di Fiore and De Camilli 2001; Seto et al. 2002). Además, regula la transducción de señales al controlar los niveles de los receptores de membrana implicados en la señalización (Wells et al. 1990). La endocitosis mediada por clatrina está también implicada en la homeostasis celular, al regular la internalización de bombas de membrana que controlan el transporte de pequeñas moléculas e iones a través de la membrana, y en la homeostasis del suero, al recaptar albúmina y otras proteínas en el riñón (Gekle 2005). En el sistema nervioso este tipo de endocitosis juega un papel fundamental, al ser requerida, por ejemplo, para el reciclaje de las proteínas de membrana contenidas en las vesículas sinápticas después de la neurotransmisión (De Camilli and Takei 1996), además de para la internalización de canales de calcio voltage dependiente en las neuronas, ayudando a controlar la intensidad de la transmisión sináptica (Beattie et al. 2000).

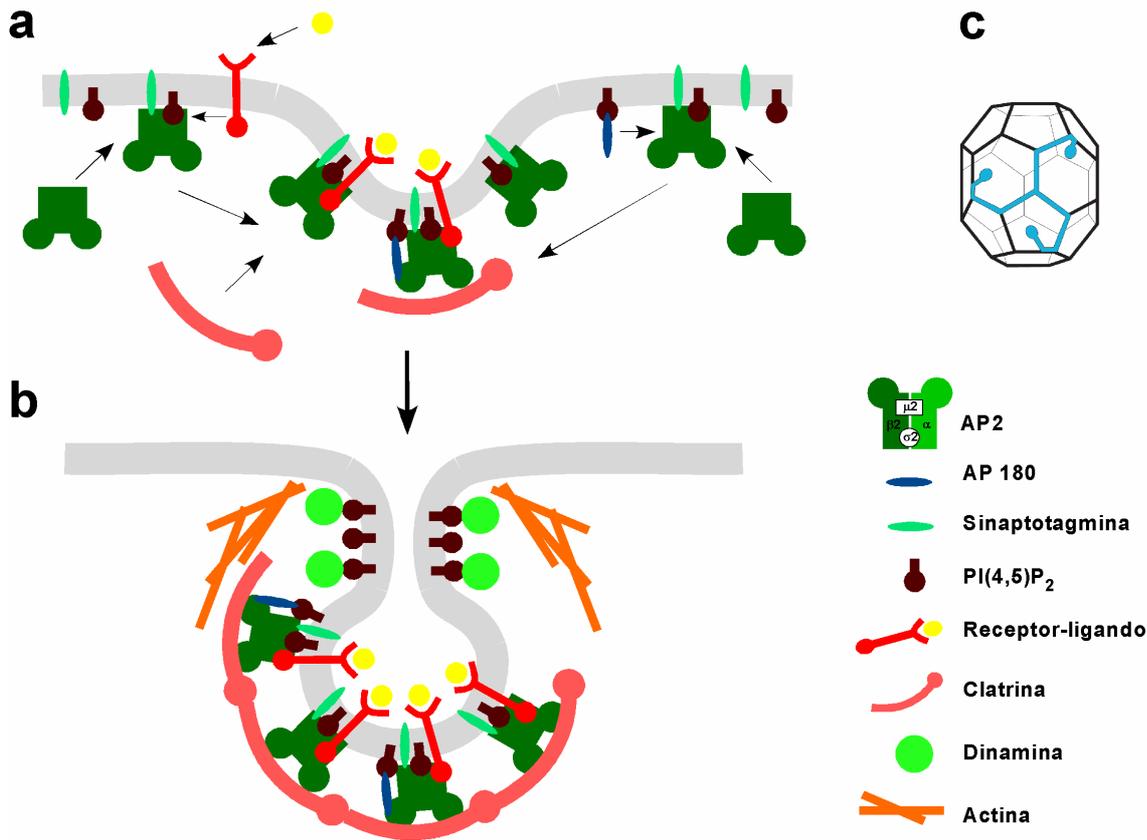
Este proceso endocítico tiene como principal característica el ensamblaje, mediado por proteínas adaptadoras, de una proteína específica, la clatrina, en el lado citoplasmático de la membrana. Este evento conlleva la formación de una invaginación y, subsecuentemente, a la formación de la vesícula recubierta de clatrina y de varias proteínas efectoras asociadas, en un proceso de varias etapas y bastante regulado.

1.3.3.1 Formación, invaginación y escisión de la vesícula de clatrina

Las proteínas adaptadoras de clatrina son proteínas que pueden conectar la clatrina con un receptor unido al ligando, con el fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (PI(4,5)P₂) o con ambos simultáneamente. Se han identificado más de veinte proteínas adaptadoras de clatrina (Owen et al. 2004), que se unen la mayoría específicamente con los PI(4,5)P₂ de la membrana, que funcionan como co-receptores para el reclutamiento de adaptadores (Di Paolo and De Camilli 2006).

Tras la unión del ligando al receptor, el evento inicial en la formación de una vesícula de clatrina es el reclutamiento, en el lado citoplasmático de la membrana, de la proteína adaptadora AP2 (Esquema 10 a), un complejo constituido por las subunidades α (~100 kDa), β 2 (~100 kDa), μ 2 (50 kDa) y σ 2 (20 kDa) (Brodsky et al. 2001). Los complejos adaptadores AP2 son reclutados hacia la membrana a través de los PI(4,5)P₂ y de la sinaptotagmina, otra proteína adaptadora. El complejo AP2 se asocia a los PI(4,5)P₂ a través de la subunidad α , que tiene una alta afinidad por fosfoinosítidos y al receptor unido al ligando a través de la subunidad μ 2 o del hemicomplejo α/σ 2. (Ohno et al. 1995; Doray et al. 2007). La subunidad σ 2 del complejo AP2 tiene, aparentemente, un papel estructural en su estabilización (Collins et al. 2002). Una vez posicionados en la membrana, los complejos AP2 son desfosforilados en la subunidad β 2 (Brodsky et al. 2001), pudiendo después reclutar la clatrina hacia la membrana a través de la subunidad β 2 (Kirchhausen 1999), iniciándose el proceso de ensamblaje de clatrina. Después de la formación del complejo receptor-AP2, la sinaptotagmina estabiliza este complejo, sirviendo también de proteína de anclaje (Haucke and De Camilli 1999). La proteína adaptadora 180 (AP180), expresada específicamente en las neuronas, y su isoforma AP180/CALM, de expresión ubicua, juegan, aparentemente, un papel importante en la formación de la vesícula, mediante la cooperación con AP2 para lograr una máxima eficacia del ensamblaje de clatrina (McMahon 1999; Tebar et al. 1999).

La clatrina está constituida por una cadena pesada (~180 kDa) y una cadena ligera (30-35 kDa). Las unidades funcionales del recubrimiento de clatrina son los *triskelion* (trímeros de clatrina), que tienen la capacidad de formar espontáneamente, en condiciones no fisiológicas (concentraciones bajas de sales y elevadas de calcio), estructuras cerradas en forma de "jaula" poligonal (Esquema 10 c) (Vigers et al. 1986). Se postula que la capacidad para formar estas estructuras es la principal causa de la deformación de la membrana en una invaginación (Kirchhausen 2000), puesto que en ausencia de la clatrina no se observan curvaturas de la membrana, pese a que el complejo AP2 y otras proteínas adaptadoras se asocian en subdominios de la membrana (Hinrichsen et al. 2006). Sin embargo, la presencia, esencial, de la clatrina no es suficiente para la invaginación y escisión de las vesículas, requiriéndose proteínas efectoras, como la endofilina, para complementar la función de la clatrina.



Esquema 10. Formación, invaginación e inducción de la escisión de la vesícula de clatrina. a. Tras la unión del ligando al receptor, los complejos adaptadores AP2 son reclutados para la membrana a través de los PI(4,5)P₂ y de la sinaptotagmina. Una vez posicionados en la membrana, los complejos AP2 pueden reclutar la clatrina y también unir, a través de la subunidad $\mu 2$, los receptores unidos a ligando. La proteína adaptadora AP180 coopera con AP2 para lograr la máxima eficacia del ensamblaje. El reclutamiento de la clatrina conlleva la rápida formación de la vesícula de clatrina, que induce el proceso de invaginación. **b.** Cuando la vesícula está profundamente invaginada, se induce el proceso de escisión, un evento controlado por la dinamina. La dinamina se une al cuello de la invaginación a través de los PI(4,5)P₂ y recluta varias proteínas, entre ellas la endofilina. Esta proteína posee actividad de transferasa de ácidos lisofosfatídicos y puede invertir la posición de los lípidos de la membrana, pudiendo, de esta forma, facilitar la formación de la curvatura en la parte superior de la invaginación y así, la escisión. La dinamina recluta también actina, esencial para el proceso de escisión. **c.** Estructura cerrada en forma de "jaula" poligonal del recubrimiento de clatrina, formada por los triskelion (unidades funcionales del recubrimiento de clatrina); en el esquema, un triskelion se representa en azul.

La capacidad de reconocer los receptores de membrana, de asociarse con la clatrina y de unir la mayoría de las proteínas adaptadoras, hacen de AP2 una proteína clave en la endocitosis mediada por clatrina. De hecho, el silenciamiento de la expresión de las subunidades $\mu 2$ y α mediante siRNA en células HeLa eliminó aproximadamente el 90% de las vesículas de clatrina y bloqueó la internalización de la transferrina (Hinrichsen et al. 2003). Sin embargo, en ausencia de AP2, los adaptadores Dab2 y epsina median la

internalización del receptor de LDL y de moléculas ubiquitinadas, respectivamente (Duncan et al. 2006; Keyel et al. 2006).

El proceso de escisión de la invaginación de clatrina está regulado por la dinamina, otra proteína clave en la endocitosis mediada por clatrina, en un proceso dependiente de actina. La GTPasa dinamina se requiere para la fagocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina y algunos tipos de endocitosis independientes de clatrina y caveolina siendo, aparentemente, un regulador clave de la endocitosis (Hinshaw 2000).

Cuando el proceso de recubrimiento de clatrina se encuentra casi completado, la dinamina es reclutada a la invaginación por los PI(4,5)P₂ (Esquema 10 b) e, indirectamente, por la anfifisina. La anfifisina activa la fosfolipasa C, que hidroliza fosfolípidos generando ácido fosfatídico, que, a su vez, activa las quinasas PI(4,5)P-5 que generan PI(4,5)P₂ (De Camilli et al. 1995; Hinshaw 2000). Una vez en la membrana, la dinamina recluta la endofilina, un efector que posee actividad de transferasa de ácidos lisofosfatídicos y puede invertir la posición de los lípidos de la membrana, pudiendo, de esta forma, facilitar la formación de la curvatura en la parte superior de la invaginación y así, el proceso de escisión (Schmidt et al. 1999). La dinamina recluta, también, efectores como la cortatina, sindapina, proteínas quinasas Src, proteínas G, Grb2, PI3-Ks, PLCγ y profilina, responsables de la interacción de la dinamina con el citoesqueleto de actina (Hinshaw 2000; Huttner and Schmidt 2000). En el proceso de escisión también interviene directamente la clatrina, al unirse a ankirina y a Hip1R, dos proteínas que unen la actina a la membrana (Engqvist-Goldstein et al. 1999; Rubtsov and Lopina 2000).

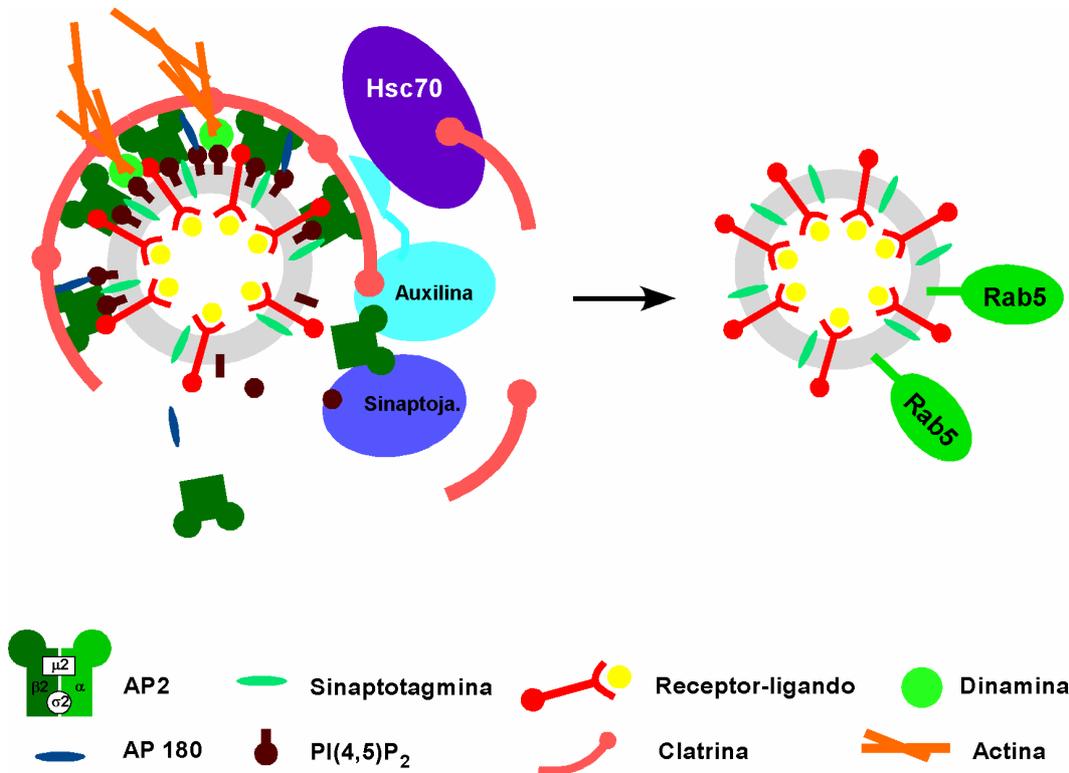
De esta forma, la actina reclutada para las vesículas “empuja” a éstas hacia el citoesqueleto de actina, evento fundamental para su internalización. De hecho, estudios recientes indican que las proteínas motoras de actina, miosina VI y miosina 1E, están implicadas en la endocitosis mediada por clatrina (Krendel et al. 2007; Spudich et al. 2007).

1.3.3.2 Disociación del recubrimiento de clatrina y destino de la vesícula

Después de la internalización de la vesícula, el recubrimiento de clatrina es rápidamente retirado por la acción de las proteínas sinaptojanina Hsc70 y auxilina. La sinaptojanina se une al complejo AP2 y la auxilina, que contiene un dominio de tipo chaperona DnaJ con actividad fosfatasa, se une al complejo AP2 y a la clatrina. Ambas desfosforilan el PI(4,5)P₂, induciendo la disociación de las proteínas adaptadoras AP2 y AP180 del PI(4,5)P₂. La sinaptojanina interactúa también con varios efectores de la dinamina y con la

clatrina (Haffner et al. 2000). La Hsc70, que se une a la clatrina y al dominio DnaJ de la auxilina, juntamente con la auxilina, desestabilizan el recubrimiento de clatrina mediante la hidrólisis del ATP (Lemmon 2001; Newmyer and Schmid 2001) (Esquema 11).

Tras la disociación del recubrimiento de clatrina, la GTPasa pequeña rab5 es rápidamente reclutada, mediando la fusión de la vesícula con el endosoma temprano, ocurriendo, en el caso de los transportadores, la disociación del ligando dependiente del pH. Desde este compartimento, las moléculas transportadas son recicladas a la membrana o bien dirigidas a otros compartimentos intracelulares como el Golgi o el retículo endoplasmático y, a continuación, degradadas en el lisosoma.



Esquema 11. Disociación del recubrimiento de clatrina y destino de la vesícula. Después de la internalización de la vesícula, la actina dirige la vesícula al citosol. Allí, la sinaptojanina y la auxilina se unen al complejo AP2 y desfosforilan los PI(4,5)P₂, induciendo la disociación de los complejos AP2 y AP180 de los PI(4,5)P₂. Además, la auxilina y la Hsc70 rápidamente se unen a la vesícula y desestabilizan el recubrimiento de clatrina, mediante el consumo de ATP. La vesícula, sin recubrimiento, es dirigida al endosoma temprano mediante unión de la GTPasa Rab5.

1.3.4 Endocitosis dependiente de caveolas

Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana (50-80 nm de diámetro), en forma de botella, observadas en la mayoría de las células (Palade 1953; Yamada 1955).

Estas invaginaciones son microdominios enriquecidos en colesterol, esfingolípidos (glicoesfingolípidos y esfingomielina) y caveolinas. Las caveolas existen en casi todos los tipos celulares (excepto en los linfocitos), pero son particularmente abundantes en fibroblastos y en células endoteliales, adipocíticas y del músculo liso. De hecho, las caveolas representan más de la tercera parte de la superficie de la membrana de las células endoteliales (Parton and Simons 2007). La composición lipídica de las caveolas es idéntica a la de los denominados *lipid rafts* o, simplemente, *rafts* (Brown and London 1998; Simons and Toomre 2000) y, por ello, las caveolas son resistentes a la solubilización por detergentes no-iónicos. Las caveolas se han designado como *lipid rafts* especializados, membranas enriquecidas en caveolina, membranas insolubles en Triton que contienen caveolinas o invaginaciones ricas en *lipid rafts* que contienen caveolinas, entre otras denominaciones.

1.3.4.1 Composición de las caveolas

Las caveolas son microdominios enriquecidos en colesterol, esfingolípidos (glicoesfingolípidos y esfingomielina) y caveolinas. Las caveolinas, proteínas integrales de la membrana, son las proteínas de recubrimiento de las caveolas (Rothberg et al. 1992). Las caveolinas son una familia de proteínas que incluyen la caveolina-1 (21-24 kDa) (Rothberg et al. 1992 Scherer, 1996, 131), la caveolina-2 (20 kDa) (Tang et al. 1996) y la caveolina-3 (18 kDa) (Song et al. 1996), esta última conocida como “específica del músculo”. La caveolina-1 y la caveolina-2 tienen una expresión ubicua y forman un complejo estable hetero-oligomérico. Además, son complementarias, dado que la caveolina-1 participa en el transporte subcelular de la caveolina-2 y ésta modula el ensamblaje de la caveolina-1 en las caveolas. Sin embargo, estudios con ratones knockout de caveolina-1 y caveolina-2 han revelado un papel selectivo e independiente de estas proteínas (Cohen et al. 2004). La expresión de la caveolina-3 en las células astrogiales constituyó la primera evidencia de su expresión en un tejido diferente del músculo (Ikezu et al. 1998). La expresión de la caveolina-3 en el cerebro está, aparentemente, relacionada con la enfermedad de Alzheimer y su expresión se encuentra bastante elevada en los astrocitos que están en contacto con las placas seniles (Nishiyama et al. 1999). La caveolina-1 y la caveolina-3 son esenciales para la formación y estabilidad de las caveolas, dado que en su ausencia no se observan caveolas (Koleske et al. 1995; Galbiati et al. 2001) y la expresión de caveolina-1 en células que carecen de caveolas induce la formación de caveolas (Fra et al. 1995). Sin embargo, la pérdida de la caveolina-2 no tiene, aparentemente, un efecto directo en la formación de caveolas *in vivo*, pero puede contribuir

a la formación de las caveolas en determinados tipos celulares (Razani et al. 2002b; Lahtinen et al. 2003).

La formación de las caveolas depende de la oligomerización de la caveolina-1 o de la caveolina-3 y de la asociación con el colesterol de los *rafts*. Además, la desaparición tanto de colesterol como de glicoesfingolípidos bloquea la endocitosis caveolar (Cheng et al. 2006). Las caveolinas pueden unir una o dos moléculas de colesterol (Murata et al. 1995) y pueden ser fosforiladas en residuos de tirosina. Las caveolas son, además, ricas en proteínas acopladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI-AP), receptores acoplados a proteínas G y varias proteínas tirosina kinasas (PTKs), como PKC, MAPK y src (Sargiacomo et al. 1993). Las GPI-AP son proteínas que están ancladas en la parte extracelular de la membrana a través de la parte lipídica. Dado que estas kinasas están implicadas en la transducción de señales, se piensa que las caveolas participan en estos eventos. Por ejemplo, la internalización del virus SV40 ocurre tras la unión de éste a la superficie celular y consecuente activación de una cascada de señalización mediada por las PTKs presentes en las caveolas (Pelkmans et al. 2002). De hecho, la caveolina-1 fue identificada inicialmente como sustrato de la kinasa v-Src en fibroblastos transformados con el virus del sarcoma de Rous (Glenney and Zokas 1989) y más tarde se determinó como constituyente de las caveolas (Rothberg et al. 1992).

1.3.4.2 Ligandos e inducción de la endocitosis

Algunos de los ligandos o constituyentes de la membrana que son internalizados vía caveolas incluyen la toxina colérica B (CtxB), la toxina tetánica, la fosfatasa alcalina (Montesano et al. 1982; Parton et al. 1994), el ácido fólico (Rothberg et al. 1990), la albúmina (Schnitzer et al. 1994), el factor de motilidad autocrino (Benlimame et al. 1998), el GPI fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (Nichols et al. 2001) y el glicoesfingolípidos lactosil ceramida (LacCer) marcado con *bodipy* (BODYPI-LarCer) (Puri et al. 2001), además del virus SV40 (Anderson et al. 1996; Pelkmans et al. 2001) y algunos receptores acoplados a proteínas G (generalmente endocitados vía clatrina) como el receptor de adenosina A1 (Escrache M 2003).

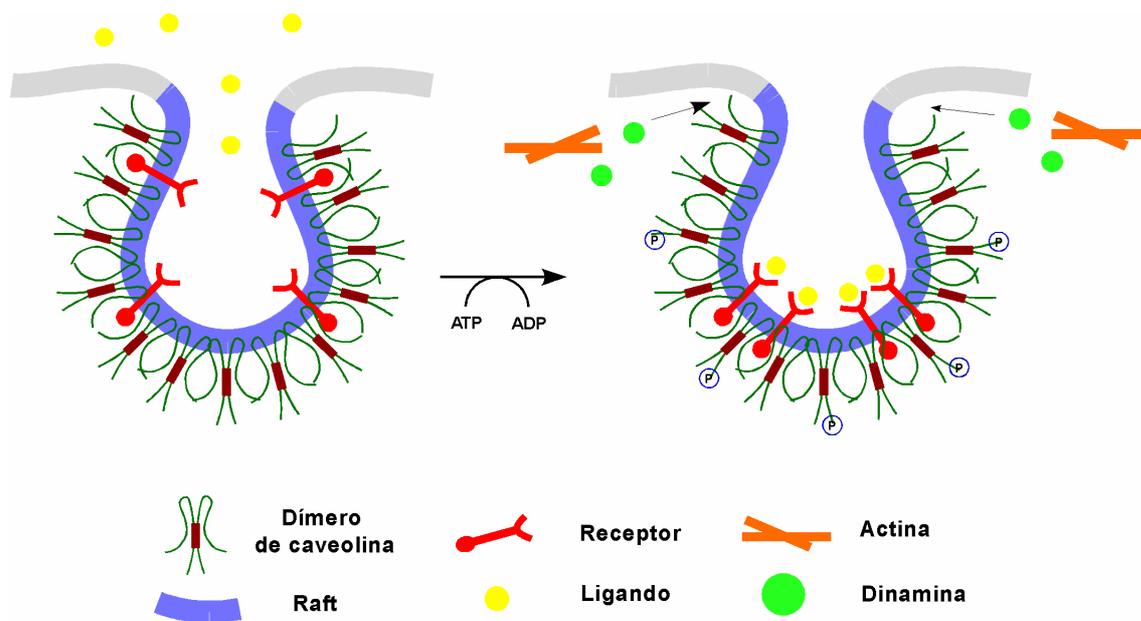
Sin embargo, poco se conoce sobre la forma de selección de las moléculas que van a ser transportadas. Las toxinas poseen dominios de unión a los esfingolípidos, siendo esta, posiblemente, la forma de contactar con la superficie celular. Por otra parte, la unión covalente de ligandos multivalentes con componentes de las caveolas, como las GPI-AP y los glicosfingolípidos, puede inducir su endocitosis (Mayor et al. 1994). Además, recientemente se ha sugerido que la ubiquitinación de las proteínas que van a ser

transportadas constituiría la forma de seleccionar entre los mecanismos de endocitosis dependientes e independientes de clatrina. De hecho, se sugirió que la ubiquitinación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), un receptor normalmente internalizado vía clatrina, sería la señal para su internalización mediada por caveolas (Sigismund et al. 2005).

Poco se conoce sobre la regulación de la endocitosis caveolar. La internalización por caveolas se activa cuando las células son tratadas con inhibidores de fosfatasa (como el ácido okadaico) o cuando determinadas moléculas se unen a su receptor, ocurriendo un aumento de la activación de la quinasa src y la fosforilación de la caveolina-1 y de la dinamina (Parton et al. 1994). Además, la endocitosis caveolar es también estimulada por colesterol y glicosfingolípidos exógenos y requiere la actividad de la quinasa src (cuya actividad se incrementa por el estímulo) y de la PKC α (Sharma et al. 2004), sugiriendo que la estimulación ocurre mediante un aumento de la actividad de las kinasas. De hecho, un estudio reciente del *kinoma* humano identificó 80 kinasas distintas implicadas en la internalización del virus SV40 (Pelkmans et al. 2005).

1.3.4.3 Formación, escisión e internalización de las caveolas

El mecanismo de formación, escisión e internalización de las caveolas todavía es poco conocido. Se sabe que las caveolas contienen dinamina, la GTPasa implicada en la escisión de la vesícula de clatrina, en el cuello de la invaginación de las caveolas (Henley et al. 1998; Oh et al. 1998). Posiblemente la escisión de las caveolas ocurra de la misma forma que las invaginaciones de vesículas de clatrina. Además de la dinamina, las caveolas contienen la maquinaria molecular para la escisión de las vesículas (Schnitzer et al. 1995). El citoesqueleto de actina desempeña un papel fundamental en la internalización de las caveolas. Tras el reclutamiento de la dinamina, ocurre el reclutamiento de la actina y la formación de las colas de actina, eventos necesarios para la escisión de la caveola (Esquema 12). A continuación, hay una despolarización de la actina y la caveola se internaliza (Pelkmans et al. 2002).



Esquema 12. Inducción de la endocitosis mediada por caveolas. Tras la unión del ligando a su receptor, localizado en el interior del *raft*, ocurre la fosforilación de las caveolinas y el reclutamiento de dinamina y actina, que median el proceso de escisión de la vesícula. La vesícula es dirigida al caveosoma (en el caso del virus SV40; ver esquema X) o directamente al endosoma temprano, a través de la GTPasa Rab5.

1.3.4.4 Destino de la caveola

Tras la internalización de la caveola, ésta se funde con el caveosoma (como en el caso del virus SV40 (Pelkmans et al. 2001)) de una forma independiente de rab5, o directamente con el endosoma temprano (como en el caso del BODYPI-LarCer (Puri et al. 2001)), de una forma dependiente de rab5. El caveosoma es una estructura intracelular preexistente, distinta del endosoma, que contiene caveolina-1 y que no acumula ligandos internalizados vía endocitosis mediada por clatrina. El caveosoma se funde con el endosoma temprano o, en el caso del virus SV40, directamente con el retículo endoplasmático. Desde el endosoma temprano las moléculas transportadas son recicladas a la membrana o bien dirigidas a otros compartimentos intracelulares, como el Golgi o el retículo endoplasmático, y, a continuación, degradadas en el lisosoma, mientras que la caveola es reciclada en la membrana.

1.3.4.5 Otras funciones de las caveolinas

Además de la endocitosis, las caveolas se han relacionado con varios procesos celulares, en estudios con ratones knockout de caveolina-1 o tras la eliminación de esta proteína por

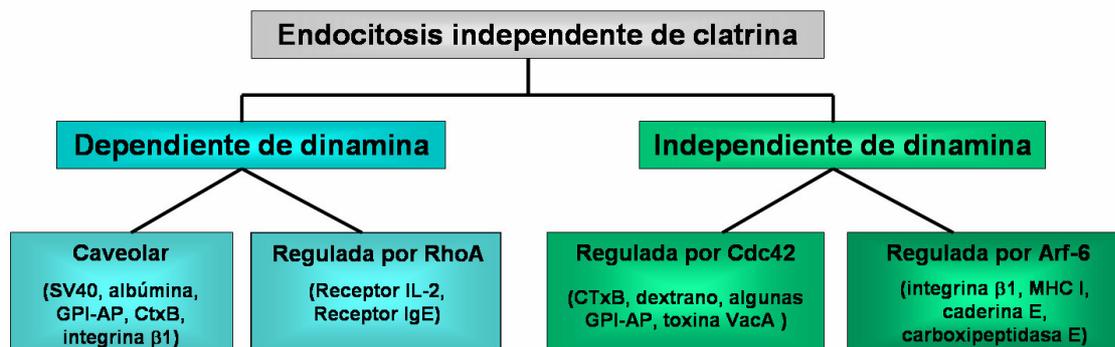
siRNA. Así, las caveolas tienen un papel en la regulación de la eNOS en el endotelio pulmonar, en la señalización por calcio en células de músculo liso y astrocitos, además de en la regulación de canales de potasio y de calcio en el endotelio vascular (Parton and Simons 2007). Recientemente se ha descrito en los adipocitos un papel de la caveolina-1 en la homeostasis de los lípidos, particularmente en la regulación de los niveles de colesterol y en la internalización de ácidos grasos. De hecho, los ratones knockout de caveolina-1 son resistentes a la inducción de obesidad por la dieta, presentan niveles elevados de triglicéridos en la sangre y, además, presentan una reducción del tejido adiposo (Razani et al. 2002a). Por otra parte, los ratones knockout de caveolina-3 presentan, además de pérdida de las caveolas en el músculo esquelético, distrofia muscular y desorganización de la red de túbulos-T (Galbiati et al. 2001). Otro campo de investigación que empieza a ser explorado es el papel de las caveolas en la “mecanosensación” (Vogel and Sheetz 2006 Parton, 2007, 185). En este sentido, la capacidad para detectar fuerzas y tensiones en la membrana puede explicar muchas de las funciones de las caveolas en diversos tipos celulares, como en las células endoteliales o en el músculo liso.

1.3.5 Endocitosis independiente de clatrina y de caveolas

Las caveolas representan sólo un tipo de microdominios ricos en colesterol en la membrana. Los otros, designados en general como *rafts*, son estructuras pequeñas, de 40-50 nm de diámetro, que difieren de las caveolas por no poseer caveolinas. Están constituidos únicamente por lípidos y difunden libremente en la superficie celular (Edidin 2001). En 1995, un estudio con formas mutadas de dinamina reveló que éstas inhibían la internalización de vesículas de clatrina, de caveolas y de los *rafts* que contienen los receptores de la interleucina-2 (IL-2); sin embargo, no afectaban a la internalización de fluidos, sugiriendo, por primera vez, la existencia de otro mecanismo de pinocitosis (Damke et al. 1995). La primera evidencia de la participación de las GTPasas RhoA en un mecanismo de endocitosis, fue descrita por Lamaze y cols (Lamaze et al. 2001). En este estudio se determinó que la internalización del receptor de IL-2 era independiente de clatrina y de caveolas, pero dependiente de *rafts*, de dinamina y de RhoA. Además, se ha descrito que la internalización mediada por *rafts* puede ser tanto dependiente como independiente de dinamina (Nichols and Lippincott-Schwartz 2001). Otra GTPasa implicada en la endocitosis independiente de dinamina es Cdc42. El papel de Cdc42 fue determinado estudiando los efectos de inhibidores de RhoA, de dominantes negativos de Cdc42 y de CtxB en la internalización de GPI-AP (Sabharanjak et al. 2002). Esta vía

independiente de dinamina parece ser la principal ruta de internalización independiente de clatrina y de caveolas de la CtxB. Se ha propuesto que la GTPasa Arf6 tiene un papel en la endocitosis independiente de dinamina de varias proteínas, tales como el complejo de histocompatibilidad I (MHC I), integrina $\beta 1$, caderina E y carboxipeptidasa E. Sin embargo, la intervención directa de esta GTPasa todavía no se ha determinado, existiendo la posibilidad de que actúe conjuntamente con Cdc42 (Mayor and Pagano 2007).

Se han intentado establecer criterios de clasificación para los distintos mecanismos de endocitosis, como los componentes del recubrimiento de la vesícula, la composición lipídica de la vesícula, el mecanismo de fisión, la regulación por GTPasas y la molécula que va a ser transportada, además de su destino y función intracelulares. Pese a que no exista, actualmente, un sistema consensuado de clasificación de endocitosis independiente de clatrina, Pagano (Mayor and Pagano 2007) ha propuesto un sistema basado, primero, en la dependencia de la dinamina y a continuación, en la participación de las GTPasas RhoA, Cdc42 y Arf6 en las diferentes vías de internalización (Esquema 9 y 13). Este sistema de clasificación no es, *a priori*, definitivo, dado que los mecanismos de endocitosis independiente de clatrina y de caveolas son, actualmente, objeto de una intensa investigación.



Esquema 13 Sistema de clasificación propuesto para la endocitosis independiente de clatrina. Este sistema se basa primero en la dependencia de la dinamina y, a continuación, en la participación de las GTPasas RhoA, Cdc42 y Arf6 en las varias vías de internalización. Así, dependientes de dinamina existen la endocitosis mediada por caveolas y la regulada por RhoA e independientes de dinamina existen la endocitosis regulada por Cdc42 y la regulada por Arf6 (Adaptado de (Mayor and Pagano 2007)).

1.3.5.1 Formación, escisión, internalización y destino de los rafts

El mecanismo de formación, escisión e internalización de los rafts independiente de la dinamina todavía es poco conocido. Se ha sugerido que la internalización de la CtxB mediada por Cdc42 ocurre mediante la formación de dominios endocíticos activos tras la

asociación de “nanodominios” ricos en el monosialogangliósido GM1, el receptor de la CtxB (Mayor and Rao 2004). Por otra parte, las proteínas de membrana flotilina-1 y flotilina-2 pueden tener un papel en la selección de la molécula que va a ser transportada por endocitosis independiente de dinamina. Se ha descrito la co-localización de estas proteínas con la CtxB y con GPI-AP en la superficie de células que no tienen caveolina. De hecho, el silenciamiento de la flotilina-1 inhibió la internalización independiente de dinamina de la CtxB, implicando a la flotilina como un componente citoplasmático de este tipo de endocitosis (Glebov et al. 2006). La endocitosis independiente de dinamina de la CtxB ocurre vía “transportadores independientes de clatrina y de dinamina”, o CLICs (Kirkham et al. 2005). Estas estructuras se forman directamente a partir de invaginaciones tubulares en la membrana. De momento, este tipo de vesículas son las únicas que se conocen para la endocitosis independiente de dinamina.

El destino de las vesículas tras su internalización es el endosoma temprano. A continuación, las moléculas siguen las rutas “habituales”, o sea, se dirigen al Golgi, al retículo endoplasmático o son recicladas a la membrana. La endocitosis independiente de clatrina y de caveolas es un mecanismo poco estudiado de momento, no existiendo información sobre la forma de selección de moléculas, la forma de escisión de las vesículas o la regulación de estas formas de endocitosis.

1.3.6 Redundancia en los procesos de endocitosis

Se han producido muchos avances en el estudio de la endocitosis independiente de clatrina. Sin embargo, algunas limitaciones han dificultado su estudio, como la distinción entre sus diferentes vías de internalización. Por ejemplo, la disminución de los niveles de colesterol o de los esfingolípidos en general destruye las caveolas e inhibe la endocitosis caveolar (Rothberg et al. 1992; Cheng et al. 2006), pero también otros mecanismos de endocitosis independientes de caveolas. En 2006, Cheng y cols determinaron que la desaparición sólo de los glicoesfingolípidos bloquea selectivamente la endocitosis caveolar (Cheng et al. 2006). Este importante estudio permitió diferenciar entre endocitosis caveolar y endocitosis independiente de caveolas. Otra limitación sobreviene de la posibilidad de que algunas moléculas, usadas como marcadores endocíticos específicos, puedan internalizarse por mecanismos distintos en diferentes tipos de células o, incluso, que en el mismo tipo de células puedan cambiar la vía de internalización al modificar las condiciones. Un ejemplo es la albúmina, de la que se ha descrito que puede ser internalizada por endocitosis mediada por caveolas en células endoteliales (endotelio

pulmonar, endotelio del plexo coroideo) y fibroblastos humanos (Schnitzer and Oh 1994; Schubert et al. 2001; Singh et al. 2003; Carro et al. 2005), por endocitosis mediada por clatrina en las células del túbulo proximal renal o del epitelio mamario (Christensen et al. 1998; Monks and Neville 2004) y, recientemente, por un mecanismo independiente de clatrina y caveolina (dependiente de RhoA) en las células CHO (*Chinese hamster ovary*) (Cheng et al. 2006). Otro ejemplo es la toxina colérica, de la que se ha descrito que se internaliza tanto por endocitosis mediada por clatrina en neuronas del hipocampo (Shogomori and Futerman 2001 Torgersen, 2001, 3737), como por endocitosis mediada por caveolas (Montesano et al. 1982; Parton et al. 1994) y, recientemente, por endocitosis independiente de clatrina, caveolas y dinamina y dependiente de Cdc42 en fibroblastos embrionicos de ratón (Kirkham et al. 2005). A pesar de ello, tanto la albúmina como la CtxB son consideradas marcadores específicos de la endocitosis caveolar. Por otra parte, el receptor del EGF, un receptor normalmente internalizado vía clatrina, podría ser internalizado por caveolas tras su ubiquitinación (Sigismund et al. 2005). Todas estas evidencias sugieren una redundancia en los mecanismos de endocitosis independientes de clatrina que pueden ser aprovechados por algunas moléculas. Un buen ejemplo de esta redundancia ocurre en los ratones knockout de caveolina-1. Estos ratones son, sorprendentemente, viables, aunque no se detecten caveolas en sus células y presenten defectos pulmonares y vasculares junto con anormalidades motoras y del comportamiento (Drab et al. 2001; Galbiati et al. 2001; Razani et al. 2001; Trushina et al. 2006).

1.4 Los PPARs

Los PPARs, receptores activados por proliferadores de peroxisomas, fueron clonados como receptores nucleares que median los efectos de compuestos sintéticos, llamados proliferadores de peroxisomas, en la transcripción génica. Son miembros de la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas, conjuntamente con los receptores de las hormonas tiroideas (TR), del ácido retinoico (RAR), de la vitamina D (VDR) y de los receptores huérfanos Rev-ErbA α y E75, siendo estos dos últimos los más semejantes a los PPARs.

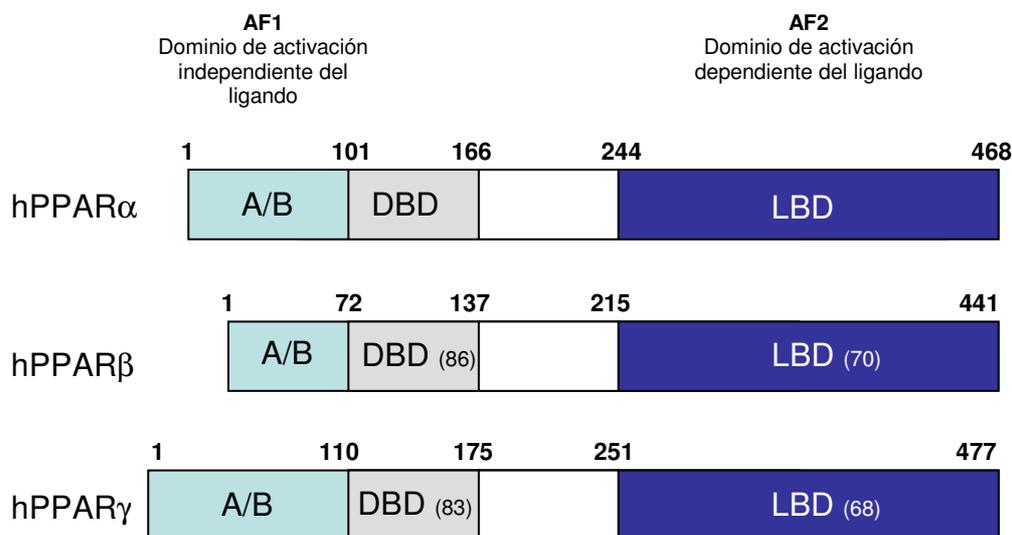
Los PPAR forman con los receptores del ácido 9-*cis*-retinoico, RXR (*retinoid X receptor*), un heterodímero PPAR:RXR y son activados por ácidos grasos naturales y eicosanoides, además de por algunas drogas hipolipidémicas y antidiabéticas. Los PPARs controlan la transcripción de diversos genes que codifican enzimas implicadas en la β -oxidación peroxisomal y mitocondrial, síntesis de cuerpos cetónicos, ω -hidroxilación microsomal, así como proteínas implicadas en la síntesis de ácidos grasos, apolipoproteínas, lipoproteína lipasa, enzima málica, fosfoenolpiruvatocarboxikinasa y la proteína desacopladora BAT del tejido adiposo marrón. Las funciones “clásicas” de los PPARs incluyen la regulación del transporte y metabolismo de lípidos, pero también están implicados en la homeostasis de glucosa, obesidad, aterosclerosis, respuestas inflamatorias, inmunidad y cáncer (Desvergne and Wahli 1999; Kersten et al. 2000)

1.1.1 Isoformas y estructura

Han sido identificadas tres isoformas de PPAR, α , β/δ y γ , en vertebrados, incluyendo *Xenopus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetulus griseus* y *Homo sapiens*. Además, el gen humano y de ratón de PPAR γ origina, a través de *splicing* alternativo, tres mRNAs (PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3) que difieren en el extremo 5', traducándose, sin embargo, proteínas con dominios idénticos (Desvergne and Wahli 1999). Las isoformas de PPAR, a pesar de estar codificadas por genes distintos en cromosomas distintos, presentan una elevada homología de secuencia y estructura. Sin embargo, cada isoforma tiene un patrón de expresión tisular único, diferencias importantes en sus actividades reguladoras y modulan respuestas específicas después de su activación (Daynes and Jones 2002).

Los PPARs están constituidos por un dominio A/B en el extremo amino, que contiene la función de activación de la transcripción independiente del ligando 1 (AF-1), un dominio de unión al DNA (DBD) formado por dos “dedos de zinc”, una región de articulación y una

región de unión al ligando (LBD), que contiene la función de activación de la transcripción dependiente del ligando 2 (AF-2) (Gearing et al. 1994; Zhu et al. 1995). La estructura general de los PPARs está representada en el esquema 14.



Esquema 14. Estructura general de los PPARs humanos. Se encuentran señalados los aminoácidos entre cada dominio. En los dominios DBD y LBD se indica el porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos de PPAR β y PPAR γ con respecto al PPAR α . AF1, dominio de activación independiente del ligando; AF2, dominio de activación dependiente del ligando; A/B, dominio A/B; DBD, dominio de unión al DNA; LBD, dominio de unión al ligando.

El dominio DBD es el más conservado de todos los receptores nucleares, constituyendo la referencia de esta superfamilia. Está formado por dos “dedos de zinc”, que se pliegan en una estructura globular que puede reconocer una secuencia específica de DNA de 6 nucleótidos. Sin embargo, los PPARs no son capaces de unirse al DNA ni como monómeros ni como homodímeros, dependiendo, para ello, de la formación de un heterodímero con el RXR (Kliewer et al. 1992). La incapacidad del PPAR de unirse al DNA como monómero se debe al efecto inhibitor del dominio A/B (Hsu et al. 1998).

1.1.2 Ligandos

Los ligandos naturales de los PPARs son, principalmente, ácidos grasos insaturados, como por ejemplo el ácido docosahexanoico (C22:6), el ácido araquidónico (C20:4) o el ácido oleico (C18:1). Sin embargo, el ácido elaídico (C18:1, isómero *trans* del ácido oleico) o el ácido nervónico (C24:1) no son ligandos de los PPARs. Los ácidos grasos insaturados se unen a las tres isoformas, siendo el PPAR α el que tiene mayor afinidad a concentraciones fisiológicas. Algunos ácidos grasos saturados, como el ácido mirístico

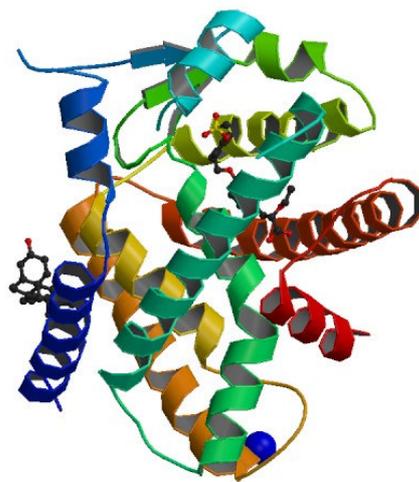
(C14:0), el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) también son ligandos de los PPARs, pero con menor afinidad que los ácidos grasos insaturados. El hecho de que los ácidos grasos sean ligandos de factores de transcripción como los PPARs, demuestra su versatilidad e importancia, siendo, además de moléculas proveedoras de energía, reguladores del metabolismo. Algunos eicosanoides, derivados del ácido araquidónico, como el leucotrieno B₄, la 15-desoxi- Δ 12,14-prostaglandina J₂ y los ácidos hidroxeicosapentanoicos (8-HEPE) e hidroxeicosatetranoicos (8-HETE), son también ligandos naturales de los PPARs (Forman et al. 1997; Kliewer et al. 1997; Krey et al. 1997). Además de ligandos naturales, existen ligandos sintéticos. Hay un gran interés en el desarrollo de estos ligandos, cada vez más específicos y potentes, que son empleados en el tratamiento de ciertas enfermedades. En este sentido, los fibratos, tales como el ácido clofíbrico, el ácido ciprofíbrico y el ácido pirinixínico (Wy14643), agonistas selectivos del PPAR α , son potentes fármacos hipolipidémicos. Por otra parte, las tiazolidinedionas (TZDs), como troglitazona, pioglitazona y rosiglitazona, agonistas selectivos de PPAR γ , se emplean como antidiabéticos y en la prevención de la progresión de la placa ateromatosa. Por último, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como es el caso del ibuprofeno, son también ligandos sintéticos de PPAR γ (Desvergne and Wahli 1999).

1.1.3 Activación transcripcional por PPARs

En ausencia de ligando, el heterodímero PPAR:RXR se encuentra unido a correpresores, que inhiben la unión del heterodímero a los promotores, resultando en un silenciamiento transcripcional de los genes diana. Los correpresores del PPAR γ y del PPAR α son el SMRT (mediador del silenciamiento para los receptores retinoicos y del tiroides) y el N-CoR (correpressor de receptor nuclear), respectivamente (DiRenzo et al. 1997).

La activación de los PPARs está mediada por la unión de sus ligandos, pero los PPARs también pueden ser activados por fosforilación. Los ligandos de los PPARs se unen al dominio LBD, que está menos conservado que el dominio DBD entre los receptores nucleares. La estructura del LBD consiste en un *sandwich* de 12 hélices α -antiparalelas, dispuestas en tres capas con un bolsillo hidrofóbico central. Después de la unión del ligando, el movimiento de la hélice 12 (o hélice de activación de función, HAF) cierra el bolsillo de unión del ligando como una tapa (Bourguet et al. 1995). La estructura del dominio LBD de los PPARs contiene una hélice adicional, llamada hélice 2', que proporciona a los ligandos un acceso más fácil al bolsillo hidrofóbico (Esquema 15), que

es, además, particularmente grande (~1300Å) comparado con otros dominios LBD (~600Å), ocupando el ligando apenas el 30-40% del espacio (Xu et al. 1999). La unión de los ligandos al bolsillo se lleva a cabo por interacciones con aminoácidos específicos (como ejemplo, la rosiglitazona se une a las histidinas H323 y H449 del PPAR γ), pero también por interacciones no específicas libres que la región hidrofóbica del ligando pueda desarrollar con el bolsillo. Este hecho, conjuntamente con el fácil acceso del ligando al bolsillo, define los PPARs como receptores nucleares que han evolucionado para unir múltiples ligandos naturales con relativa baja afinidad (Xu et al. 1999).



Esquema 15. Estructura cristalográfica del dominio de unión al ligando (LDB) del PPAR α humano en complejo con el agonista sintético Az242, obtenida por difracción de rayos-X (modificado de (Ljung et al. 2002)).

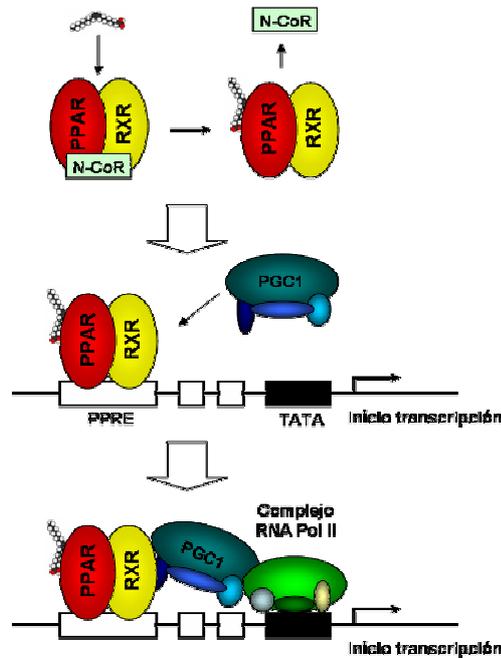
Los PPARs se activan también por fosforilación. Tanto PPAR α como PPAR γ pueden ser fosforilados por MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) en el dominio A/B (dominio de activación AF1), activando la expresión de genes diana, siendo este efecto inhibido parcialmente por un inhibidor de MAPK (Zhang et al. 1996; Juge-Aubry et al. 1999). Los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y el derivado de plaquetas (PDGF) también aumentan la actividad transcripcional del PPAR γ mediante su fosforilación a través de MAPK. Las kinasas ERK (proteína quinasa regulada por señales extracelulares) y JNK (quinasa c-Jun N-terminal) también pueden fosforilar al PPAR γ . Además, la mutación del un residuo fosforilable en el dominio AF1 (serina 112) reduce la afinidad del PPAR γ por el ligando, sugiriendo que el estado de fosforilación de la serina 112 juega un papel importante en la conformación del receptor sin ligando, regulando, de este modo, la afinidad de PPAR γ por sus ligandos (Hu et al. 1996; Camp and Tafuri 1997).

También las proteínas kinasas A y C (PKA y PKC) fosforilan al PPAR α . Se ha demostrado que activadores de la PKA incrementan la actividad de los tres PPARs en ratón, tanto de forma dependiente como independiente del ligando, y que la PKA fosforila los PPARs en varios dominios, principalmente en el DBD (Lazennec et al. 2000). Además, los activadores de la PKA incrementan la expresión de los genes diana del PPAR α y los inhibidores de la PKA reprimen en un 50-75% los efectos del agonista de PPAR α Wy14643, sugiriendo que los ligandos actúan, en parte, a través de la ruta de la PKA. Más recientemente se ha demostrado que el hPPAR α se fosforila por dos isoformas de la PKC, α y β II, y que los aminoácidos clave fosforilados por la PKC son las serinas 179 y 230, ya que su substitución por alaninas reduce la fosforilación de PPAR α (Blanquart et al. 2004). La actividad transcripcional inducida por ligando del PPAR α se regula por la actividad de la PKC, dado que disminuye por inhibición de la PKC. Por otro lado, la inhibición de la PKC incrementa la represión del fibrinógeno- β . Es necesario mencionar que el PPAR α reprime genes de respuesta a la inflamación, como el del fibrinógeno- β , de un modo independiente de PPRE. Por tanto, se sugiere que la ruta de señalización de la PKC actúa como un interruptor molecular que disocia las funciones de transactivación y transrepresión del PPAR α .

La activación de los PPARs por unión del ligando o por fosforilación induce la disociación del correpressor del complejo PPAR:RXR activado y la unión de éste a una secuencia específica de DNA, el PPRE (elemento de respuesta a PPAR), localizado junto al promotor del gen diana (Tugwood et al. 1992) (Esquema 16). Los PPREs tienen la secuencia específica 5'-AACT AGGNCA A AGGTCA-3', siendo distintos de los elementos tipo DR1 (formados por dos motivos AGGTCA separados por un nucleótido), que son elementos también reconocidos por otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares. De este modo, hay una selectividad en la unión de PPAR:RXR a PPREs cuando se compara con otros receptores nucleares. Además, la estructura específica de los PPREs impone una polaridad en la unión del heterodímero: PPAR se une al primer hexanucleótido y RXR al segundo (Jeannin et al. 1997; Osada et al. 1997).

La unión del complejo PPAR:RXR activado al PPRE induce una alteración conformacional que permite el contacto específico con los coactivadores (como PGC1, PGC2, PBP/TRAP220, p300, ARA70 o RIP140), moléculas que hacen de puente entre los factores de transcripción unidos a DNA y la maquinaria de iniciación de la transcripción. De hecho, el complejo PPAR:RXR unido al PPRE se une a un complejo coactivador-acetiltransferasa en el promotor de gen diana. El complejo coactivador-acetiltransferasa

acetila las colas de histonas en el sitio de inicio de la transcripción, produciendo, de esta forma, un promotor transcripcionalmente competente (Ogryzko et al. 1996; Privalsky 2004). Después, factores de transcripción adicionales (Sp1, NF1) y la maquinaria de transcripción, incluyendo el complejo de iniciación RNA Pol II, son reclutados por el promotor accesible y se inicia la transcripción (Esquema 16).



Esquema 16. Modelo de activación transcripcional por PPARs. El complejo PPAR:RXR/correpresor, no ligado a DNA, se activa por ligando (ácido oleico, en el esquema), resultando en la disociación del correpresor del complejo PPAR:RXR/ligando. El heterodímero activado PPAR:RXR se transloca al núcleo y se une al PPRE del gen diana, produciendo una alteración conformacional de la cromatina, llevando a la liberación de la histona H1. El PPAR:RXR unido a PPRE se une a un complejo coactivador-acetiltransferasa en el promotor. El complejo coactivador-acetiltransferasa acetila la cola de histonas en el sitio de inicio de la transcripción, produciendo, de esta forma, un promotor transcripcionalmente competente. Los factores de transcripción adicionales (Sp1, NF1) y la maquinaria de transcripción, incluyendo el complejo de iniciación RNA Pol II, son reclutados por el promotor accesible y se inicia la transcripción.

1.1.4 Expresión del mRNA de los PPARs

A pesar de la elevada homología de la secuencia y la estructura, las tres isoformas de PPAR tienen un patrón de expresión tisular único, diferencias importantes en sus actividades reguladoras y modulan respuestas específicas después de su activación.

El PPAR α de rata y ratón empieza a expresarse el día E13,5 del desarrollo embrionario en los tejidos donde se expresará en el adulto. Además, hay una expresión transitoria en el sistema nervioso central en desarrollo y durante la maduración de la epidermis (Braissant

and Wahli 1998; Cullingford et al. 1998). En la rata adulta se detectan niveles elevados de mRNA en el hígado, riñón, corazón, tejido adiposo marrón, mucosa gástrica y del duodeno, así como en la retina, glándula adrenal, músculo esquelético y páncreas (Braissant et al. 1996). En el hombre, la expresión del mRNA de PPAR α es idéntica a la de la rata, exceptuando el hígado, donde estos niveles son más bajos (Auboeuf et al. 1997). La expresión de PPAR α se correlaciona con la elevada β -oxidación mitocondrial y peroxisomal en estos tejidos.

El PPAR β empieza a expresarse el día E8,5 del desarrollo embrionario y en la rata adulta se expresa de forma ubicua y elevada, particularmente en los músculos esquelético y cardíaco (Braissant et al. 1996; Braissant and Wahli 1998; Cullingford et al. 1998). En el hombre, la expresión es moderada y ubicua, siendo abundante en la placenta y en el intestino grueso. (Auboeuf et al. 1997).

En la rata y el ratón adultos, PPAR γ se expresa mayoritariamente en los tejidos adiposos blanco y marrón. También hay una expresión elevada en el colon, ciego y bazo. En la retina, músculo esquelético e intestino delgado hay una baja expresión de PPAR γ (Braissant et al. 1996). En el hombre, PPAR γ 1 y 2 se expresan abundantemente en los tejidos adiposos y en niveles bajos en músculo esquelético. El PPAR γ 1 se expresa también en hígado, corazón y riñón. El hPPAR γ no se expresa ni en el bazo ni en linfocitos T, pero sí en varias líneas celulares mieloides y de linfocitos B (Auboeuf et al. 1997). Es importante destacar que en ratón, las tres isoformas de los PPARs tienen un pico de expresión en el SNC entre los días E13,5 y E18,5 (Braissant and Wahli 1998).

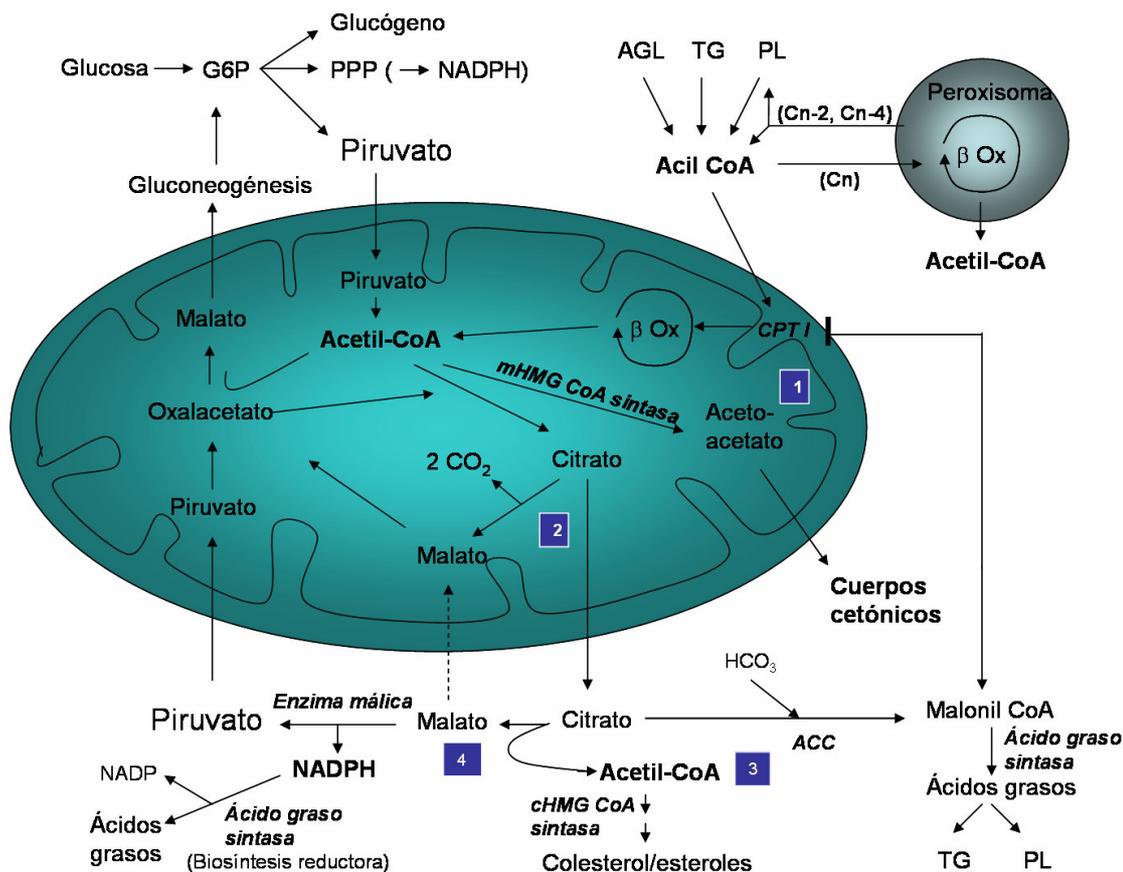
1.1.5 Papel de los PPARs en el metabolismo lipídico

Las principales funciones de los PPARs son el metabolismo y el transporte lipídico. Los PPARs controlan la entrada de los ácidos grasos en los hepatocitos, enterocitos y adipocitos, pues las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) y de la translocasa de ácidos grasos (FAT) son genes diana del PPAR α y γ . Además, el PPAR α controla el ensamblaje de lipoproteínas y su transporte, al ser factor de transcripción de las apolipoproteínas A I, II y III (Desvergne and Wahli 1999). Sin embargo, las funciones más estudiadas han sido la regulación de la β -oxidación de ácidos grasos por el PPAR α y de la adipogénesis por el PPAR γ .

El PPAR α es el regulador principal de la β -oxidación de ácidos grasos en el hígado, pues controla la expresión de varios genes de esta vía. De hecho, los agonistas del PPAR α no

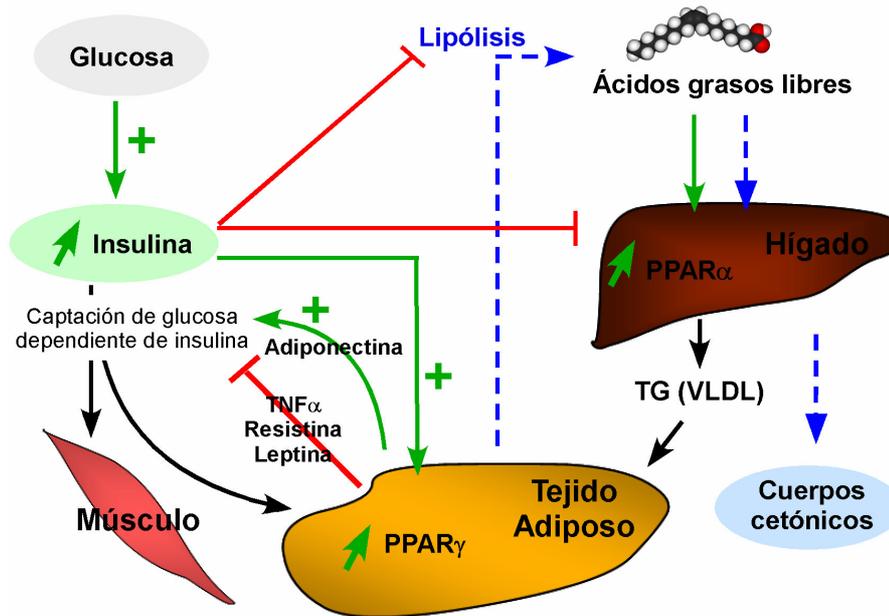
son capaces de inducir la β -oxidación en el ratón knockout de PPAR α , presentando éstos niveles elevados de ácidos grasos libres en la sangre (Lee et al. 1995). Son genes diana del PPAR α los que codifican la acil-CoA oxidasa (ACO), que es la enzima limitante de la β -oxidación perioxosomal, la enzima multifuncional enoil-CoA hidratasa/deshidrogenasa (HD), la cetoacil-CoA tiolasa, la carnitina palmitoil transferasa I (CPT I), la deshidrogenasa de cadenas medias de acil-CoA (MCAD) y la hidroximetilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (mHMG-CoAS), que es la principal enzima implicada en la formación de cuerpos cetónicos. El gen de la enzima málica, que es una enzima clave para la síntesis hepática de ácidos grasos, es también un gen diana del PPAR α , tal como el gen de la acil-CoA sintetasa (ACS), que está implicada en la reesterificación de ácidos grasos de cadena larga en triglicéridos. Al controlar estos genes, el PPAR α está, de este modo, implicado en la homeostasis lipídica (Desvergne and Wahli 1999) (Esquema 17).

El desarrollo de agonistas selectivos de PPAR β ha permitido desvelar, recientemente, su papel como un potente regulador del catabolismo de ácidos grasos en el músculo esquelético y cardíaco y de la homeostasis energética, actuando de forma similar al PPAR α (Oliver et al. 2001; Barish et al. 2006). Por otra parte, el ratón knockout de PPAR β presenta una reducción del tejido adiposo y cuando es alimentado con una dieta rica en grasas, ha demostrado ser propenso a la obesidad (Wang et al. 2003). De esta forma, el PPAR β actúa como un regulador clave en la eliminación de grasas y sus agonistas podrán tener un valor terapéutico en la obesidad y la diabetes (Evans et al. 2004). Los PPAR γ tienen un papel directo y clave en la adipogénesis y en el normal funcionamiento de los adipocitos. De hecho, agonistas del PPAR γ , como los TZDs, son capaces de promover la conversión de preadipocitos en adipocitos, en un proceso que conlleva un incremento de la expresión del PPAR γ , y la expresión forzada de PPAR γ en células no-adipogénicas las convierte en adipocitos maduros (Chawla et al. 1994). Además, los ratones *knockout* de PPAR γ no desarrollan tejido adiposo (Barak et al. 1999). Estudios *in vitro* demuestran que el PPAR γ es el último efector en la adipogénesis, en una cascada transcripcional que también incluye las tres isoformas (α , β y δ) de la familia de factores de crecimiento C/EBP (Rosen et al. 1999).



Esquema 17. Homeostasis lipídica y energética en el hepatocito. Los ácidos grasos de cadena muy larga (>20C) que provienen de la dieta y que no pueden entrar en la mitocondria, son acortados mediante la β-oxidación peroxisomal, liberándose en cada ciclo una molécula de acetil-CoA que puede ser utilizada por el sistema de elongación de las cadenas de ácidos grasos o ser usada en la síntesis de esteroides. Los ácidos grasos con menos de veinte carbonos, que provienen de la dieta y de la β-oxidación peroxisomal, son translocados a través de la membrana interna mitocondrial por la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), que cataliza la formación de acilcarnitina. Las moléculas de acetil-CoA producidas en cada ciclo de β-oxidación mitocondrial pueden seguir distintas rutas metabólicas (señaladas como 1,2,3 y 4). Una de ellas es la conversión en acetacetato (cuerpo cetónico), en una reacción catalizada por la hidroximetilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (mHMG-CoAS) (ruta 1). Los cuerpos cetónicos se destinan a suplir los gastos energéticos del cerebro, los riñones, el corazón y el músculo esquelético en situaciones de esfuerzo físico, ayuno o estrés (niveles bajos de glucosa), en que los niveles de oxalacetato son bajos o inexistentes debido a su uso en la gluconeogénesis. En otra ruta, el acetil-CoA se une a oxaloacetato (normalmente suministrado por la vía glucolítica a través de piruvato) para formar citrato, que puede, por un lado, entrar en el ciclo del ácido cítrico para oxidarse completamente en CO₂ (ruta 2) y, por otro, ser exportado al citosol. Una vez en el citosol, el citrato se rompe por la citrato liasa en acetil-CoA y oxaloacetato. El acetil-CoA (ruta 3) puede ser convertido en mevalonato por la hidroximetilglutaril-CoA sintasa citosólica (cHMG-CoAS) para formar colesterol y otros esteroides, o en malonil-CoA por la acetilCoA carboxilasa (ACC), para formar ácidos grasos a través de la ácido graso sintasa. El oxalacetato es reducido a malato por la malato deshidrogenasa, que puede entrar en la mitocondria o ser descarboxilado por la enzima málica, formando piruvato con producción de NADPH (ruta 4). El NADPH es necesario para la síntesis lipídica por la ruta reductora (ácido graso sintasa). G6P, glucosa 6 fosfato; PPP, ruta de las pentosas fosfato; AGL, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos, PL, fosfolípidos, β ox, β-oxidación; ACC, acetilCoA carboxilasa; CPT I, carnitina palmitoiltransferasa I.

Varios genes que regulan la adipogénesis son controlados por el PPAR γ . Las sintetasas de ácidos grasos y triglicéridos son promovidas después de la activación de la enzima málica por PPAR γ . El gen de la PEPCCK, que está implicada en la producción de glicerol para el almacenamiento de ácidos grasos en forma de triglicéridos, también es un gen diana del PPAR γ , así como el gen del transportador de glucosa dependiente de insulina, GLUT4, que ayuda a mantener la homeostasis de la glucosa, el gen de la proteína de unión a ácidos grasos, aP2, y el gen de la LPL, que es secretada por los adipocitos y promueve la liberación de ácidos grasos de los triglicéridos unidos a lipoproteínas en el espacio extracelular. El receptor de lipoproteínas CD36 y los reguladores de la síntesis de esteroides y ácidos grasos, SREBP-1 y SCD-1, respectivamente, son también genes diana del PPAR γ . Al regular todos estos genes, PPAR γ promueve la adipogénesis e, intrínsecamente, la lipogénesis y el almacenamiento de lípidos (Desvergne and Wahli 1999).



Esquema 18. Comunicación cruzada entre distintos tejidos en la homeostasis de glucosa y de lípidos. La glucosa proveniente de la dieta estimula la secreción de insulina, que promueve la captación de glucosa por el músculo esquelético y el tejido adiposo. Además, la insulina inhibe la lipólisis adipocítica y la glucogenolisis y gluconeogénesis hepáticas e incrementa la acumulación lipídica en los adipocitos por aumento de la expresión del PPAR γ . La ruta señalada en azul representa una situación en que los niveles de glucosa son bajos (estrés, ayuno, esfuerzo físico o diabetes), en que ocurre liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo y consecuente captación por los hepatocitos para producción de cuerpos cetónicos (mediada por el PPAR α). El PPAR γ inhibe también la síntesis de las moléculas señalizadoras TNF α , resistina, leptina y adiponectina, moléculas que reducen la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de ácidos grasos en hígado y músculo. Además, el incremento de la captación de ácidos grasos y triglicéridos (TG) por el tejido adiposo redirecciona los ácidos grasos del músculo hacia el tejido adiposo y también libera la inhibición, mediada por ácidos grasos, de la utilización de glucosa por las células musculares. De esta forma, se verifica una comunicación cruzada entre distintos tejidos, que contribuye a la homeostasis de la glucosa y de los lípidos.

Los PPAR α y PPAR γ desempeñan un papel clave en la homeostasis de lípidos y de glucosa, que dependen del estado de energía del organismo. El PPAR α modula la tasa de absorción de ácidos grasos, la esterificación en triglicéridos (posteriormente absorbidos por los adipocitos) y la oxidación de los ácidos grasos en el hígado, regulando los niveles de lípidos en circulación. Además, cuando los niveles de energía es bajo (en situaciones de estrés o de ayuno) se estimula la lipólisis en el tejido adiposo, incrementándose los niveles de ácidos grasos libres en el plasma. Los ácidos grasos son rápidamente captados por los hepatocitos, resultando en un incremento de la concentración intracelular de estos activadores del PPAR α , que inducen un incremento de la β -oxidación de ácidos grasos con producción de energía (ATP o, indirectamente, cuerpos cetónicos), para compensar la falta de energía (Kersten et al. 1999) (Esquema 18). Por otra parte, el exceso de glucosa (no captada por el músculo ni el tejido adiposo) es almacenada como glucógeno en el hígado o, si las reservas de glucógeno se encuentran saturadas, convertida en triglicéridos (Esquema 17, ruta 3), posteriormente absorbidos por los adipocitos.

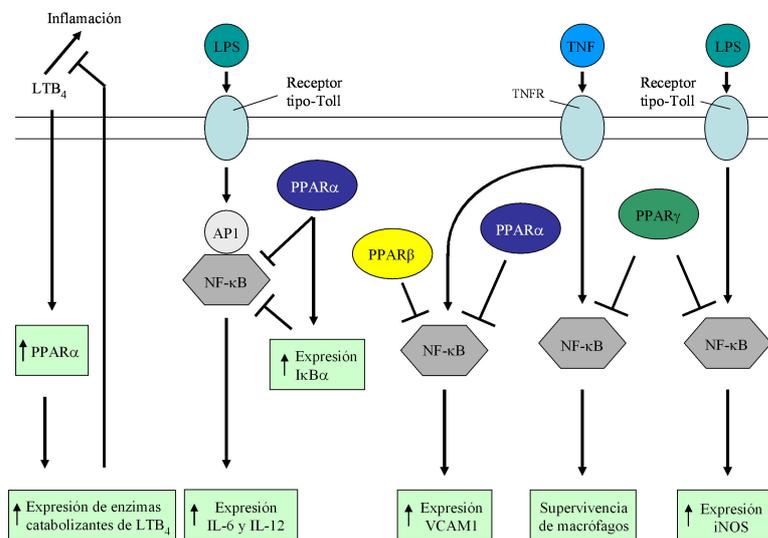
El PPAR γ induce el almacenamiento de los lípidos en circulación en los adipocitos e inhibe la síntesis de la leptina, resistina y TNF α , moléculas señalizadoras que inducen un incremento de la lipólisis y resistencia a la insulina. El PPAR γ estimula también la síntesis de adiponectina, que promueve la oxidación de ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina en el músculo y en el hígado, incrementando los niveles plasmáticos de glucosa muscular e inhibiendo la producción de glucosa hepática. Además, la insulina, cuya expresión es regulada positivamente por los niveles de glucosa, controla positivamente la expresión del PPAR γ y negativamente la expresión del PPAR α , regulando, de esta forma, la homeostasis de la glucosa, en conjunto con el tejido adiposo y el hígado (Esquema 17 y 18).

1.1.6 Nuevas funciones de los PPARs

En los últimos años, el espectro de funciones mediadas por los PPARs se ha ampliado considerablemente. El papel de los PPARs en la regulación de los procesos inflamatorios en general, permitió relacionarlos con enfermedades que integran una respuesta inflamatoria en sus procesos, como es el caso de la aterosclerosis o del infarto cerebral agudo. Además, los PPARs también están implicados en la respuesta inmune y en el cáncer.

1.1.6.1 Los PPARs en las respuestas inflamatorias

Las tres isoformas de PPARs están implicadas en la regulación de las respuestas inflamatorias. Los PPARs inhiben la inflamación por transrepresión de la actividad de varios factores de transcripción, como el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP1), el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT), que regulan la expresión de varias citoquinas, como IL-6, IL-12 y TNF- α . Además, el PPAR α aumenta la expresión del factor de transcripción I κ B α , inhibidor de la expresión del NF- κ B, y de enzimas del catabolismo del leucotrieno B $_4$, una potente molécula pro-inflamatoria (Daynes and Jones 2002) (Esquema 19).



Esquema 19. Mecanismos moleculares de la regulación de las respuestas inflamatorias mediadas por PPARs. La mayoría de las propiedades antiinflamatorias de los PPARs resultan de la capacidad para antagonizar las rutas de señalización de los factores de transcripción NF- κ B y AP1. Al inhibir, por transrepresión, NF- κ B y AP1, los PPARs inhiben varios genes involucrados en las respuestas inflamatorias, como citoquinas, moléculas de adhesión celular y otros mediadores de señales proinflamatorias, como la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). I κ B α , inhibidor de NF- κ B; IL, interleucina; LTB $_4$, leucotrieno B $_4$; LPS, lipopolisacárido; TNF, factor de necrosis tumoral; TNFR, receptor de TNF; VCAM1, molécula de adhesión de células vasculares.

1.1.6.2 Los PPARs en aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad que se caracteriza por la formación de una lesión en zonas susceptibles de las paredes arteriales y subsecuente formación progresiva de la placa ateromatosa, lo que conduce a la obstrucción de la arteria. Los PPARs tienen un efecto antiaterosclerótico al regular la diferenciación de células espumosas, la reacción

inflamatoria, la proliferación celular y la estabilidad de la placa aterosclerótica (Kersten et al. 2000). La activación de los PPAR α por fibratos, potentes fármacos hipolipidémicos, aumenta el catabolismo de lipoproteínas, aumenta la expresión del gen de la LPL, reduce la producción de VLDL y aumenta los niveles de HDLs. Al reducir los niveles de partículas ricas en triglicéridos en la sangre, los PPARs disminuyen la formación de células espumosas repletas de lípidos. Además, la activación de los PPARs inhibe la expresión, por parte de las células espumosas, de las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF α , responsables de la respuesta inflamatoria de la lesión ateromatosa y de la proliferación de células del músculo liso, regulando, así, la progresión de la placa ateromatosa (Jiang et al. 1998). La activación del PPAR γ por TZDs en el tejido adiposo promueve el almacenamiento de lípidos en este tejido, bajando los niveles de VLDL de la sangre (Murase et al. 1998). Por último, la activación del PPAR γ disminuye la expresión de la metaloproteína MMP9, una proteasa implicada en la desestabilización de la placa ateromatosa (Ricote et al. 1999).

Así, de un modo general, los agonistas del PPAR α y del PPAR γ mejoran el perfil de riesgo global de padecer enfermedades cardiovasculares al mejorar la sensibilidad a la insulina en pacientes con el síndrome de resistencia a insulina. Este síndrome se caracteriza por la escasa utilización celular de glucosa, a pesar de los niveles elevados de insulina en la sangre, resultando en hiperglucemia. La resistencia a la insulina está relacionada con la diabetes, dislipidemia, aterosclerosis e hipertensión, que constituyen en conjunto el síndrome X (síndrome metabólico). Actualmente, se están realizando ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares con coagonistas de PPAR α y PPAR γ , denominados agonistas dobles, que activan los dos receptores simultáneamente, pudiendo producir efectos complementarios y sinérgicos. Los estudios realizados demuestran que estos agonistas dobles controlan el metabolismo lipídico a través del PPAR α , mejoran la sensibilidad a la insulina a través del PPAR γ y regulan las respuestas inflamatorias a través de los dos receptores. Además, los efectos secundarios mediados por el PPAR γ , como el aumento de peso, podrían ser contrarrestados por los efectos mediados por el PPAR α (Evans et al. 2004)

1.1.6.3 Los PPARs en inmunidad

Los PPARs tienen, en general, un efecto supresor en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Los PPARs (α y γ) pueden inhibir las respuestas inmunes innatas y adaptativas, que son mediadas por los glucocorticoides, al inhibir la enzima 11- β hidroxisterol-deshidrogenasa 1, una enzima que convierte la cortisona inactiva en cortisol activo (Hermanowski-Vosatka et al. 2000; Berger et al. 2001). Además, la activación del PPAR α y del PPAR γ puede tener un papel inhibitorio en la diferenciación de células T vírgenes en sus efectoras, al inhibir, por una parte, la producción de la citoquina IL-12 en las células dendríticas mediante la inhibición de la expresión de NF κ B e influenciar, así, la maduración de éstas, y al inhibir, por otra parte, la producción de IFN- γ , la citoquina clásica de las células T coadyuvantes 1 (T_H1) (Clark et al. 2000; Gosset et al. 2001)

Sin embargo, el PPAR γ , al incrementar la expresión del receptor CD36, promueve, a través de este receptor, la fagocitosis de parásitos de malaria por macrófagos y puede también estar implicado en la captación de células apoptóticas por fagocitos, reduciendo, de esta forma, la posibilidad de progresión de la necrosis y la activación de una respuesta inflamatoria (Serghides and Kain 2001).

1.1.6.4 Los PPARs y el cáncer

El papel de los PPARs en la regulación de los procesos tumorigénicos no se encuentra, actualmente, clarificado, mediando tanto efectos anticarcinogénicos como efecto procarcinogénicos, dependiendo del tipo de células estudiadas. El PPAR β tiene un efecto procarcinogénico en cáncer colorrectal, dado que su expresión se encuentra elevada en estas células debido a una mutación en el gen supresor de tumores APC. Sin embargo, el fármaco sulindac, un AINES que suprime la tumorigénesis colorrectal, puede antagonizar al PPAR β . De esta forma, el PPAR β puede ser un intermediario crítico en la ruta tumorigénica del gen APC y la diana molecular de los AINES en cáncer colorrectal. Por otra parte, el PPAR β tiene también efectos anticarcinogénicos, al inhibir la proliferación y la apoptosis y al promover la supervivencia celular en queratinocitos de ratón. Una situación idéntica se observa con el PPAR γ .

Los efectos antitumorigénicos del PPAR γ se deben a sus mecanismos proapoptóticos, antiproliferativos y antiangiogénicos, descritos en varias líneas celulares (Michalik et al. 2004). Los agonistas de PPAR γ inducen la apoptosis al incrementar la expresión de proteínas proapoptóticas BAX y BAD, y al inhibir la expresión de NF κ B y de proteínas

antiapoptóticas, como Bcl2 (Chen et al. 2002). Por otra parte, los agonistas de PPAR γ tienen un efecto antiproliferativo, al inducir el bloqueo del ciclo celular, mediante la represión de los inhibidores de la kinasa dependiente de ciclinas (CDK), como p21, p27 o p18, y por disminución de la expresión de la ciclina D1, impidiendo la formación de los complejos ciclina/CDK (Morrison and Farmer 1999; Toyota et al. 2002). Además, la activación de PPAR γ inhibe la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, al bloquear la liberación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células del músculo liso y al inhibir la migración, inducida por leptina, de células endoteliales, esenciales en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Goetze et al. 2002).

1.1.6.5 Los PPARs en el cerebro

La función más estudiada de los PPARs en el cerebro es la neuroprotección inducida por el PPAR γ , cuya activación media la disminución de la inflamación en varios procesos con componente inflamatorio, como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple o el infarto cerebral agudo (Heneka and Landreth 2007). El PPAR α tiene también un efecto neuroprotector, dado que su activación reduce las consecuencias neurológicas del infarto (Deplanque et al. 2003) y previene, tal como el PPAR γ , la muerte neuronal y la pérdida de la red neuronal inducida por el péptido β -amiloide (Inestrosa et al. 2005; Santos et al. 2005). El papel de los PPARs en el desarrollo del SNC empieza a estudiado. El PPAR α puede mediar la migración y orientación neuronal al ser factor de transcripción de la semaforina 6B (Collet et al. 2004). Las semaforinas tienen un efecto repulsivo para los axones durante su migración (Mueller 1999). La función de los PPARs en la diferenciación neuronal no está clara. Se ha descrito que los agonistas del PPAR γ estimulan la diferenciación de células embrionarias del cerebro medio en células dopaminérgicas (Park et al. 2004) y, por otra parte, que inhiben la diferenciación de células madre neurales en neuronas (Wada et al. 2006).

2. Plan de trabajo

Con objeto de conocer los receptores implicados en el efecto neurotrófico del ácido oleico durante el desarrollo del SNC, el plan de trabajo quedó establecido como sigue:

- Estudiar la participación del receptor multiligando megalina en la internalización de la albúmina en astrocitos.
- Estudiar la vía de endocitosis empleada en la internalización de la albúmina en astrocitos.
- Estudiar la participación de los receptores nucleares PPAR en el efecto neurotrófico inducido por el ácido oleico en neuronas.

3. Material y Métodos

3.1 MATERIAL

3.1.1 Especie ensayada y condiciones del animalario

Se han empleado ratas albinas Wistar de distintas edades, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Los animales se criaron en jaulas. Se mantuvo un ritmo de luz-oscuridad de 12 horas. La humedad osciló entre el 45 y el 65% y la temperatura se controló entre los 20 y 25°C. Se alimentaron con una dieta sólida estándar (17% de proteínas, 3% de lípidos, 58,7% de glúcidos, 4,3% de celulosa, 5% de minerales y 12% de humedad). Además, los animales tuvieron en todo momento acceso libre al agua de bebida.

Se emplearon fetos de 17,5 días de gestación para la preparación del cultivo primario de neuronas, neonatos de 1 día de vida postnatal para la preparación del cultivo primario de astrocitos y animales de distintas edades para la realización de los experimentos *in vivo*.

3.1.2 Medios instrumentales

El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo milli-RO plus 10 y una unidad de agua ultrapura milli-Q plus 185 (Millipore Ibérica, Madrid, España).

Las pesadas se realizaron en una balanza modelo 1207 MP2 y en un granatario modelo 1216 MP (Sartorius GmbH, Göttingen, Alemania).

El pH se determinó con un medidor de protones, marca Crison (Selecta, Barcelona, España).

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, U.S.A.) modelo J2-21M, una centrífuga Beckman de mesa modelo TJ-6, una centrífuga Eppendorf, modelo Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y una centrífuga Eppendorf, modelo Centrifuge 5702.

La cabina de flujo laminar utilizada es un modelo TC 48 (Gelaire Flow Laboratories, McLean, U.S.A.).

Los medios de cultivo y los tampones utilizados se esterilizaron a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore Ibérica). Para pequeños volúmenes de soluciones estériles se utilizaron filtros de jeringa de 0,2 µm de diámetro de poro (AcrodiscPall Gelman Laboratory, Michigan, U.S.A.).

Para la tripsinización de las células se ha utilizado un baño termostatzado a 37°C, modelo Precistern (Selecta). Para otras aplicaciones a diversas temperaturas, se ha utilizado un baño modelo Haake Fisons GH con termostato acoplado, modelo Haake Fisons D8 (Haake, Berlín, Alemania) y un bloque térmico para el calentamiento de tubos en seco (Selecta).

El material de vidrio se esterilizó mediante calor seco, durante un mínimo de 10 horas, en una estufa marca Selecta (modelo S-20), termostatzada a 170°C.

El agua, el material de disección y el resto de los utensilios que requerían asepsia se esterizaron por medio de calor húmedo en un autoclave modelo 437 (Selecta).

Las células se sembraron en placas estériles procedentes de las casas comerciales Nunc (Nunclon, Roskilde, Dinamarca), Falcon (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.) y TPP (Trasadingen, Suiza).

Las células se mantuvieron en cultivo en el incubador de CO₂ modelo Galaxy (RS Biotech, Northants, Reino Unido).

Se utilizaron botellas de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono suministradas por la Sociedad Castellana de Oxígeno (Valladolid, España).

Las células se observaron periódicamente con un microscopio de contraste de fases, modelo Willovert II pH (Leica, Wetzlar, Alemania) y se contaron con la ayuda de una cámara cuentaglobulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

El espectrofotómetro que se ha utilizado es de la marca Shimadzu, Modelo UV 120-02 (Shimadzu Co, Kyoto, Japón). Las cubetas utilizadas son de plástico, de 1 mL de capacidad y 1 cm de paso de luz (Elkay, Boston, U.S.A.) o de cuarzo, de 1 mL de capacidad y 1 cm de paso de luz (Hellma, Mulheim, Alemania).

Para los análisis de transferencia tipo "Western" se utilizó un sistema de electroforesis vertical y un sistema de electrotransferencia modelo "Mini Trans-Blot Transfer Cell" conectado a una fuente de alimentación modelo "PowerPac 300" de Bio-Rad (Hercules, U.S.A.)

Las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con anticuepos primarios o secundarios se realizaron en un *Navigator* (Fredericton, Canada).

Para el revelado de las películas de autorradiografía se utilizó la máquina de revelado *Kodak Medical X-Ray processor 102* (Rochester, New York, U.S.A.)

El programa de análisis de imagen utilizado fue NIH (NIH image, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.).

Para llevar a cabo la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT y PCR, respectivamente) se utilizó un termociclador modelo GeneCycler (Bio-Rad).

Para la selección de los oligonucleótidos empleados en la PCR y RT-PCR se utilizó el programa informático Oligo™ 4.0.

Los viales de plástico de 0,2 mL para PCR se adquirieron en Biotools (Biotools-B&M Labs S.A., Madrid, España).

El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo Gel Doc 2000 (Bio-Rad), propiedad del Instituto de Microbiología Bioquímica (IMB/Universidad de Salamanca, España).

Las imágenes se captaron con una cámara de vídeo digital Leica DC 100.

Para los análisis de microscopía confocal se utilizó el microscopio confocal modelo LSM510 (Zeiss), propiedad del Centro de Investigación del Cáncer (CIC/Universidad de Salamanca, España). Las imágenes se analizaron empleando el programa informático de análisis de imagen LSM 5 Image Browser v 2.8 (Zeiss).

Para los análisis de microscopía electrónica se utilizó el microscopio electrónico de transmisión modelo EM 900 (Zeiss), propiedad del Servicio General de Microscopía Electrónica de la Universidad de Salamanca.

3.1.3 Productos

Los productos utilizados en la preparación de disoluciones y tampones que no se detallan a continuación, fueron adquiridos en las casas comerciales Sigma (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) o Merck (Darmstadt, Alemania).

3.1.3.1 Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares

El medio de cultivo de astrocitos procedía de la casa Sigma y es del tipo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco).

El medio de cultivo de neuronas procedía de la casa Sigma y es del tipo DMEM-F12 (Medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con mezcla de nutrientes *F-12 Ham*).

El suero fetal bovino (FBS) procedía de la casa Gibco (Invitrogen, Barcelona, España).

La DNasa I, la tripsina y la albúmina (fracción V) que se utilizaron en la realización de los cultivos celulares, fueron suministradas por Roche Diagnostics S.L. (Barcelona, España).

La poli-L-lisina con la que se recubrió el fondo de las placas de cultivo fue adquirida en Sigma.

La citosina- β -arabinofuranósido empleada en los cultivos de astrocitos procedía de Sigma.

3.1.3.2 Productos utilizados en los experimentos para el análisis del mRNA

El reactivo para la extracción del RNA (Trizol Reagent), así como los hexanucleótidos empleados como cebadores (*random hexamer primers*), los desoxirribonucleótidos (dNTPs), el ditioneitol (DTT) y la enzima transcriptasa inversa (SuperScriptII Reverse Transcriptase), utilizados en la RT, procedían de Invitrogen.

El inhibidor de RNasas fue suministrado por Ambion (Cambridgeshire, Reino Unido).

El dietilpircarbonato (DEPC) utilizado para inactivar las RNAsas fue adquirido a Sigma.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la PCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, Reino Unido).

La polimerasa de DNA Taq, utilizada en la PCR, fue adquirida en Biotools.

Los reactivos y productos utilizados en la preparación de soluciones y tampones para biología molecular estaban libres de DNAsas y RNAsas y procedían de la casa Sigma.

La agarosa utilizada en las electroforesis procedió de la casa Pronadisa (Madrid, España).

3.1.3.3 Productos utilizados en los experimentos para el análisis de proteínas

Los inhibidores de proteasas: antipaína, pepstatina, amastatina, aprotinina, leupeptina, bestatina, inhibidor de tripsina y PMSF procedieron de la casa Sigma.

El reactivo Bradford para la determinación de proteínas, la solución de 30% acrilamida/Bis (29:1) para la preparación de geles para la electroforesis de proteínas y los marcadores de peso molecular de proteínas procedían de Bio-Rad.

El N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato amónico (AMPS) utilizados en la preparación de los geles procedieron de la casa Sigma.

Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm de tamaño de poro (Bio-Rad).

El metanol utilizado en la preparación del tampón de transferencia tipo Western procedió de la casa comercial Panreac Química S.A. (Barcelona, España).

El anticuerpo monoclonal de ratón contra GAP-43, el anticuerpo monoclonal de ratón contra MAP-2, el anticuerpo monoclonal de ratón contra GFAP y el anticuerpo monoclonal de ratón contra la albúmina sérica bovina (BSA) se adquirieron en Sigma.

El anticuerpo monoclonal de ratón contra la tubulina fue adquirido a Chemicon International (Temecula, CA, U.S.A.).

El anticuerpo monoclonal de ratón contra PPAR α y el anticuerpo monoclonal de ratón contra TGN38 procedió de ABR (Madrid, España).

El anticuerpo policlonal de conejo contra RXR β fue adquirido a Everest Biotech (Oxfordshire, Reino Unido).

El anticuerpo monoclonal de ratón contra megalina fue obtenida del *Southwestern Medical Center* (Texas, U.S.A.) y el anticuerpo policlonal de oveja contra megalina fue donado por el Dr. P.J. Verroust (*Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale*, Paris, Francia).

El anticuerpo monoclonal de ratón contra la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH), el anticuerpo monoclonal de ratón contra la transferrina, el anticuerpo policlonal de conejo contra la GRP78 BiP, el anticuerpo policlonal de conejo contra la caveolina-1 y el anticuerpo policlonal de conejo contra la caveolina-2 han sido adquiridos en Abcam (Cambridge, Reino Unido).

El anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena pesada de la clatrina procedió de BD Transduction Laboratories (Becton Dickinson).

La proteína A inmovilizada en Sefarosa CL-4B (*Protein A Sepharose CL-4B*) fue suministrada por Amersham Biosciences (GE Healthcare, Barcelona, España).

Los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón, conejo u oveja, conjugados con peroxidasa y el sustrato quimioluminiscente luminol provinieron de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, U.S.A.).

Las películas de autorradiografía para la determinación de la quimioluminiscencia fueron películas médicas de Rayos-X de la marca Fujifilm (Madrid, España).

El paraformaldehído y el metanol utilizado para fijar las células procedían de la casa Merck.

El medio de montaje para observaciones al microscopio *SlowFade Gold antifade reagent* y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), marcador fluorescente del DNA, fueron suministrados por Molecular Probes (Invitrogen).

El anticuerpo secundario conjugado con cianina 3 (Cy3) contra inmunoglobulina de conejo fue suministrado por la casa Sigma.

Los anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor488 o AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de ratón y el anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de oveja fueron suministrados por Molecular Probes (Invitrogen).

3.1.3.4 Productos utilizados en los tratamientos celulares

La albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos y la albúmina sérica bovina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) procedieron de la casa Sigma.

La albúmina sérica bovina conjugada con oro coloidal 10 nm (oro-BSA) fue adquirida a Aurion (Wageningen, Holanda).

El ácido oleico, los agonistas de los PPAR, Wy14643, GW7647, L165041 y 15-Deoxy- Δ -^{12,14}-Prostaglandina J2 (15d-PGJ2), así como el péptido miristilado inhibidor de la proteína quinasa C (myr- ψ PKC(20-28)), basado en el dominio pseudosustrato de la PKC, fueron suministrados por Sigma.

La oleoiletanolamida (OEA) se adquirió a Biomol (Exeter, Reino Unido).

El dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirió a Fluka Chemie (Sigma-Aldrich Switzerland, Buchs, Suiza).

La transferrina humana y la clorpromazina son de la casa Sigma.

3.1.3.5 Productos empleados para el silenciamiento génico

Los RNAs de interferencia de cadena corta (*small interfering RNA*, siRNA) y el kit de marcaje de siRNA con Cy3 fueron adquiridos en Ambion (Cambridgeshire, Reino Unido o Austin, Texas, U.S.A.).

El reactivo Lipofectamina 2000 y el medio Opti-MEM, utilizados para las transfecciones de siRNA, fueron suministrados por Invitrogen.

3.1.3.6 Otros productos

La membrana utilizada para dializar la albúmina fue adquirida en Sigma. Igualmente, el sulfuro sódico y el ácido sulfúrico 96% (v/v), empleados para el tratamiento previo de dicha membrana, procedieron de Sigma y de Panreac, respectivamente.

Los filtros (0,22 μ m) utilizados para la esterilización de la albúmina dializada son de la marca Serum Acrodisc (Pall Gelman Laboratory).

La resina utilizada para la preparación de las muestras para los análisis de microscopía electrónica, EMBED 812, fue adquirida a Electron Microscopy Sciences,

Otros productos y materiales no incluidos en las listas anteriores fueron de calidad estándar de laboratorio.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparación de los cultivos celulares

3.2.1.1 Preparación del cultivo primario de astrocitos

Los cultivos de astrocitos se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero y col. (Tabernero et al. 1993). Se emplearon neonatos de rata de 1 día de vida postnatal. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente, con excepción de la tripsinización, que se llevó a cabo a 37°C.

Los animales se limpiaron con etanol al 70%, se decapitaron y se extrajeron los cerebros, de los que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Los cerebros se colocaron en una placa petri que contenía solución "A" (EBSS pH 7,2 suplementado con DNAsa tipo I 20 µg/mL y albúmina (fracción V) 3 µg/mL). La solución EBSS, o de Earle, está compuesta por: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,0 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, rojo fenol, 10 mg/l, D-Glucosa, 14 mM; pH 7,2. El tejido se disgregó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g. El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos, a 37°C, en solución "B" (EBSS pH 7,2 suplementado con tripsina 0,25 µg/mL, DNAsa tipo I 60 µg/mL y albúmina (Fracción V) 3 µg/mL). Posteriormente, se detuvo la tripsinización, añadiendo al tejido disgregado medio de cultivo. Finalizada la tripsinización se centrifugó el tejido durante 5 minutos a 500 x g, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el tejido en la solución A y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada. Se recogió el sobrenadante y se repitió dos veces más el tratamiento anterior. Se reunieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos, con aceleración y deceleración suaves. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo. Una pequeña alícuota de esta suspensión celular se mezcló con azul de tripano al 0,2% (v/v) para la determinación de la viabilidad celular y del número de células.

A continuación, se sembraron las células en medio de cultivo (DMEM suplementado con FBS al 10% (v/v), penicilina G 50 U/mL, estreptomina 37,5 U/mL, pH 7,2), en placas petri recubiertas con poli-L-lisina (1µg/cm²), a una densidad de 1,0 x 10⁵ células/cm² y se colocaron en un incubador a 37°C, con un 5% CO₂. Al tercer día se añadió citosina β-arabinofuranósido 10 µM, que se mantuvo durante 48 horas con el fin de evitar la

proliferación de la microglía y de las células del linaje O-2A (Tabernero et al. 1996a). Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana con medio de cultivo. En estas condiciones se obtienen cultivos de astrocitos de tipo-1 de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico anti-GFAP (Tabernero et al. 1996a) (véase también la figura 1, sección 4.1.1). En todos los experimentos, se utilizaron astrocitos cultivados entre 14 y 28 días *in vitro* (14-28 DIV).

3.2.1.2 Preparación del cultivo primario de neuronas

Los cultivos de neuronas se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero y col. (Tabernero et al. 1993). Se emplearon fetos de rata de 17,5 días de edad gestacional. Los animales se obtuvieron por rápida histerectomía, después de la dislocación cervical de la madre. Se limpiaron rápidamente y se les cortó el cordón umbilical. Obtenidos los animales, el resto del proceso se realizó en condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente, con excepción de la tripsinización, que se llevó a cabo a 37°C.

Tras limpiar los animales con etanol al 70%, se decapitaron y se les extrajo el cerebro, del que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Los cerebros se colocaron en una placa petri que contenía solución A. Este tejido se disgregó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g. El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos, a 37°C, en la solución B que contenía tripsina. Posteriormente, se detuvo la tripsinización, añadiendo al tejido disgregado en la solución B medio de cultivo. Finalizada la tripsinización, el tejido se centrifugó durante 5 minutos, a 500 x g. Tras retirar el sobrenadante, el tejido se resuspendió en la solución A y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada. Se recogió el sobrenadante y el tejido se sometió una vez más al tratamiento anterior. Se reunieron los dos sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos, con aceleración y desaceleración suaves. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo de neuronas, designado medio definido. Una pequeña alícuota de esta suspensión celular se mezcló con azul de tripano al 0,2% (p/v) para la determinación de la viabilidad celular y del número de células.

A continuación, las células se sembraron en placas petri recubiertas con poli-L-lisina (1 µg/cm²), en medio definido (DMEM-F12 suplementado con piruvato sódico 1 mM apo-transferrina 100 µg/mL, L-glutamato 2,5 mM, insulina 5 µg/mL, penicilina G 50 U/mL,

estreptomina 37,5 U/mL, pH 7,2), a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/cm² y se mantuvieron en un incubador a 37°C, con un 5% de CO₂. En estas condiciones se obtienen cultivos de neuronas de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico contra el neurofilamento (Vicario et al. 1993).

3.2.2 Preparación de la albúmina libre de ácidos grasos

La albúmina empleada en los experimentos descritos a lo largo de esta Memoria fue albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, previamente dializada en solución de Elliot (Elliot 1969) (NaCl 122 mM, KCl 4,8 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, preparado en tampón fosfato sódico 10,8 mM pH 7,6).

Para el tratamiento de la membrana de diálisis se siguieron las instrucciones del fabricante y se terminó con un aclarado de la membrana con agua ultrapura durante 15 minutos. Se preparó una disolución de albúmina al 10% (p/v) en solución de Elliot. Se ajustó el pH a 7,37 y se dializó durante 24 horas, con tres cambios de la solución de Elliot. Después de la diálisis, se filtró la albúmina y se almacenó en alícuotas a -20°C.

3.2.3 Tratamientos celulares

3.2.3.1 Tratamientos celulares en astrocitos

En los experimentos de unión de albúmina al receptor de membrana, los astrocitos de 14-28 DIV se cultivaron en DMEM sin FBS durante 12 horas antes del tratamiento. Después, las células se lavaron con PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 7,8 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) y se incubaron en solución de Elliot suplementada con glucosa 5 mM y con albúmina al 1-2% (p/v), con FITC-BSA al 0,5-1% o con oro-BSA (10^{12} partículas de oro coloidal por mL de BSA al 0,5% (p/v)), según se indica, durante 20 minutos a 4°C (Taberner et al. 2002a). En los experimentos de internalización de albúmina, los astrocitos se incubaron de igual manera (20 minutos a 4°C) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos (Sharma et al. 2004; Self et al. 2005). Después de las incubaciones con albúmina, los astrocitos se lavaron abundantemente con PBS a 4°C. En los experimentos de endocitosis de transferrina, se siguió el mismo procedimiento utilizado en los experimentos de internalización de albúmina, empleando transferrina al 0,025%.

Cuando se analizó el efecto de la clorpromazina, este inhibidor se añadió 1 hora antes del tratamiento (10 µg/mL) y se mantuvo en cultivo durante el resto del experimento.

3.2.3.2 Tratamientos celulares en neuronas

Para determinar el efecto del ácido oleico en la diferenciación neuronal y en la activación del PPAR α , las neuronas en cultivo primario fueron cultivadas durante 72 horas (o según se indica) en medio definido suplementado con albúmina al 2% (p/v) en presencia o en ausencia de ácido oleico 100 µM (solución stock: 100 mM en albúmina al 10% (p/v)). En los experimentos con siRNA (para determinar el papel del PPAR α en el efecto del ácido oleico) el ácido oleico se añadió 8 horas después de la transfección.

Para determinar el efecto de los agonistas de los PPAR en la diferenciación neuronal, las neuronas en cultivo primario se cultivaron durante 72 h en medio definido o medio definido suplementado con albúmina al 2% (p/v), en presencia de concentraciones crecientes de los agonistas L165041 (1-5 µM; solución stock 100mM en DMSO), 15d-PGJ2 (0,5-1 µM; solución stock 0,5 mM en etanol) y Wy14643 (1-20 µM; solución stock 10 mM en DMSO). Los agonistas GW7674 (0,1-1 µM; solución stock en 1mM DMSO) y OEA (0,1-1 µM; solución stock 1 mM en DMSO) se incubaron en medio definido suplementado con albúmina al 2% (p/v). Como controles, las células se incubaron con la cantidad equivalente del vehículo utilizado en cada condición. Los reactivos se añadieron al medio de cultivo inmediatamente después de la siembra.

Cuando se analizó el efecto del inhibidor de la PKC myr- ψ PKC(20-28), este inhibidor (50 µM) se añadió 30 minutos antes que el factor neurotrófico ácido oleico y se mantuvo en cultivo durante el resto del experimento.

3.2.4 RT-PCR

I. Extracción del RNA total de los cultivos

Para la extracción del RNA de las células en cultivo, o de los cerebros, se utilizó Trizol, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de Trizol, se agitaron vigorosamente los tubos durante 15 segundos y se realizó una incubación de 3 minutos, finalizada la cual se centrifugaron las muestras a 12000 x g durante 15 minutos. Una vez recogida la fase acuosa se precipitó el RNA por adición de 0,5 volúmenes de alcohol isopropílico. Las muestras se incubaron

durante 10 minutos y se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con un volumen de etanol al 75%. A continuación, las muestras se agitaron y se centrifugaron a 7500 x g durante 5 minutos, a 4°C. El precipitado de RNA se dejó secar parcialmente a temperatura ambiente y se redisolvió en agua DEPC estéril, incubándolo después durante 10 minutos a 55°C. Por último, se añadieron 0,05 µL del inhibidor de RNasas por cada µL de volumen resuspendido.

II. Cuantificación del RNA

La calidad del RNA se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), comprobándose la presencia de las bandas de RNA ribosómico (18 S y 28 S). Además, el RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación de absorbancias 260/280 nm.

III. Transcripción inversa (RT)

Para realizar la transcripción del RNA total a DNA complementario (cDNA) se utilizó la enzima transcriptasa SuperScriptII, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total se mezcló con 200ng de cebadores hexaméricos aleatorios (*random hexamer primers*) en un volumen total de 11 µL de H₂O-DEPC. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a 70°C y seguidamente en baño de hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 9 µL de una mezcla compuesta por 5 µL del tampón de la transcriptasa, 1 µL de la transcriptasa SuperScriptII, 1 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1µL de inhibidor de RNasas y 1µL de ditioneitol (DTT). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador y consistió en un paso inicial de anillamiento (10 minutos a 20°C), seguido de elongación (45 minutos a 42°C) y desnaturalización (5 minutos a 99°C). Al final de la reacción, la temperatura se mantuvo a 7°C. Finalizada la reacción, el volumen se completó hasta 50 µL con H₂O-DEPC.

IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del cDNA del gen de interés por PCR, se utilizó la polimerasa de DNA *Taq*. La mezcla de reacción consistió en 2 µL de cDNA molde, 0,4 mM de una pareja de cebadores específicos, 0,2 mM de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs), 1 U de la polimerasa de DNA *Taq*, 5 µL del tampón de la polimerasa y 2 mM de MgCl₂, en un

volumen final de 50 μ L. El programa de PCR consistió en 5 minutos de desnaturalización, seguidos de ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), anillamiento (30 segundos) y extensión (90 segundos a 72°C) y por una extensión final de 10 minutos a 72°C. El número de ciclos, la temperatura de anillamiento y la secuencia de los cebadores utilizados para cada gen de interés se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de las PCR y secuencia de nucleótidos de los cebadores

Gen diana (ref.)	Cebadores	Tamaño amplicon	Ciclos	Temp. anill.
PPARα (NM_013196)	5'-ccttttgggctgctat 5'-tcctgctctcctgatg	356 pb	35	55°C
PPARβ (NM_013141)	5'-cagccataacgcaccctcatcatcc 5'-ggccaccagcagtcctgttgg	304 pb	35	55°C
PPARγ (NM_013124)	5'-attctggccaccaactcgg 5'-tgaagcctgatgctttatcccca	339 pb	35	60°C
LPL (NM_012598)	5'-gtatcggggccagcaacattatcc 5'-gcctgctggggtttctcattc	520 pb	38	66°C
Megalina (NM_030827)	5'-ggtgtgtgacgaggataagg 5'-agttgcaattgcgctcatcg	401 pb	35	55°C
β-actina (NM_031144)	5'-gagcaccctgtgctgctcaccgagg 5'-gtggtggtgaagctgtagccacgct	300 pb	25	60°C

V. Electroforesis de DNA

Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (0,04 M Tris acetato y 1 mM EDTA, pH 8,3), en presencia de bromuro de etidio al 0,005% (v/v). Se tomaron fotografías de los productos de PCR con un transiluminador de luz ultravioleta, que tiene acoplada una cámara y una video-impresora.

3.2.5 Transfección del siRNA

Para inhibir la expresión de las proteínas de interés, las células se transfectaron con siRNAs. En las neuronas se silenció la expresión del PPAR α y en los astrocitos se silenció la expresión de la megalina, de la caveolina-1, de la caveolina-2 y de la cadena pesada de la clatrina. Los siRNAs, de cadena doble, se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una concentración inicial de 30 μ M y se utilizaron a una concentración final de 75 nM en el caso de las neuronas, o 50 nM, en el caso de los astrocitos. Las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina 2000, siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizándose en todos los casos 2,5 μ L del reactivo de transfección por mL de volumen final.

Para monitorizar las neuronas transfectadas, los siRNAs contra PPAR α se marcaron con el fluorocromo Cy3, usando un kit de marcaje de siRNA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de las neuronas, las transfecciones con siRNA se realizaron inmediatamente después de la siembra y 8 horas después, las neuronas se incubaron en presencia o en ausencia de 100 μ M de ácido oleico durante 72 horas.

En el caso de los astrocitos, las transfecciones se realizaron utilizando astrocitos de 14-28 DIV, realizándose los tratamientos celulares 72 horas después de la transfección.

Como control de las transfecciones de siRNA, se utilizó una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana, designado NT-RNA (*non-target RNA*).

Para la optimización de las condiciones de transfección de siRNA en astrocitos y en neuronas en cultivo primario, las células se transfectaron con distintas concentraciones de un siRNA validado contra GAPDH (25, 50 y 75 nM) y con distintas cantidades del agente de transfección (1, 2 ó 3 μ L Lipofectamina 2000/mL medio de cultivo). Las secuencias de los siRNA (cadena sentido 5'→3') se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los siRNA

Gen diana	Cadena sentido (5'→3')	Cadena antisentido (3'→5')
PPARα	GCUGGCGUACGACAAGUGUtt	ACACUUGUCGUACGCCAGCtt
Megalina	GCUAUUGUAUUAGAUCUUtt	AAGGAUCUAAUACAAUAGCtc
Caveolina-1	GGGACACACAGUUUCGACGtt	CGUCGAAACUGUGUGUCCtt
Caveolina-2	GCAAAUACGUGAUCUACAAtt	UUGUAGAUCACGUAAUUUGCtg
Clatrina	GCAAAGUGAUUGCACUGAAAtt	UUCAGUGCAAUCACUUUGCtg
GAPDH	GGUCAUCCAUGACAACUUUtt	AAAGUUGUCAUGGAUGACtt

3.2.6 Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western

El análisis de la expresión de proteínas por transferencia tipo Western se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (SDS-PAGE).

I a. Extracción de proteínas de neuronas

Las células se lavaron una vez con PBS (ver composición en el apartado 3.2.3.1) y se lisaron con una solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 5 mM (pH

6,8), SDS al 2%, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, antipaína 0,5 µg/mL, amastatina 0,5 µg/mL, leupeptina 0,5 µg/mL, bestatina 0,5 µg/mL, inhibidor de tripsina 0,5 µg/mL y aprotinina 3 U/mL. Los lisados se centrifugaron a 11000 x g durante 10 minutos a 4°C y se almacenaron a -80°C.

I b. Extracción de proteínas de astrocitos

Las células se lavaron con PBS a 4°C y se lisaron con una solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, azida sódica al 0,02%, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, antipaína 0,5 µg/mL, amastatina 0,5 µg/mL, leupeptina 0,5 µg/mL, bestatina 0,5 µg/mL, inhibidor de tripsina 0,5 µg/mL y aprotinina 3 U/ml. Los lisados se centrifugaron a 11000 x g durante 10 minutos a 4°C y se almacenaron a -80°C.

II. Cuantificación de proteínas

Se siguió el método de Bradford (Bradford 1976). Una pequeña alícuota de la muestra de proteínas se diluyó 1000 veces en agua ultrapura. De esa dilución se tomó un volumen de 800 µL y se añadieron 200 µL de reactivo de Bradford (BioRad). Se agitó la mezcla en el vórtex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas se determinó extrapolando en una recta patrón, realizada simultáneamente con disoluciones entre 1 y 25 µg/mL de albúmina sérica bovina.

III. Preparación de los geles

Los geles utilizados para la electroforesis fueron de poliacrilamida, de un grosor de 0,75 mm, compuestos por un gel de separación (10% de poliacrilamida para todas las proteínas analizadas, excepto para la megalina que fue del 5%) y por un gel de concentración (4% de poliacrilamida).

El gel de separación estaba compuesto por Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), acrilamida/Bis al 10% (p/v) (ó 5%), SDS al 0,1% (p/v), persulfato de amonio (AMPS) al 0,05% (p/v) y N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED) al 0,05% (p/v). El gel de concentración estaba compuesto por Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), acrilamida/Bis al 4% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), AMPS al 0,05% (p/v) y TEMED al 0,05% (p/v).

IV. Preparación de las muestras para la electroforesis

En todas las electroforesis SDS-PAGE se utilizaron 30 µg de proteínas, resuspendidas en igual volumen de tampón de carga (Tris-HCl 40 mM (pH 6,8), SDS al 2% (p/v), glicerol al 20% (p/v), azul de bromofenol 0,01% y DTT 3 mM). Se hirvió la mezcla durante 5 minutos, y tras realizar una rápida centrifugación, se mantuvieron en hielo.

V. Electroforesis de proteínas

El tampón utilizado para la electroforesis fue Tris 25 mM y glicina 0,19 M (pH 8,3), con SDS al 0,1% (p/v). Las muestras se aplicaron en los distintos pocillos del gel, incluyendo un marcador de masas moleculares (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa).

Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, a voltaje constante (entre 60 y 110V, dependiendo de las proteínas a separar) y durante el tiempo considerado conveniente para separar las proteínas de interés.

VI. Electrotransferencia

Las proteínas separadas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro. El tampón de transferencia tenía la siguiente composición: Tris 25 mM y glicina 0,19 M (pH 8,6), con SDS al 0,1% y metanol al 10%. Para la electrotransferencia se aplicó un voltaje de 90V durante 90 minutos a 4°C, de manera que las proteínas van pasando a la membrana atraídas por la carga eléctrica positiva, quedando inmovilizadas en la misma posición que ocupaban en el gel.

VII. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana

La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante tinción con Rojo Ponceau al 10% (v/v). A continuación, la membrana se bloqueó durante 1 hora, a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS (Tris-base 20mM, NaCl 500mM, pH 7,5).

VIII. Inmunodetección

Para detectar las proteínas en la membrana, se incubó con el anticuerpo primario contra la proteína de interés 1-2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón contra GAP-43 (3 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra MAP-2 (1 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra BSA

(3 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH (1 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra tubulina (1:500), anticuerpo monoclonal de ratón contra megalina (1 µg/mL), anticuerpo policlonal de oveja contra megalina (1:500), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 (1 µg/mL), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-2 (1 µg/mL) y anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena pesada de la clatrina (1 µg/mL).

Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución compuesta por FBS al 10% (v/v), azida sódica 0,02% (p/v) y lisina 0,1 M (denominada solución de anticuerpos), exceptuando el anticuerpo monoclonal de ratón contra BSA, preparado en leche al 5 % en TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5).

A continuación, se incubó con anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón, conejo u oveja, conjugado con peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una concentración de 80 ng/mL, preparados en TBS. En este punto se forma un complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario.

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente, luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada por exposición a una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, en condiciones de exposición subsaturante. Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía mediante un programa de análisis de imagen.

3.2.7 Inmunoprecipitación

Las proteínas de astrocitos fueron extraídas como se describe en 3.2.5 I b. Los lisados fueron centrifugados a 11000 x g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes (800 µg de proteína) incubados a 4°C durante 3 horas, con agitación (rotación) suave, en presencia del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón contra BSA (1 µg/800 µg proteína), anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH (1 µg/800 µg proteína), anticuerpo policlonal de oveja contra megalina (4 µL/800 µg proteína), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 (0,5 µg/800 µg proteína), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-2 (0,5 µg/800 µg

proteína) y anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena pesada de la clatrina (0,5 µg/800 µg proteína). Los inmunocomplejos (complejo proteína-anticuerpo) fueron secuestrados con 50 µL de la matriz Proteína-A Sefarosa, durante 30 minutos a 4°C, con rotación suave. La matriz fue previamente saturada con caseína al 2% durante 2 horas a 4°C y con agitación suave. El complejo matriz-anticuerpo-proteína fue aislado por centrifugación (11000 x g durante 1 minuto a 4°C), lavado 5 veces con tampón de extracción y las proteínas eluidas con 30 µL de tampón de carga durante 5 minutos a 95°C. Finalmente, los sobrenadantes se aplicaron en un gel de SDS-poliacrilamida y las proteínas fueron analizadas mediante transferencia tipo Western, descrita en 3.2.6.

3.2.8 Inmunocitoquímica

Las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (ver composición en el apartado 3.2.3.1), durante 30 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con metanol a -20°C, durante 20 minutos. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C, durante 16 horas. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón contra GAP-43 (6 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra MAP-2 (1 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra PPAR α (5 µg/mL), anticuerpo policlonal de conejo contra RXR β (2,5 µg/mL), anticuerpo policlonal de oveja contra megalina (1:1000), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 (2 µg/mL), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-2 (2 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena pesada de la clatrina (0,5 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra GRP78BiP (4 µg/mL), anticuerpo monoclonal de ratón contra TGN38 (1 µg/mL) y anticuerpo monoclonal de ratón contra transferrina (2 µg/mL). Los anticuerpos primarios se prepararon en PBS, excepto los anticuerpos primarios contra MAP-2, PPAR α y RXR β , que se prepararon en solución de anticuerpos, descrita en 3.2.6.

A continuación, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpo secundario conjugado con cianina 3 (Cy3) contra inmunoglobulina de conejo, anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor488 o AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de ratón y anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de oveja.

Finalmente, el DNA nuclear se tiñó con DAPI (2,5 µg/mL en PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se montaron utilizando un agente preservador de la

fluorescencia. Entre cada paso de la inmunocitoquímica las células se lavaron 3 veces con PBS a temperatura ambiente.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal o con un microscopio de fluorescencia invertido conectado a una video-cámara digital, obteniéndose imágenes confocales o de fluorescencia. La cuantificación de la expresión del PPAR α y de la megalina se realizó empleando un programa de análisis de imágenes de fluorescencia.

3.2.9 Microscopia electronica

Las células se fijaron durante 20 minutos con una solución de fijación (formaldehído al 2% y glutaraldehído al 2% en 0,1 M tampón fosfato). Tras varios lavados con tampón fosfato, las células se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% y con ferricianuro potásico al 1% en agua, durante 1 hora a 4°C. A continuación, las células fueron deshidratadas en alcohol de graduación ascendente (50% hasta 100%) e incluidas en resina. De los bloques de resina, polimerizada a 60°C durante 12 horas, se obtuvieron cortes ultrafinos, recojidos en rejillas de cobre y contrastados, primero, con acetato de uranilo al 2% en alcohol al 50% durante 20 minutos y, después, con citrato de plomo durante 10 minutos. Los cortes ultrafinos se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión.

3.2.10 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media de, como mínimo, tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student, cuando se comparaban dos variables, o mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido del test Tukey, cuando se comparaban más de dos variables. Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Estudio de la participación del receptor multiligando megalina en la internalización de la albúmina en astrocitos

4.1.1 La megalina se expresa en astrocitos en cultivo primario

La megalina es un receptor multiligando, implicado en la internalización de la albúmina por endocitosis mediada por receptor en varios tipos celulares como las células del túbulo proximal renal, del endotelio pulmonar, del endotelio del plexo coroideo o del epitelio mamario (Christensen et al. 1998; Schubert et al. 2001; Monks and Neville 2004; Carro et al. 2005) (para una revisión ver (Christensen and Birn 2002)). En astrocitos, se ha descrito que la albúmina se internaliza por endocitosis mediada por receptor (Tabernero et al. 2002a). Para elucidar el receptor por el que la albúmina es internalizada en astrocitos, se investigó la posible expresión de megalina en astrocitos. En primer lugar, se corroboró la pureza de los cultivos primarios de astrocitos. Para ello, se cuantificó el porcentaje de células inmunopositivas para la GFAP, consideradas astrocitos. Como se observa en la figura 1, se han obtenido cultivos de astrocitos de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico anti-GFAP

IF: GFAP

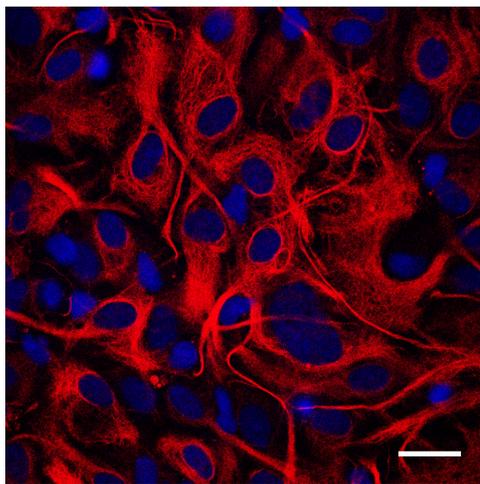


Figura 1. Determinación de la pureza del cultivo primario de astrocitos. Imágen de microscopía confocal de la inmunocitoquímica de GFAP (rojo), realizada con células de un cultivo primario de astrocitos, cultivadas 14 DIV. El DNA nuclear se tiñó con DAPI (azul). Barra de calibrado: 25 μ m.

A continuación se analizaron los niveles de expresión de la megalina, mediante *Western blot*, en astrocitos cultivados 14 días *in vitro* (14 DIV). Los resultados muestran que la

megalina se expresa en astrocitos en cultivo primario (Figura 2). El riñón, un tejido donde la expresión de la megalina es elevada, se utilizó como control positivo.

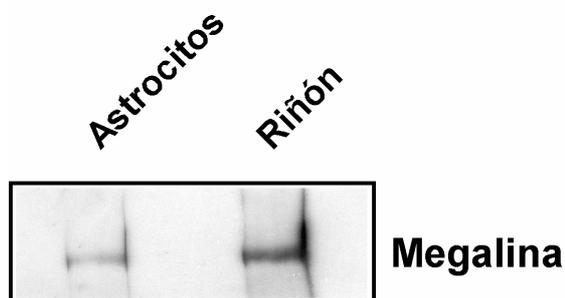


Figura 2. Expresión de la megalina en astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos de rata se cultivaron como se describe en "Materiales y Métodos". El análisis de Western blot reveló la expresión de la megalina en astrocitos de 14 DIV, usando la corteza renal como control positivo.

4.1.2 Evolución de la expresión de la megalina durante el desarrollo postnatal del cerebro

La presencia de la albúmina en el cerebro se encuentra restringida a la primera semana de vida postnatal (Mollgard et al. 1979; Trojan and Uriel 1979; Dziegielewska et al. 1980; Mollgard et al. 1988; Velasco et al. 2003). Para conocer si la megalina también se expresaba en esta etapa del desarrollo, se realizaron análisis de RT-PCR del RNA total, extraído de cerebros de distintos días de vida postnatal, usando cebadores específicos para la megalina. La expresión de la β -actina se analizó como control de carga. Los resultados muestran que la expresión de la megalina en el cerebro se encuentra elevada tras el nacimiento, decayendo gradualmente a partir del día 4 postnatal hasta el final de la primera semana de vida postnatal (Figura 3).

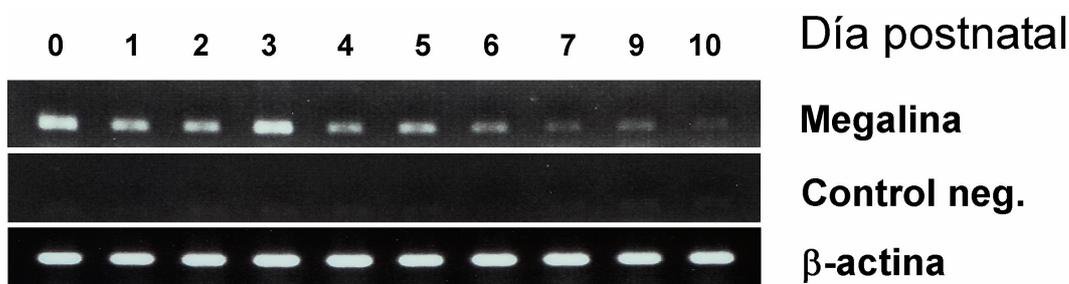


Figura 3. Evolución de la expresión del mRNA de la megalina durante el desarrollo cerebral postnatal. El RNA total se extrajo de cerebros de rata con 0-10 días de vida postnatal y el mRNA de la megalina se analizó por RT-PCR. Los niveles de mRNA de β -actina se utilizaron como control de carga. Se llevaron a cabo PCRs del RNA total como controles negativos.

4.1.3 La albúmina interacciona con la megalina en la membrana de los astrocitos

Con objeto de conocer si la albúmina interacciona con la megalina en astrocitos, se realizaron experimentos de colocalización entre la albúmina y la megalina. Para ello, los astrocitos se incubaron en presencia de FITC-BSA, permitiendo que la albúmina se uniera a su receptor y, seguidamente, se realizó una inmunocitoquímica contra la megalina. La distribución de los dos fluoróforos se analizó por microscopía confocal (Figura 4 A; albúmina en verde y megalina en rojo). Los resultados sugieren que la albúmina colocaliza con la megalina en la membrana de los astrocitos, dado que la imagen superimpuesta muestra color amarillo (Figura 4 A).

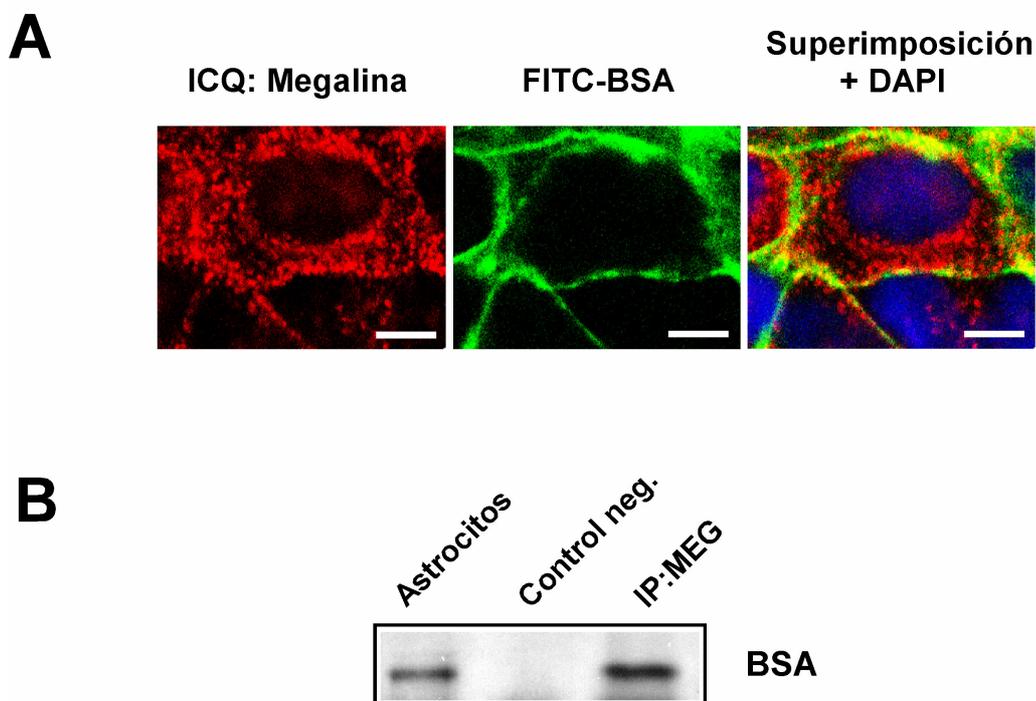


Figura 4. Interacción de la albúmina con la megalina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se incubaron durante 12 horas en DMEM sin suero. Las células fueron seguidamente incubadas a 4°C durante 20 minutos con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o con BSA al 2% (p/v), para los experimentos de inmunoprecipitación (B), como se describe en “Material y Métodos”. **A** Colocalización de FITC-BSA con megalina, analizada por inmunocitoquímica. Las imágenes confocales del mismo campo muestran la FITC-BSA (verde), megalina (rojo) y su colocalización (amarillo). El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en la imagen superimpuesta. Barra de calibrado: 10 µm. **B** Western blot de BSA. Las células se incubaron a 4°C durante 20 minutos con BSA al 2% (p/v), como se describe en “Material y Métodos”. Tras varios lavados, las proteínas se extrajeron e inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra megalina. El análisis de Western blot de BSA se realizó en estos inmunocomplejos. Control positivo: Western blot de BSA en el extracto proteico de astrocitos antes de la inmunoprecipitación. Control negativo: Western blot de BSA tras la inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal contra GAPDH.

Para confirmar la posible interacción de la albúmina con la megalina, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación. Después de incubar los astrocitos con albúmina, las proteínas extraídas de los astrocitos se inmunoprecipitaron con anticuerpo policlonal contra la megalina. Seguidamente, se analizó la presencia de la albúmina en los inmunocomplejos por *Western blot*. Los resultados muestran que el anticuerpo contra la megalina también precipitó la albúmina (Figura 4 B). No se observó señal en el control negativo, realizado inmunoprecipitando las proteínas con un anticuerpo contra GAPDH. Las proteínas extraídas de los astrocitos se usaron como control positivo para la albúmina.

4.1.4 La megalina funciona como receptor de albúmina en astrocitos

Para determinar si la megalina funciona como receptor para la albúmina en los astrocitos, la expresión de la megalina se silenció por siRNA. Para ello, en primer lugar, se optimizaron las condiciones de transfección de siRNA en astrocitos en cultivo primario.

4.1.4.1 Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en astrocitos en cultivo primario

Para determinar las condiciones de transfección de siRNA que permitieran obtener la mejor eficacia de silenciamiento proteico, los astrocitos se transfectaron con distintas concentraciones de un siRNA validado contra GAPDH (50 y 75 nM) y con distintas cantidades del agente de transfección (1, 2 o 3 μ L de Lipofectamina 2000 por mL de medio de cultivo). Los resultados muestran una fuerte reducción en la expresión de GAPDH cuando se transfectó con 50 nM de siRNA y 3 μ L de Lipofectamina 2000 por mL de medio de cultivo (Figura 5), siendo estas condiciones las utilizadas en todos los experimentos posteriores.

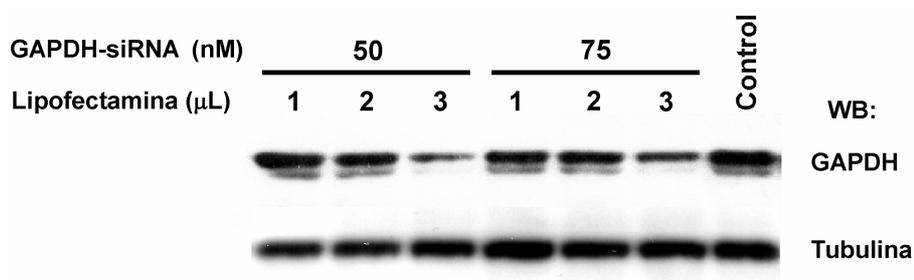


Figura 5. Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en astrocitos. Los astrocitos se transfectaron con las cantidades señaladas de siRNA y distintas cantidades de Lipofectamina 2000. El Western blot de GAPDH muestra una reducción en la expresión de esta proteína en las distintas condiciones. La expresión de la tubulina se utilizó como control de carga.

4.1.4.2 El silenciamiento de megalina disminuye la unión e internalización de albúmina en astrocitos

Para determinar si la megalina funciona como receptor para la albúmina en los astrocitos, la expresión de la megalina se silenció por siRNA. Se utilizó como control una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana (designada NT-siRNA). La inmunocitoquímica de megalina reveló una fuerte reducción en la expresión de la megalina en los astrocitos transfectados con siRNA específico para megalina (designado Meg-siRNA) (Figura 6 A). La cuantificación de estos resultados reveló una reducción de 65% de la expresión de la megalina (Figura 6 B).

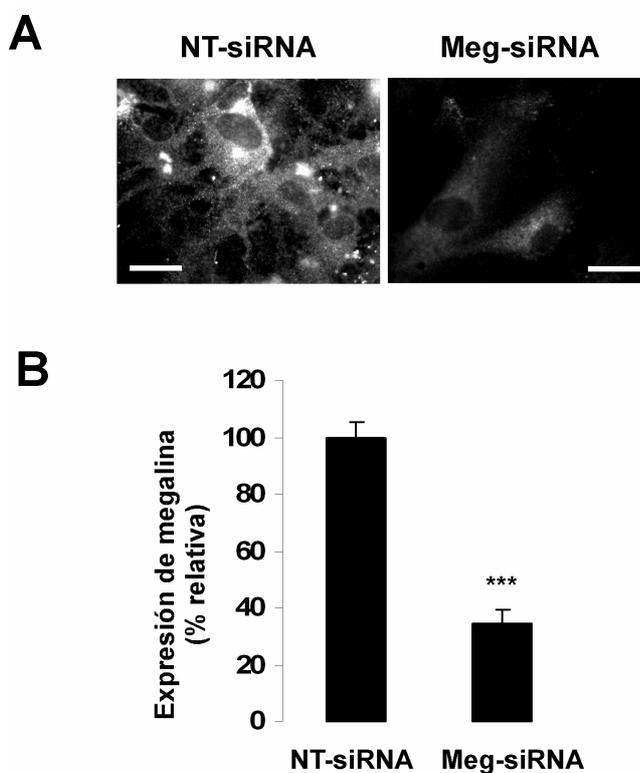


Figura 6. Silenciamiento de la megalina en astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Meg-siRNA. **A** Inmunocitoquímica de megalina. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran una reducción en la expresión de la megalina en las células transfectadas con Meg-siRNA, cuando se comparan con astrocitos transfectados con NT-siRNA. Barra de calibrado: 10 μ m. **B** Cuantificación de la expresión de la megalina analizada por inmunocitoquímica. Los resultados son medias \pm SEM de al menos 6 campos de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del control (NT-siRNA). *** $p < 0,001$ cuando se compara con el control (test t de Student).

Una vez silenciada la expresión de la megalina, se quiso determinar la unión e internalización de la albúmina en estas circunstancias. Para los experimentos de unión de

albúmina, tras la transfección con siRNA los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C, en presencia de FITC-BSA al 0,5% (p/v) o de BSA al 2% (p/v). La figura 7 A muestra la reducción en la unión de la FITC-BSA en los astrocitos transfectados con Meg-siRNA, cuando se comparan con los astrocitos transfectados con NT-siRNA.

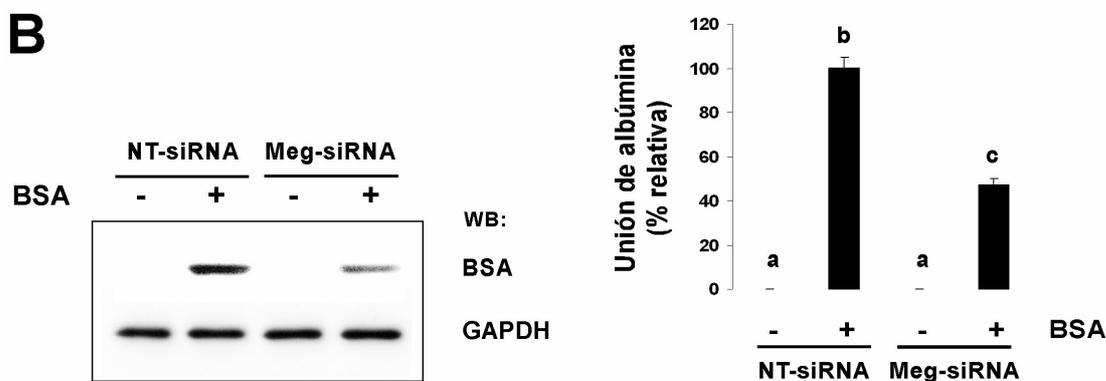
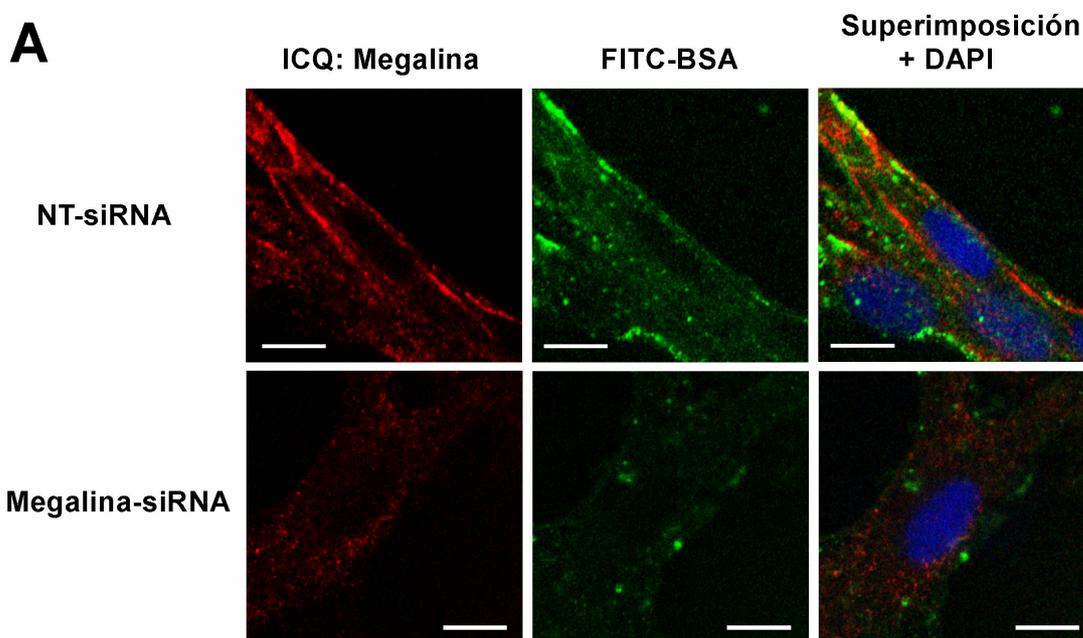


Figura 7. El silenciamiento de la megalina disminuye la unión de la albúmina a los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Meg-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v) para el análisis de Western blot (B). **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de megalina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran que la cantidad de FITC-BSA disminuye en los astrocitos transfectados con Meg-siRNA, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Además, las imágenes superpuestas muestran la colocalización de FITC-BSA con la megalina en astrocitos transfectados con NT-siRNA pero no en los transfectados con Meg-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superpuestas. Barra de calibrado: 10 μ m. **B** Western blot y cuantificación de BSA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

El análisis de Western blot muestra una reducción de más del 50% en la unión de albúmina en los astrocitos cuya megalina fue silenciada (Figura 7 B). Esta reducción es coherente con la eficacia del silenciamiento de la megalina (cerca del 65%; Figura 6).

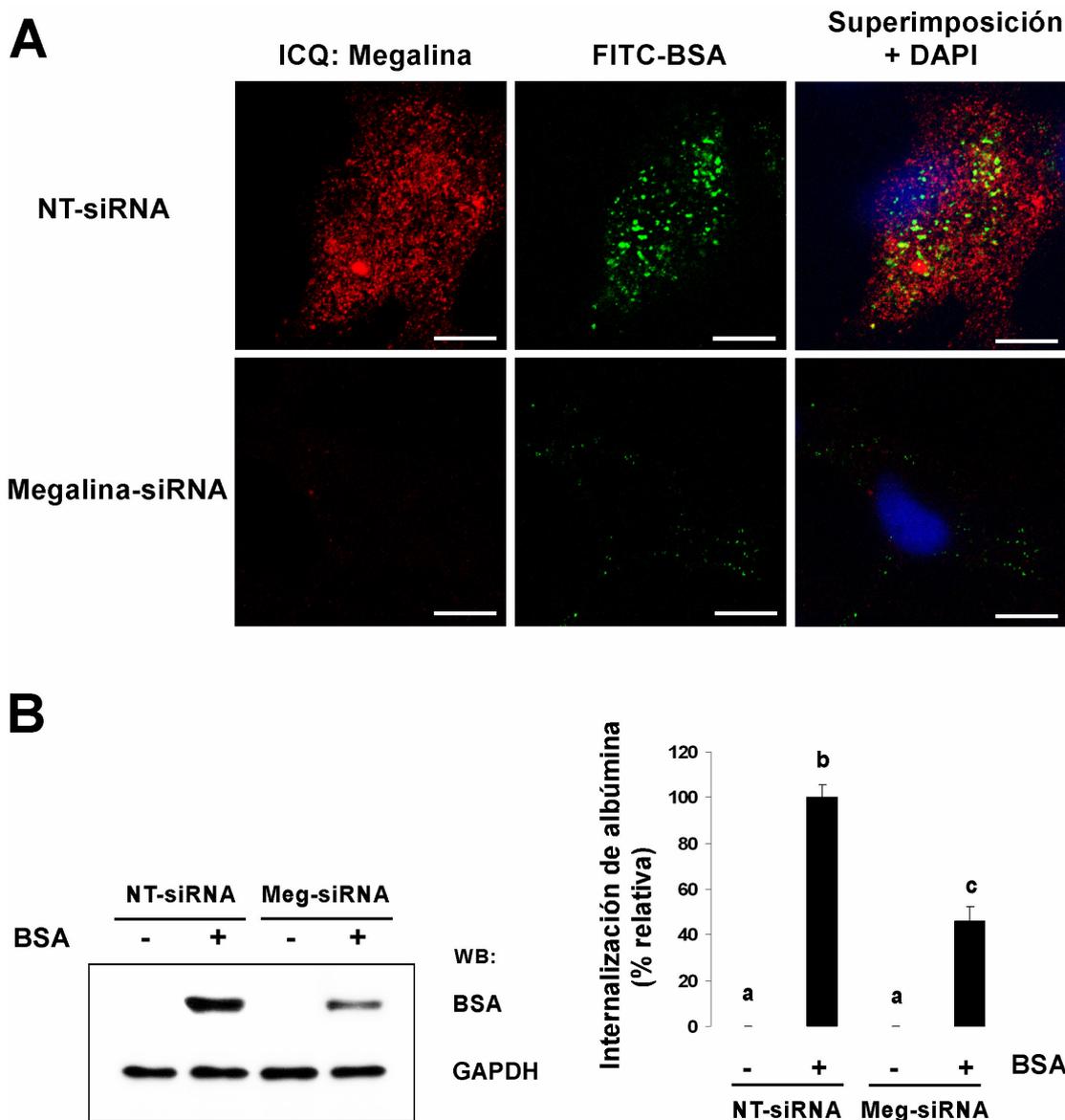


Figura 8. El silenciamiento de la megalina disminuye la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Meg-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v), para el análisis de Western blot (B). A continuación, las células se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de megalina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya megalina fue silenciada, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 10 µm. **B** Western blot y cuantificación de BSA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias ± SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; p<0,01 cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

Para analizar la internalización de la albúmina, los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C en presencia de FITC-BSA al 0,5% (p/v) o de BSA al 2% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos, para permitir la internalización de la albúmina.

La figura 8 A muestra la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya megalina fue silenciada, cuando se comparan con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El análisis de *Western blot* muestra que la internalización de la albúmina disminuyó cerca del 50% en los astrocitos tras el silenciamiento de la megalina (Figura 8 B), siendo esta reducción coherente con la eficacia del silenciamiento de la megalina (cerca del 65%; Figura 6).

4.2 Estudio de la vía de endocitosis empleada en la internalización de la albúmina en astrocitos. Participación de la caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina

Una vez conocida la implicación de la megalina como el receptor responsable de la internalización de la albúmina, decidimos investigar el tipo de endocitosis que tiene lugar en este proceso.

Tal y como se ha descrito en la Introducción, la endocitosis puede tener lugar a través de vesículas recubiertas de clatrina, de caveolas o de mecanismos independientes de éstos. La endocitosis mediada por receptor de la albúmina puede ocurrir mediante un mecanismo dependiente de clatrina (Christensen et al. 1998) o a través de un mecanismo independiente de clatrina, la endocitosis por caveolas (Schubert et al. 2001; Carro et al. 2005).

4.2.1 La caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina se expresan en astrocitos en cultivo primario

Para estudiar el tipo de endocitosis que ocurre en la internalización de la albúmina, se investigó la posible expresión de caveolinas (proteínas constituyentes de las caveolas) y de clatrina en astrocitos de 14 DIV, mediante el análisis de los niveles de expresión de estas proteínas por Western blot e inmunocitoquímica. Se conoce la expresión de la caveolina-1, de la caveolina-2 y de la clatrina en cultivo primario de astrocitos de la corteza cerebral de rata (Cameron et al. 1997; Megias et al. 2000; Zschocke et al. 2005). En este sentido, nuestros resultados muestran que las tres proteínas se expresan en los astrocitos de 14 DIV (Figura 9 A y B).

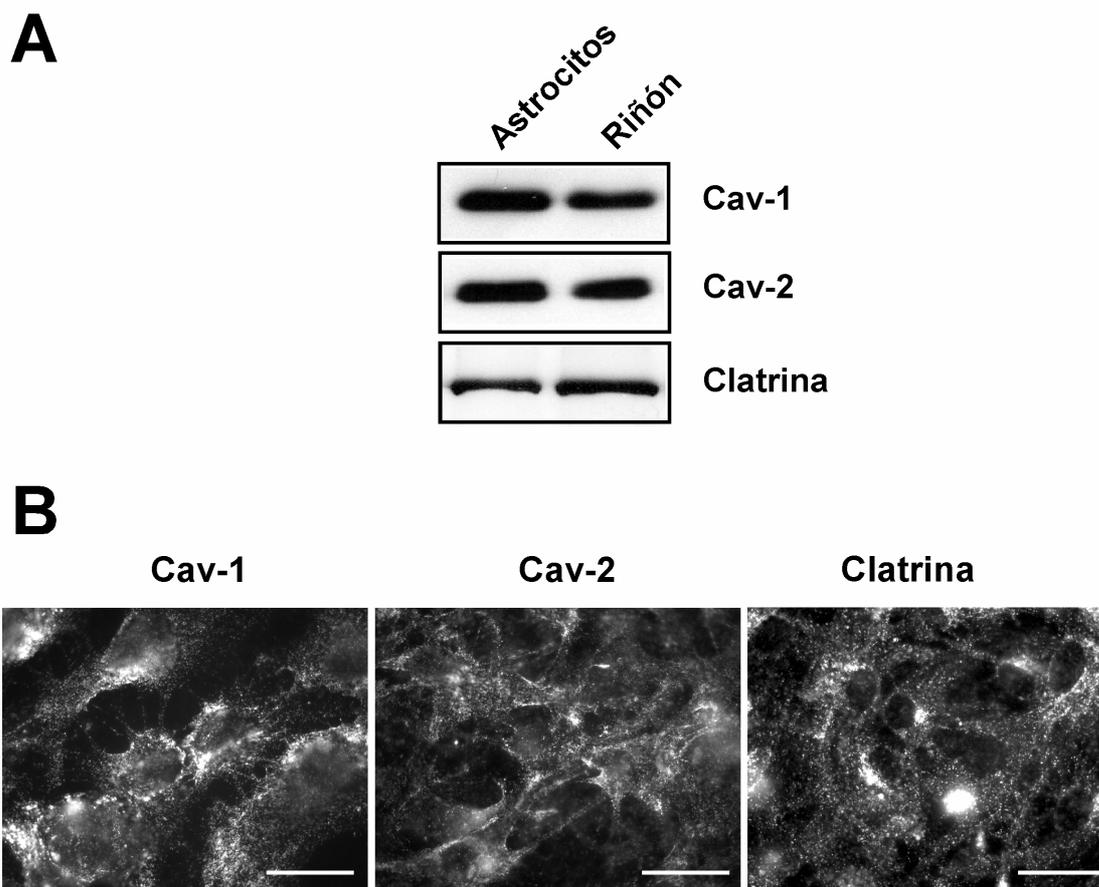


Figura 9. Expresión de caveolina-1, caveolina-2 y clatrina en astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos de rata se cultivaron como se describe en “Materiales y Métodos”. El análisis de Western blot (**A**), usando corteza renal como control positivo, y la inmunocitoquímica (**B**) revelaron la expresión de caveolina-1, caveolina-2 y clatrina en astrocitos de 14 DIV. En **B**, Barra de calibrado: 20 µm.

4.2.2 La albúmina y la megalina interaccionan con las caveolinas, pero no con la clatrina, en la unión y en la internalización de la albúmina en los astrocitos

Con objeto de conocer si la albúmina interaccionaba con la caveolina-1, la caveolina-2 o la clatrina en astrocitos, se realizaron experimentos de colocalización entre estas proteínas y la albúmina. Para ello, se incubaron los astrocitos en presencia de FITC-BSA, posibilitando que la albúmina se uniera a la membrana y, seguidamente, se realizó una inmunocitoquímica contra las proteínas de interés. La distribución de los dos fluoróforos se analizó por microscopía confocal (Figura 10 A; albúmina en verde y caveolina-1, caveolina-2 o clatrina en rojo). Los resultados muestran que la albúmina colocaliza con la caveolina-1 y con la caveolina-2 en la membrana de los astrocitos, a juzgar por el color amarillo observado en las imágenes superimpuestas, pero no con la clatrina (Figura 10 A).

Para corroborar los resultados obtenidos en los experimentos de inmunocitoquímica y, además, para conocer si la albúmina y la megalina interaccionaban con las caveolinas o con la clatrina durante los procesos de unión y de internalización de la albúmina en los astrocitos en cultivo primario, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación. Para los experimentos de unión de la albúmina, los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C, con BSA al 2% (p/v) y para los experimentos de internalización de albúmina, los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C con BSA al 2% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. Las proteínas extraídas de los astrocitos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo monoclonal contra la BSA o con anticuerpo policlonal contra la megalina. Seguidamente, se analizó la presencia de la caveolina-1, la caveolina-2 o la clatrina en los inmunocomplejos por Western blot. Los resultados muestran que los anticuerpos contra la BSA y contra la megalina también precipitaron la caveolina-1 y la caveolina-2, pero no la clatrina, tanto en los experimentos de unión (Figura 10 B y F), como en los de internalización (Figura 11 A y B). Las coimmunoprecipitaciones recíprocas confirmaron estos resultados, dado que los análisis de Western blot muestran la presencia de la albúmina en el inmunocomplejo obtenido tras la inmunoprecipitación de la caveolina-1 y la caveolina-2, pero no tras la inmunoprecipitación de la clatrina, tanto en los experimentos de unión (Figura 10 C, D y E) como en los de internalización (Figura 11 C, D y E). Además, los resultados muestran la presencia de la megalina en el inmunocomplejo obtenido tras la inmunoprecipitación de la caveolina-1, en el experimento de unión (Figura 10 C). No se observó señal en el control negativo, realizado inmunoprecipitando las proteínas con un anticuerpo contra GAPDH. Las proteínas extraídas de los astrocitos se usaron como control positivo para la caveolina-1, la caveolina-2, la clatrina, la megalina y la BSA.

En las mismas condiciones, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación para determinar una posible interacción entre la caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina. Las proteínas extraídas de los astrocitos se inmunoprecipitaron con anticuerpos policlonales contra la caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina, analizándose después la presencia de estas proteínas en los inmunocomplejos por Western blot. En los experimentos de unión, los resultados muestran que los anticuerpos contra la caveolina-1 y la caveolina-2 también precipitaron la caveolina-2 y la caveolina-1, respectivamente, pero no la clatrina (Figura 10 C y D). Las coimmunoprecipitaciones recíprocas confirman estos resultados, puesto que los análisis de Western blot no muestran ninguna señal de la caveolina-1 y la caveolina-2 en los inmunocomplejos obtenidos tras la inmunoprecipitación de la clatrina (Figura 10 E). En los experimentos de internalización, los resultados muestran que los anticuerpos contra la caveolina-1 y la caveolina-2 también precipitaron la caveolina-2 y la caveolina-1, respectivamente, y además la clatrina (Figura 11 C y D).

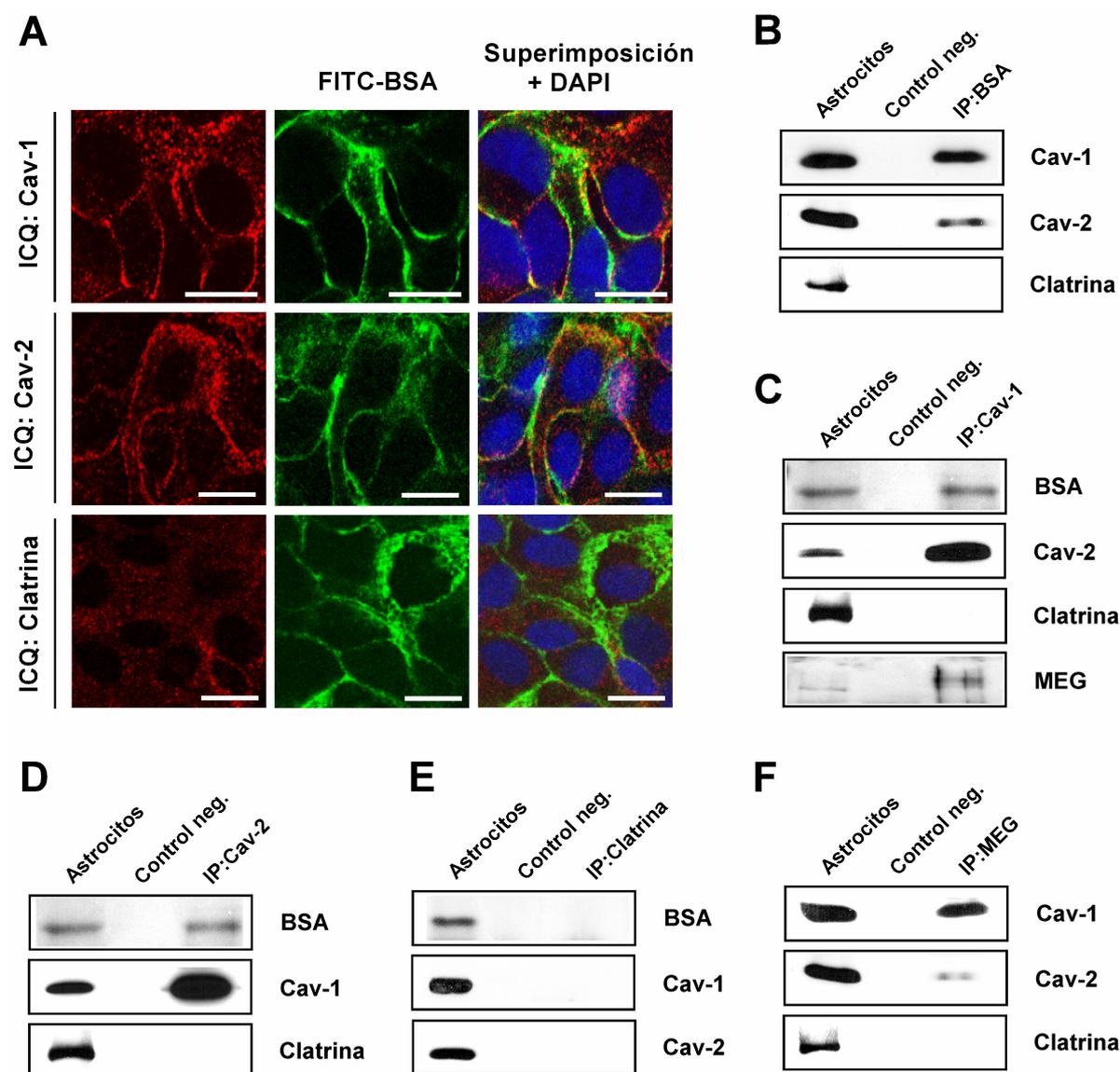


Figura 10. Interacción de la albúmina y de la megalina con caveolina-1 y caveolina-2, pero no con clatrina, en la unión de la albúmina a los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se incubaron durante 12 horas en DMEM sin suero. Después, las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (A) o con BSA al 2% (p/v) (B-F). **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de la caveolina-1, la caveolina-2 o la clatrina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la colocalización de la FITC-BSA con la caveolina-1 y con la caveolina-2, en amarillo en las imágenes superimpuestas, pero no con la clatrina. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 15 μm. En los experimentos de coimmunoprecipitación (B-F), tras varios lavados, las proteínas se extrajeron e inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra la BSA (B), la caveolina-1 (C), la caveolina-2 (D), la clatrina (E) o la megalina (F). Los análisis de Western blot de la caveolina-1, la caveolina-2, la clatrina, la BSA o la megalina se realizaron en estos inmunocomplejos. Control positivo: Western blot en el extracto proteico de astrocitos antes de la inmunoprecipitación. Control negativo: Western blot tras la inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal contra GAPDH.

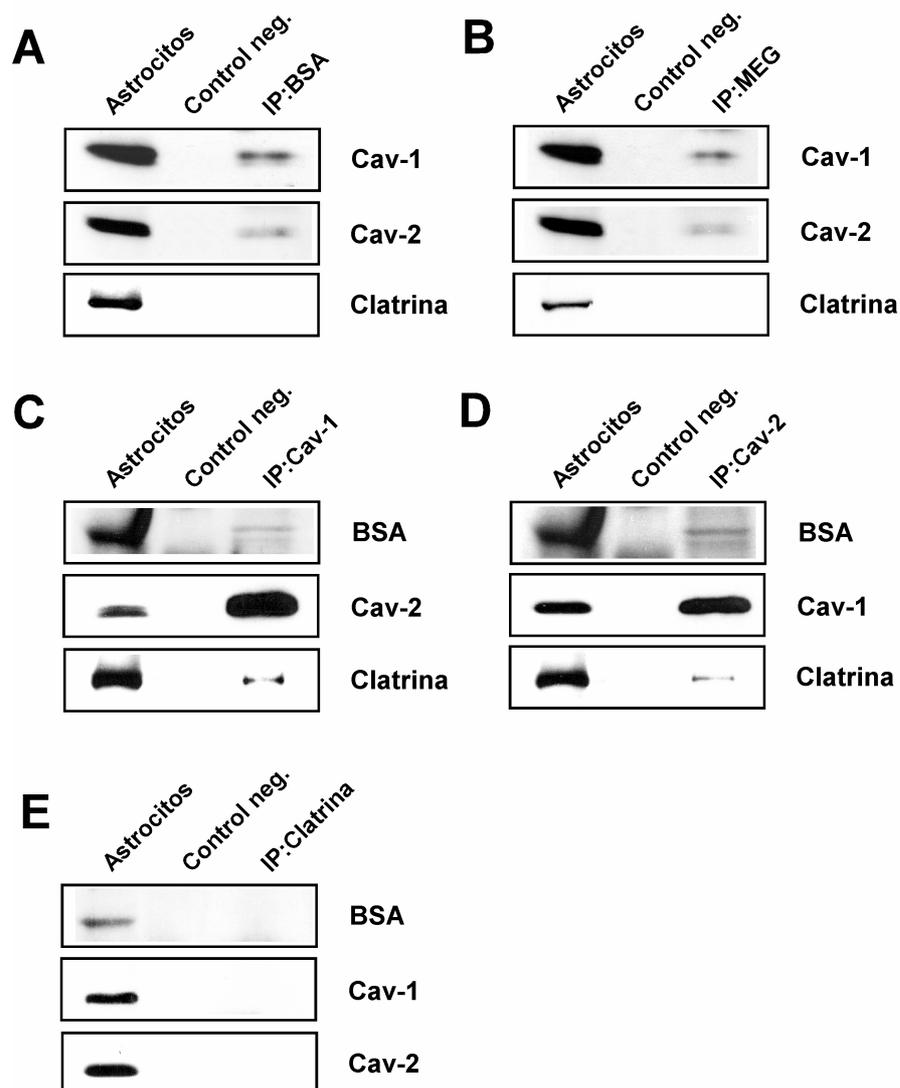


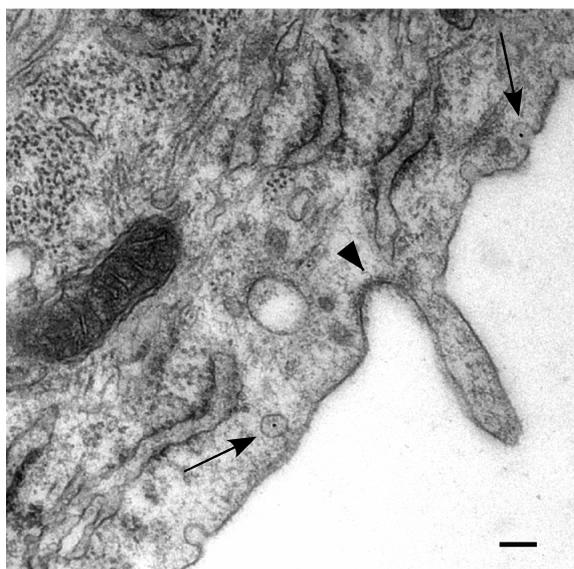
Figura 11. Interacción de la albúmina y de la megalina con caveolina-1 y caveolina-2, pero no con clatrina, en la internalización de la albúmina en los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Después las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con BSA al 2% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. Tras varios lavados, las proteínas se extrajeron e inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra la BSA (**A**), la megalina (**B**), la caveolina-1 (**C**), la caveolina-2 (**D**) y la clatrina (**E**). Los análisis de *Western blot* de la caveolina-1, la caveolina-2, la clatrina o la BSA se realizaron en estos inmunocomplejos. Control positivo: *Western blot* en el extracto proteico de astrocitos antes de la inmunoprecipitación. Control negativo: *Western blot* tras la inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal contra GAPDH.

En las coimmunoprecipitaciones recíprocas, los análisis de *Western blot* no muestran ninguna señal de la caveolina-1 y la caveolina-2 en los inmunocomplejos obtenidos tras la inmunoprecipitación de la clatrina (Figura 11 **E**). No se observó señal en el control negativo, realizado inmunoprecipitando las proteínas con un anticuerpo contra GAPDH. Las proteínas extraídas de los astrocitos se usaron como control positivo para la caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina.

4.2.3 Localización de la albúmina en vesículas de caveola

Con objeto de visualizar el sistema de endocitosis de la albúmina en los astrocitos, estos se incubaron durante 20 minutos a 4°C, en presencia de oro-BSA al 0,5% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos, para permitir la internalización de la albúmina. Las imágenes de microscopía electrónica muestran la localización del complejo oro-BSA en las caveolas (Figura 12, flechas). La figura 12 A muestra una vesícula recubierta de clatrina en la que no se aprecia la presencia de oro. La figura 12 B muestra una caveola cargada con varias moléculas de oro-BSA. Los dos tipos de vesículas (caveolas y de clatrina) se distinguen microscópicamente por el menor tamaño de las caveolas y por la presencia o ausencia de un recubrimiento denso (de clatrina). Se debe mencionar que la presencia de albúmina induce un incremento en el número de caveolas en los astrocitos, mientras que no afecta el número de vesículas recubiertas de clatrina (datos no mostrados).

A



B

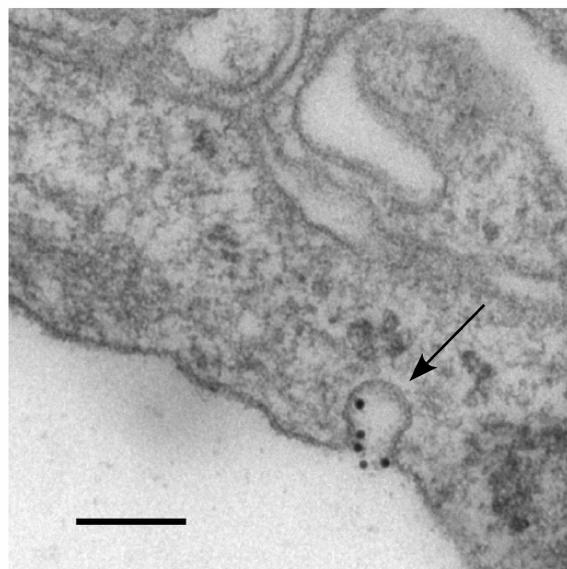


Figura 12. Localización de la albúmina en las caveolas de los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C con oro-BSA (10^{12} partículas de oro coloidal 10 nm por mL de BSA al 0,5% (p/v)) y se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** La imagen de microscopía electrónica muestra la localización de los complejos oro-BSA en las caveolas (señaladas con flechas). Notese una vesícula de clatrina (señalada con cabeza de flecha) en la que no se observa oro-BSA. **B** Imagen de microscopía electrónica de mayor aumento en la que se observa una caveola con un gran número de moléculas de oro-BSA. Barra de calibrado: 100 nm.

4.2.4 El silenciamiento de las caveolinas, pero no de la clatrina, disminuye la unión y la internalización de la albúmina en los astrocitos

Para clarificar el tipo de endocitosis empleada en la internalización de la albúmina en astrocitos, se silenció la expresión de la caveolina-1, de la caveolina-2 o de la clatrina mediante siRNA. Se utilizó como control una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana (designada NT-siRNA).

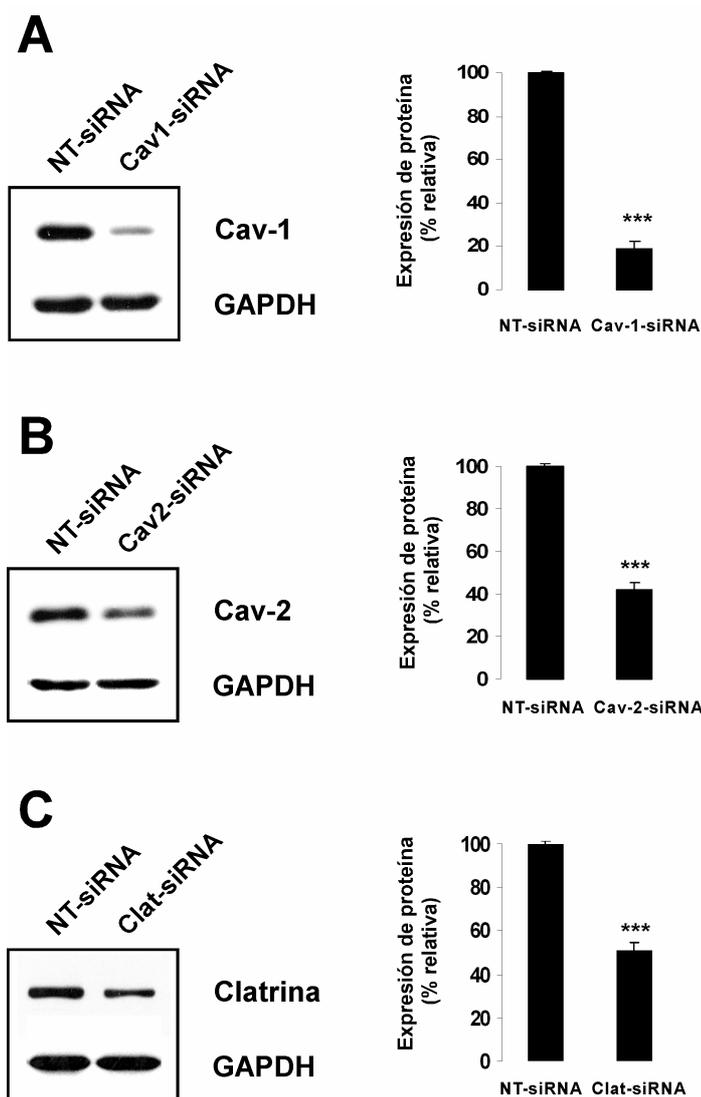


Figura 13. Silenciamiento de caveolina-1, caveolina-2 y clatrina en astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA, Cav-1-siRNA, Cav-2-siRNA o Clat-siRNA. Western blot y cuantificación de la caveolina-1 (**A**), la caveolina-2 (**B**) y la clatrina (**C**). Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del control (NT-siRNA). *** $p < 0,001$ comparado con el control (test *t* de Student).

El análisis de *Western blot* de la caveolina-1, de la caveolina-2 y de la clatrina, mostró una disminución significativa en la expresión de estas proteínas en los astrocitos transfectados con siRNA específicos para la caveolina-1 (designado Cav-1-siRNA), la caveolina-2 (designado Cav-2-siRNA) y la clatrina (designado Clat-siRNA), respectivamente (Figura 13 A, B y C). La cuantificación de estos resultados reveló una reducción de 81%, 61% y 49% de la expresión de la caveolina-1, la caveolina-2 y la clatrina, respectivamente.

Una vez logrado el silenciamiento de caveolina-1, caveolina-2 y clatrina, se estudiaron los procesos de unión e internalización de la albúmina en estas condiciones.

En los experimentos de unión de albúmina, tras la transfección con siRNA, los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v). El análisis de *Western blot* muestra una reducción de más del 50% en la unión de albúmina en los astrocitos cuya expresión de caveolina-1 fue silenciada, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA (Figura 14 A). Sin embargo, el silenciamiento de la caveolina-2 y de la clatrina no modificaron significativamente la unión de la albúmina en estos astrocitos (Figura 14 B y C), cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA.

Para analizar la internalización de la albúmina, los astrocitos con la expresión de caveolina-1, de caveolina-2 o de clatrina silenciada se incubaron durante 20 minutos a 4°C, en presencia de FITC-BSA al 0,5% (p/v) o de BSA al 2% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos, para permitir la internalización de la albúmina. Los resultados obtenidos muestran una reducción de la internalización de FITC-BSA en los astrocitos transfectados con Cav1-siRNA o Cav2-siRNA, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA (Figura 15 A y Figura 16 A, respectivamente). Del mismo modo se verificó, después del análisis de *Western blot*, una disminución en la internalización de la albúmina del 58% y 42% en los astrocitos con la expresión de la caveolina-1 y de la caveolina-2 silenciada, respectivamente, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA (Figura 15 B y Figura 16 B).

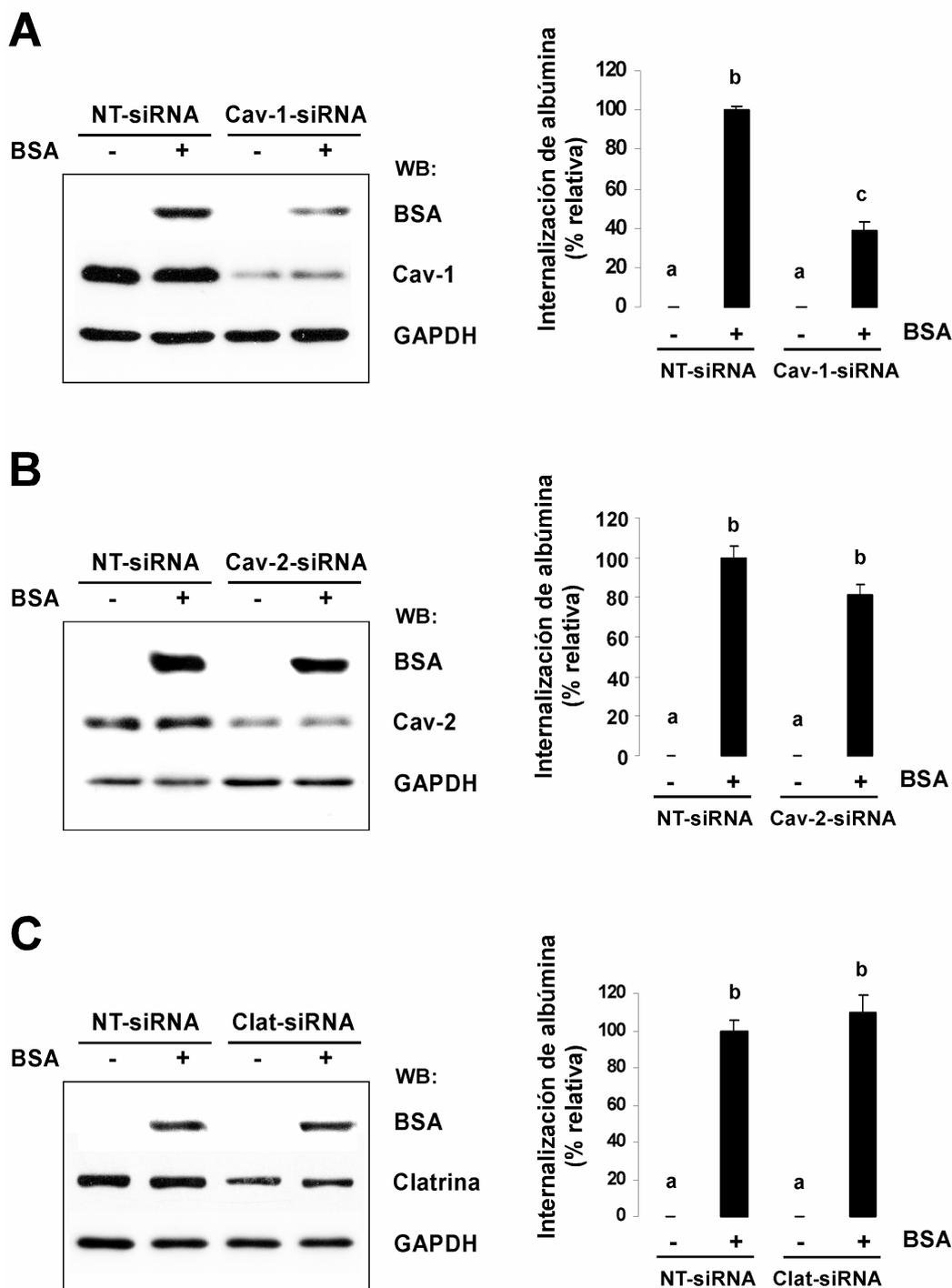


Figura 14. El silenciamiento de caveolina-1, pero no el de caveolina-2 y clatrina, disminuye la unión de la albúmina a los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA y con Cav-1-siRNA, Cav-2-siRNA o Clat-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v). Western blot y cuantificación de BSA en astrocitos transfectados con Cav-1-siRNA (**A**), Cav-2-siRNA (**B**) o Clat-siRNA (**C**). Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

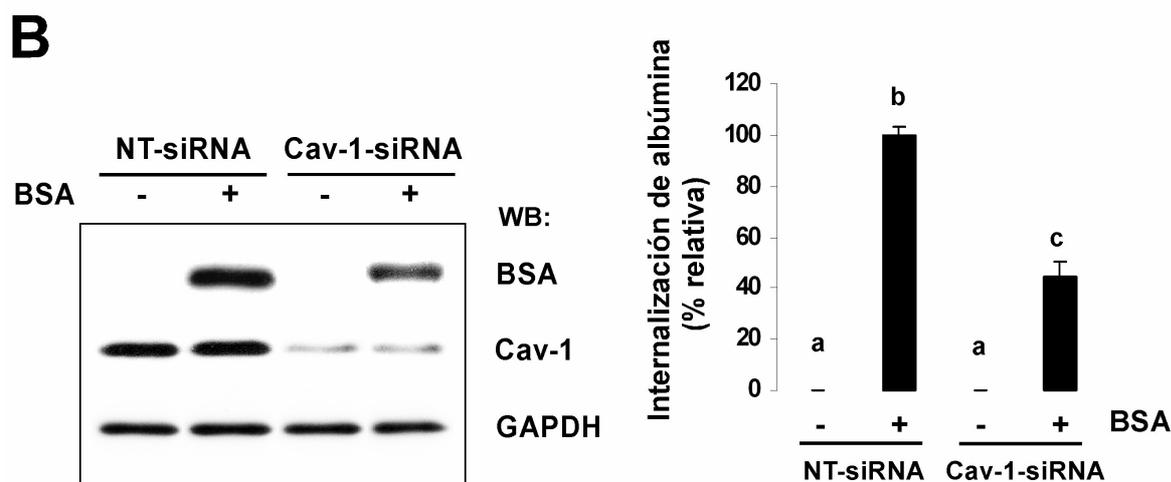
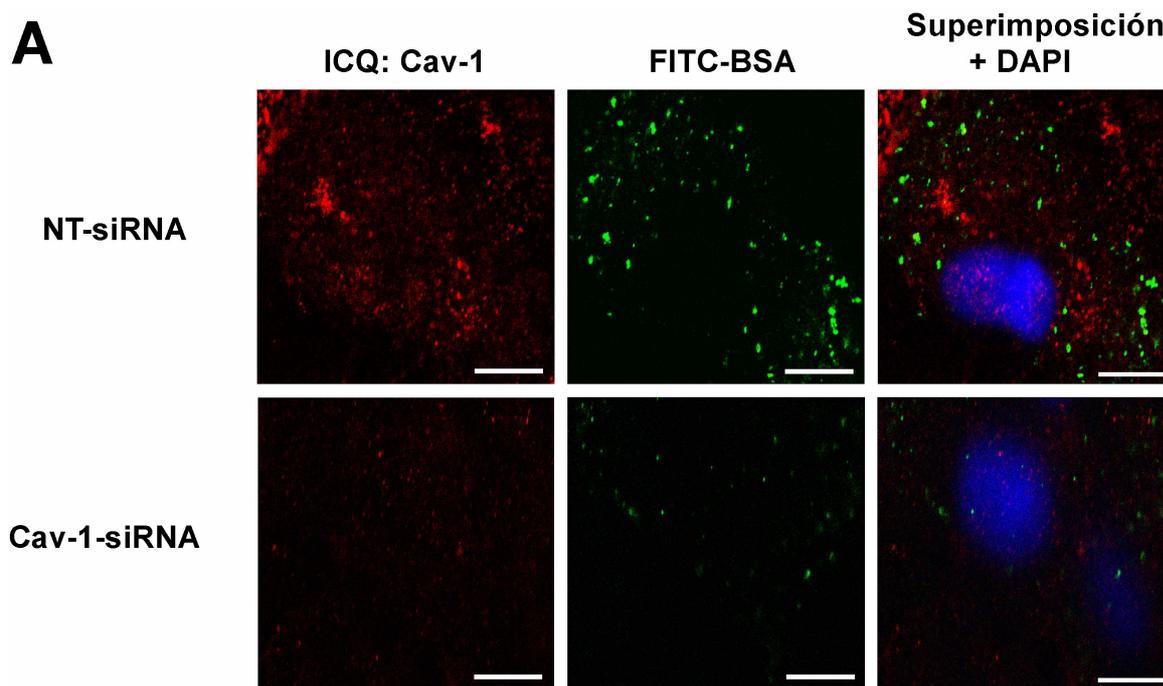


Figura 15. El silenciamiento de la caveolina-1 disminuye la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA y con Cav-1-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v), para el análisis de Western blot (B). A continuación, las células se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de caveolina-1 (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya caveolina-1 fue silenciada, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 10 μ m. **B** Western blot y cuantificación de BSA en astrocitos transfectados con Cav-1-siRNA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

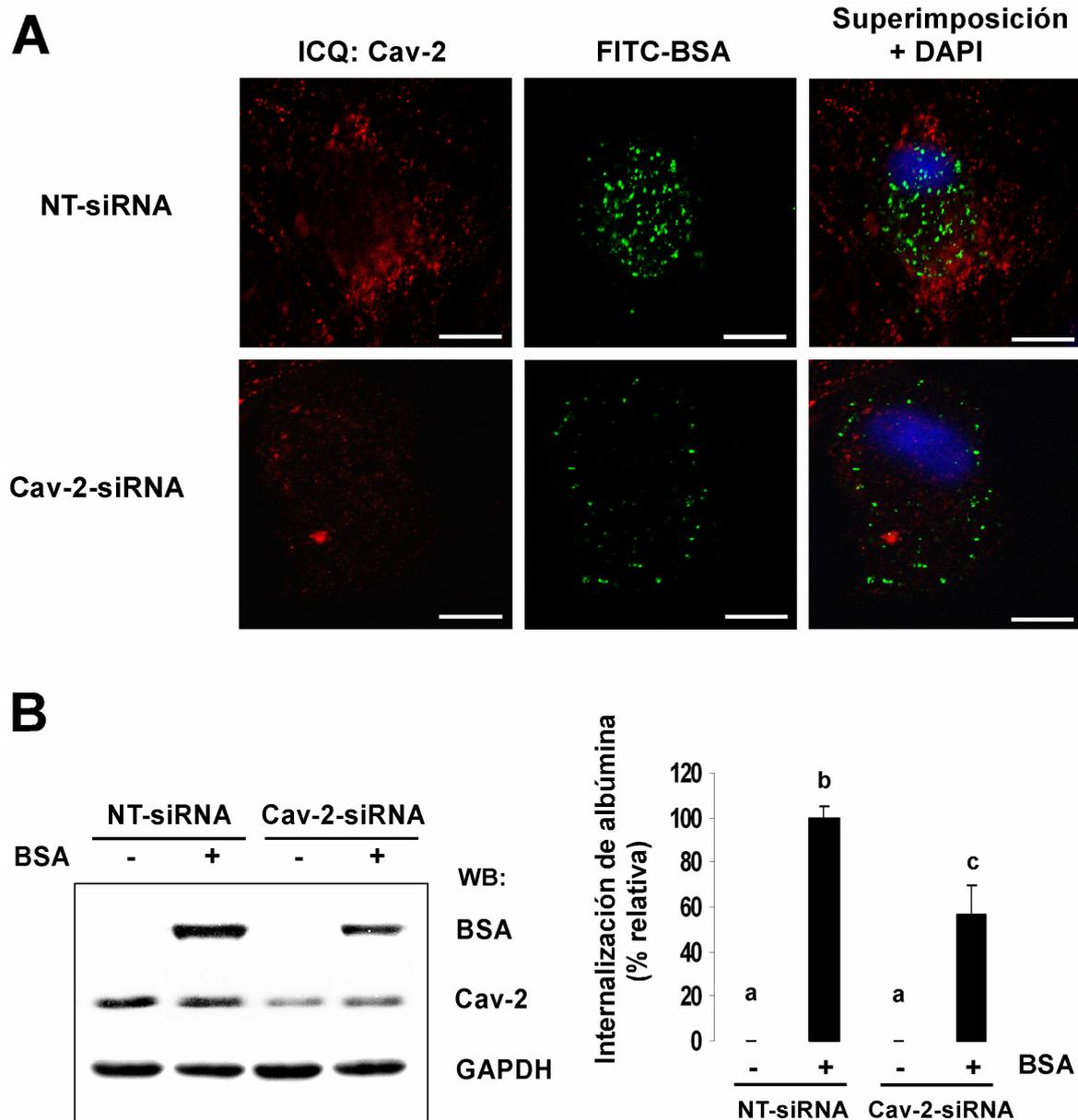


Figura 16. El silenciamiento de la caveolina-2 disminuye la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA y con Cav-2-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v) (A) o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v) (B). A continuación, las células se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de caveolina-2 (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya caveolina-2 fue silenciada, cuando se comparan con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 10 µm. **B** Western blot y cuantificación de BSA en astrocitos transfectados con Cav-2-siRNA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias ± SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; p<0,01 cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

Sin embargo, el silenciamiento de la clatrina no modificó la internalización de la albúmina en estos astrocitos.

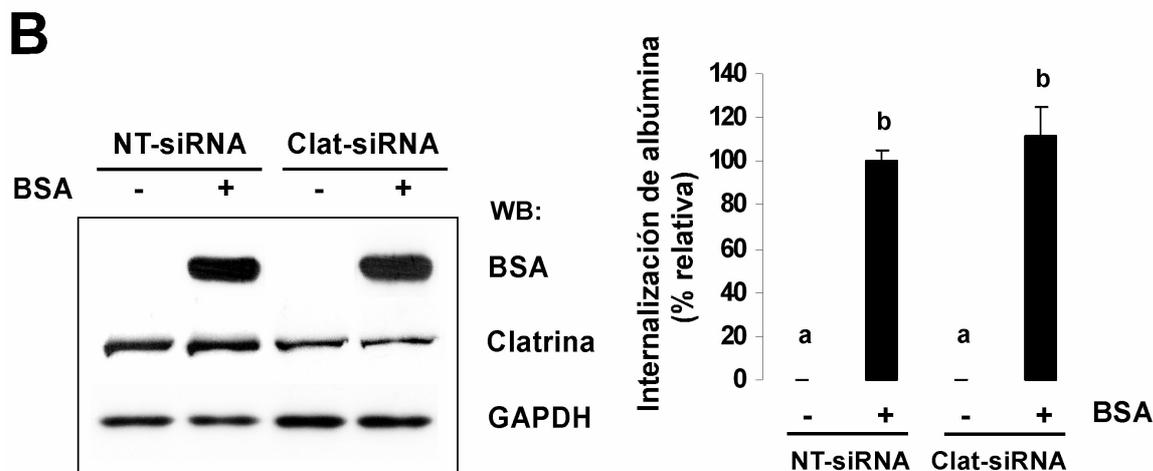
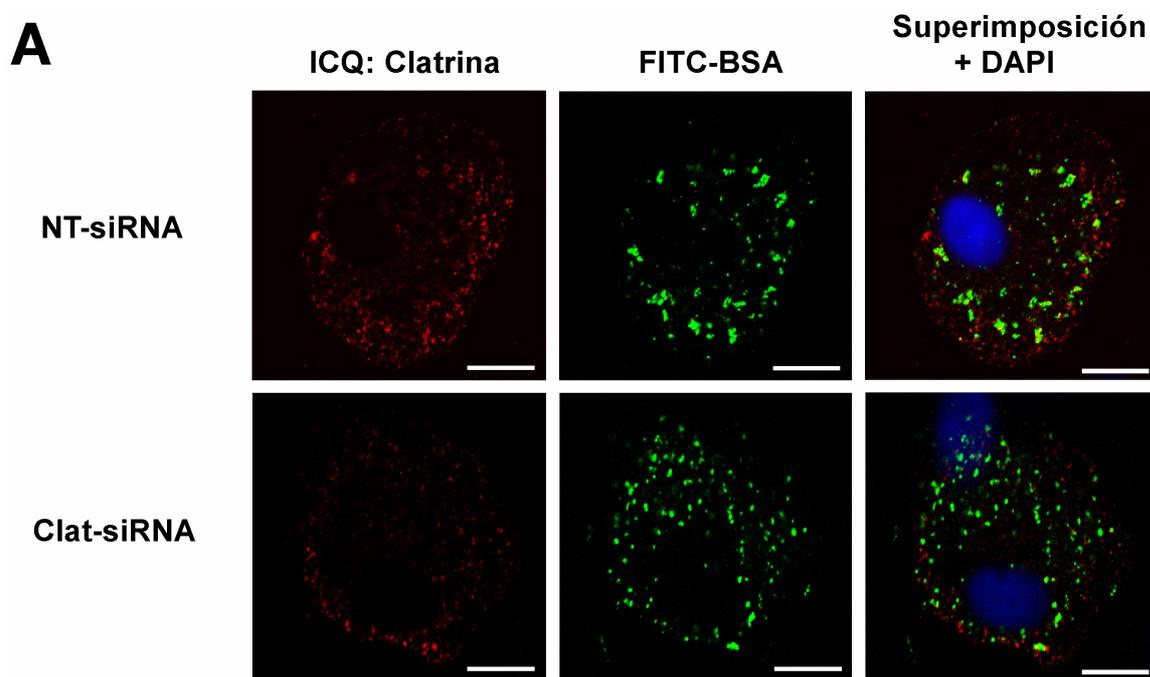


Figura 17. El silenciamiento de la clatrina no modifica la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA y Clat-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v) (A) o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v) (B). A continuación, las células se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de clatrina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la ausencia de diferencias en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya clatrina fue silenciada, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 10 μ m. **B** Western blot y cuantificación de BSA en astrocitos transfectados con Clat-siRNA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

Como se observa en la figura 17 A, los niveles de FITC-BSA son idénticos en la situación control (NT-siRNA) y en los astrocitos transfectados con Clat-siRNA. La cuantificación del análisis de Western blot reveló un ligero incremento (cerca del 10%), no significativo, de la internalización de albúmina en los astrocitos cuya clatrina fue silenciada, respecto a la situación control (NT-siRNA) (Figura 17 B).

Para confirmar los resultados obtenidos con los siRNAs respecto a la implicación de la clatrina en la endocitosis de la albúmina, los astrocitos se pretrataron con un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina, la clorpromazina (CPZ), un fármaco que inhibe el ensamblaje de la clatrina y de la AP-2 en la invaginación (Wang et al. 1993). Como control se estudió la captación de la transferrina, considerada un marcador de la endocitosis mediada por clatrina (Puri et al. 2001). La clorpromazina inhibió cerca del 90% la endocitosis de la transferrina (Figura 18 A), indicando que el tratamiento con CPZ en astrocitos era efectivo. Sin embargo, el tratamiento con la CPZ no modificó la internalización de la albúmina (Figura 18 B y C), respecto al control, confirmando los resultados obtenidos con el siRNA de clatrina.

4.2.5 La albúmina se localiza en el retículo endoplasmático y en el trans-Golgi durante su internalización

El proceso de transcitosis de la albúmina en los astrocitos se encuentra descrito en trabajos previos (Tabernero et al. 2001; Tabernero et al. 2002a). El mecanismo propuesto incluye el paso de la albúmina por el aparato de Golgi y, a continuación, por el retículo endoplasmático, donde ocurre la activación del factor de transcripción SREBP-1 y, consecuentemente, la activación de la enzima SCD-1, enzima limitante de la síntesis del ácido oleico. El mecanismo de transcitosis se estudió empleando varios inhibidores del tráfico de vesículas (nocodazol, brefeldina A y monensina) y analizando el contenido intracelular de albúmina. Para confirmar el paso de la albúmina por el Golgi y el RE, en este trabajo analizamos, mediante inmunocitoquímica, la colocalización de la albúmina con marcadores de estos orgánulos intracelulares. Las imágenes de microscopía confocal (Figura 19) muestran la colocalización, en amarillo, de FITC-BSA con GRP78BiP, un marcador del retículo endoplasmático, y con TGN38, un marcador del trans-Golgi. En ambos casos se observa la colocalización de estructuras tipo vesículas que contienen FITC-BSA con el RE (Figura 19 A) o con el trans-Golgi (Figura 19 B). Las imágenes ampliadas muestran más evidentemente esta colocalización

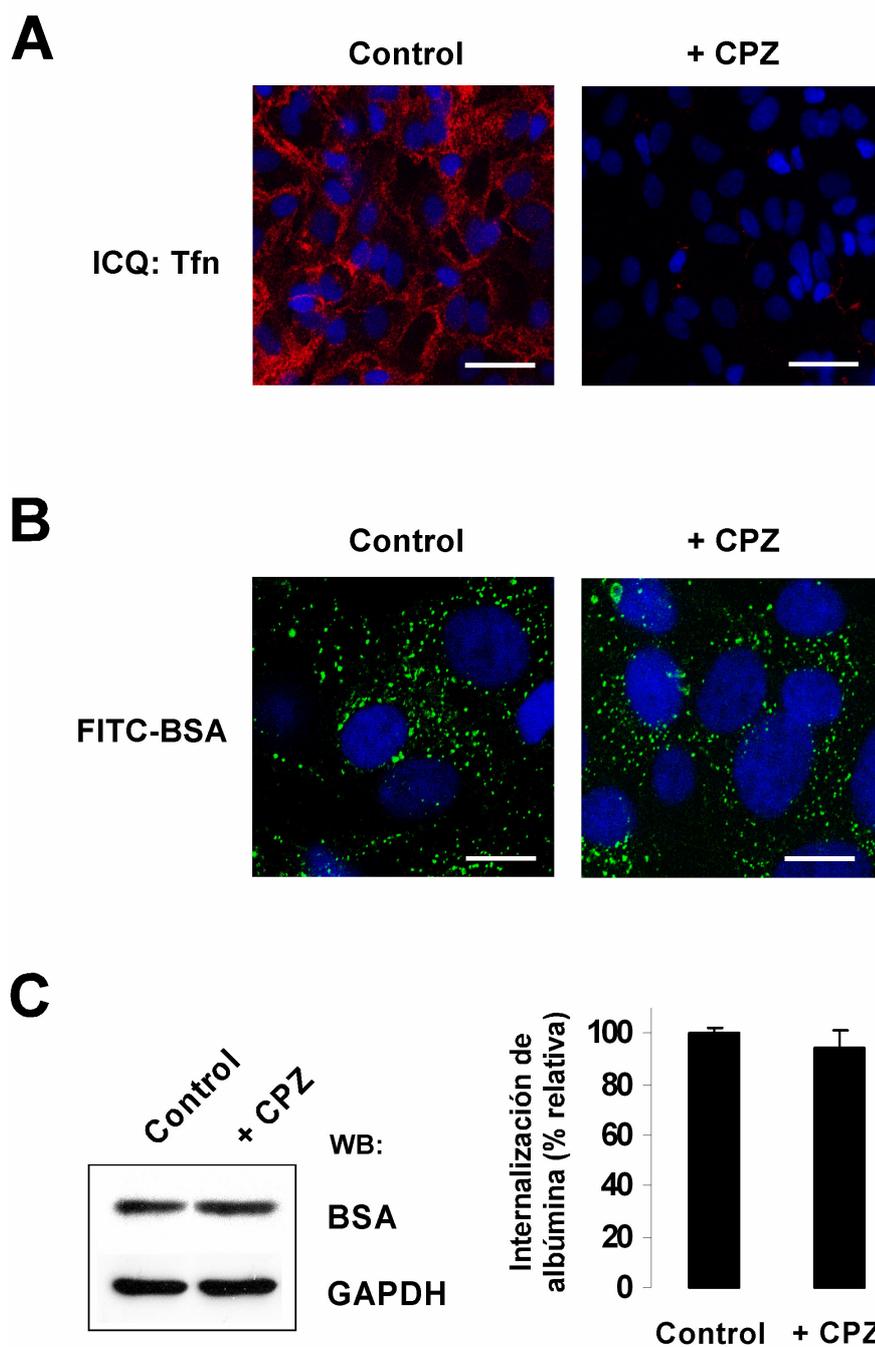


Figura 18. La inhibición de la formación de vesículas de clatrina no disminuye la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron preincubadas en ausencia o en presencia de clorpromazina (CPZ) 10 μ M durante 1 hora. A continuación, los astrocitos fueron incubados con FITC-BSA al 0,5% (p/v), con BSA al 0,5% (p/v) o con transferrina (250 μ L/mL) durante 20 minutos a 4°C y, a continuación, transferidos a 37°C durante 10 minutos. La clorpromazina se mantuvo en el medio de incubación durante todo el experimento. Inmunocitoquímica de transferrina (rojo) (**A**) y FITC-BSA (verde) (**B**). Las imágenes confocales muestran la ausencia de transferrina en las células preincubadas con CPZ y la ausencia de diferencias en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos preincubados en presencia y en ausencia de CPZ. El DNA nuclear se tiñó con DAPI (azul). Barra de calibrado: 10 μ m. **C** Western blot y cuantificación de BSA en astrocitos preincubados en ausencia o en presencia de CPZ 10 μ M. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes.

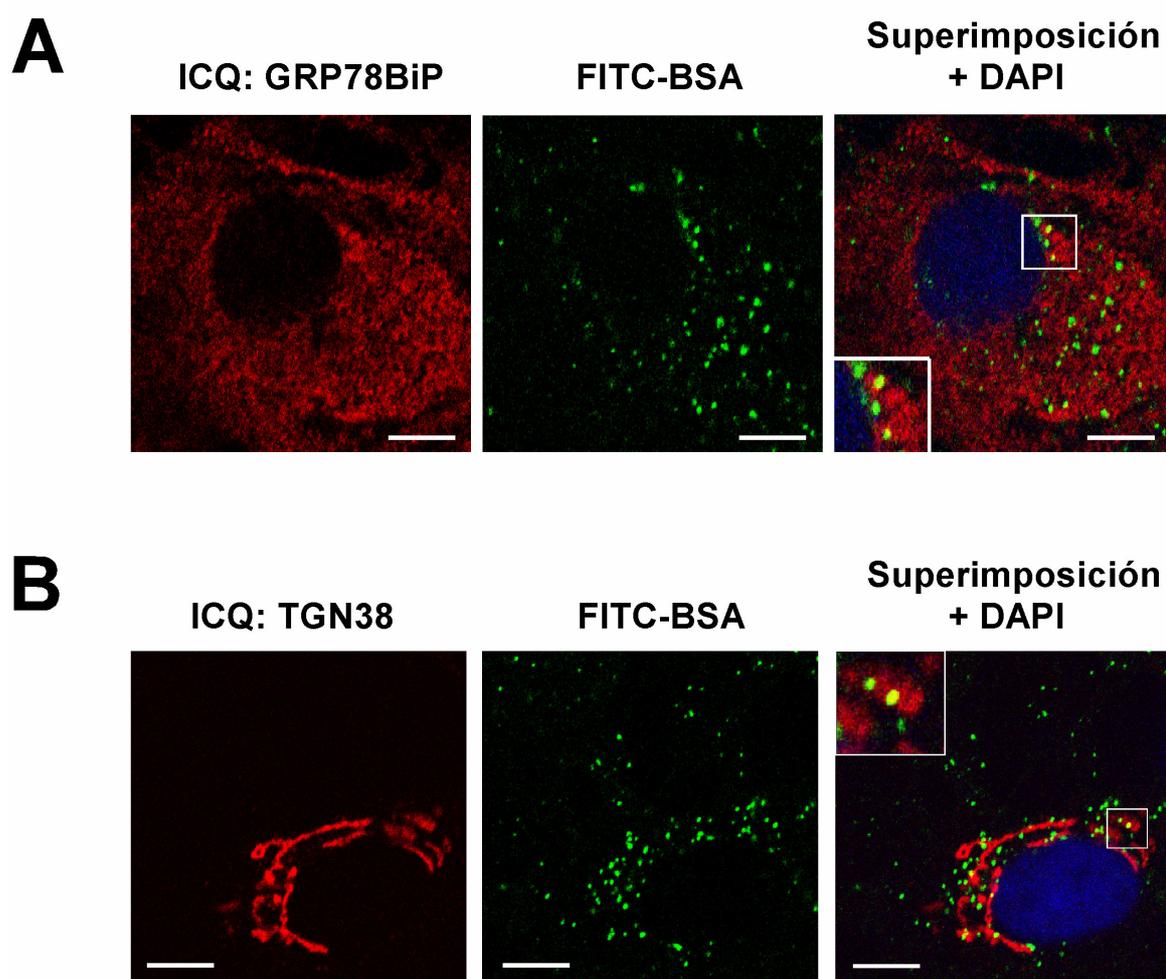


Figura 19. La albúmina colocaliza con los marcadores del retículo endoplasmático y del trans-Golgi durante su internalización. Los astrocitos de 14 DIV se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Después, las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de GRP78BiP (marcador del retículo endoplasmático, en rojo) y FITC-BSA (verde). La imagen aumentada del área enmarcada en la superimposición muestra la colocalización de la FITC-BSA con GRP78BiP, en amarillo. **B** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de TGN38 (marcador del Trans-Golgi, en rojo) y FITC-BSA (verde). La imagen aumentada del área enmarcada en la superimposición, muestra la colocalización de la FITC-BSA con TGN38, en amarillo. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 5 μ m.

4.3 Receptores implicados en el efecto neurotrófico del ácido oleico durante el desarrollo del SNC. Estudio de la participación de los receptores nucleares PPAR

Una vez conocido el receptor de la albúmina en astrocitos, así como el tipo de endocitosis por la cual la albúmina es internalizada, en definitiva, los eventos iniciales del proceso de síntesis del factor neurotrófico ácido oleico, quisimos estudiar la naturaleza del receptor neuronal que media el efecto neurotrófico de éste.

4.3.1 Efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas en cultivo primario

Para confirmar el efecto neurotrófico del ácido oleico (Tabernero et al. 2001), las neuronas se cultivaron durante 72 horas en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M. La expresión de las proteínas GAP-43 y MAP-2, marcadoras de la diferenciación axonal y dendrítica, respectivamente (Cáceres et al. 1986; Skene 1989), junto con la morfología celular, permiten definir el proceso de diferenciación neuronal. El ácido oleico induce alteraciones morfológicas en las neuronas, tales como crecimiento axonal y agrupamiento neuronal, como se muestra en las imágenes de contraste de fases (Figura 20 A, panel superior). El panel inferior de la figura 20 A muestra un aumento en la inmunorreactividad a GAP-43 en los cuerpos neuronales y axones. Además, la expresión de GAP-43 y MAP-2 se incrementó cerca del 46% y 53%, respectivamente, en presencia del ácido oleico (Figura 20 B).

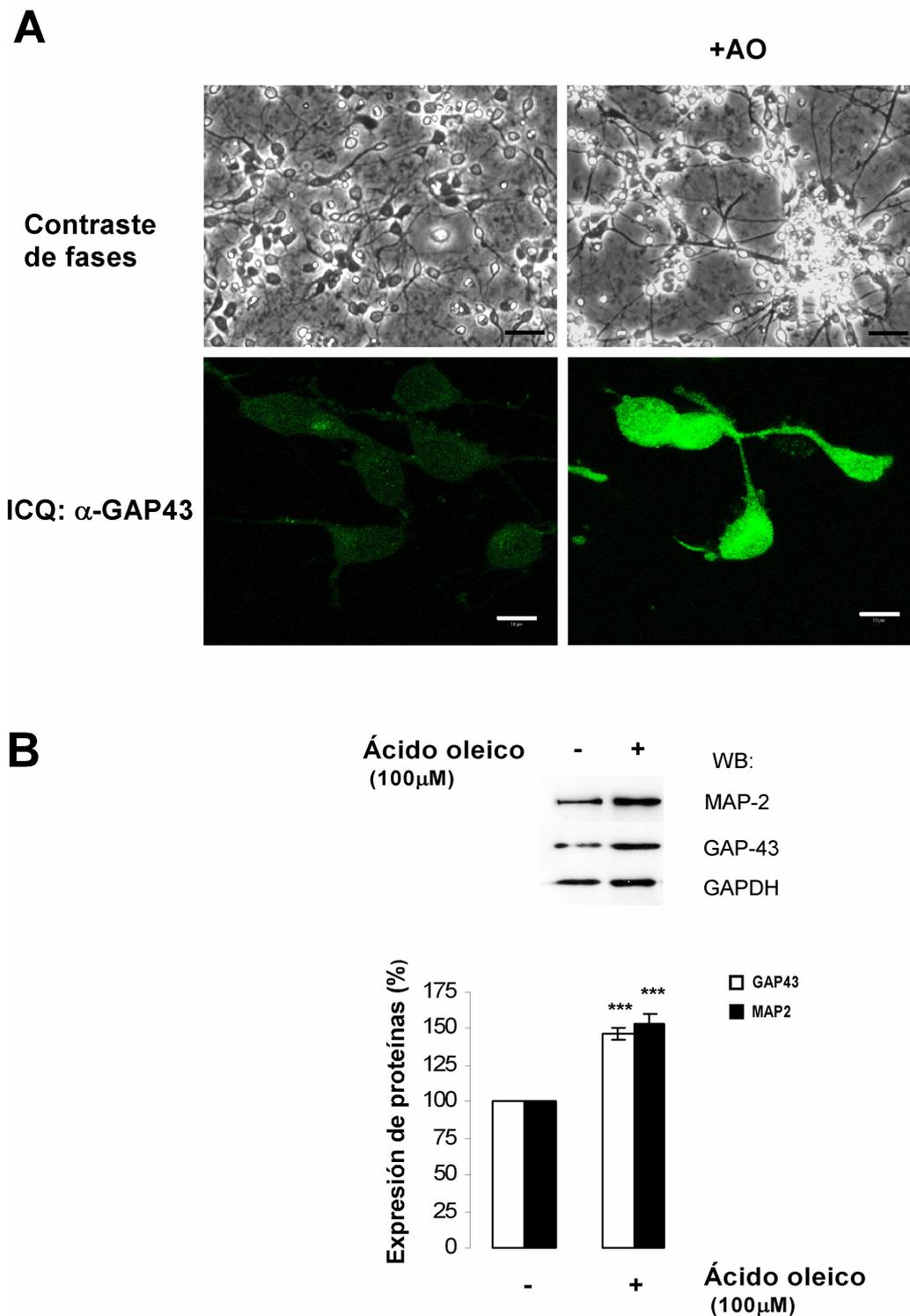


Figura 20. Diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico. Las neuronas fueron cultivadas como se describe en “Material y Métodos” e incubadas en ausencia o en presencia del ácido oleico 100 μ M (AO) durante 72 horas. **A** Las imágenes de contraste de fases (panel superior) muestran las alteraciones morfológicas inducidas por el ácido oleico. Barra de calibrado: 40 μ m. Inmunocitoquímica de GAP-43 (panel inferior). Las imágenes confocales muestran el aumento de la expresión de GAP-43 y su localización en los axones, inducido por el ácido oleico. Barra de calibrado: 10 μ m. **B** Western blot y cuantificación de GAP-43 y MAP-2 en neuronas cultivadas en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$, cuando se compara con los controles (test t de Student).

4.3.2 PPAR α , PPAR β y PPAR γ se expresan en neuronas en cultivo primario

Al ser ligando natural de los receptores nucleares PPAR, postulamos que el ácido oleico podría inducir la diferenciación neuronal mediante la activación de estos receptores. De esta forma, se estudió la participación de los receptores nucleares PPAR en el efecto neurotrófico inducido por el ácido oleico. En primer lugar se analizó la expresión de las tres isoformas de PPAR. Para ello, se determinaron mediante RT-PCR, los niveles de PPAR α , β y γ en neuronas en cultivo primario. Como se observa en la figura 21, las tres isoformas se expresan en las neuronas, de acuerdo con datos previamente descritos (Cimini et al. 2005). La presencia de ácido oleico 100 μ M en el medio de incubación de las neuronas, no modificó significativamente los niveles de mRNA de los PPARs.

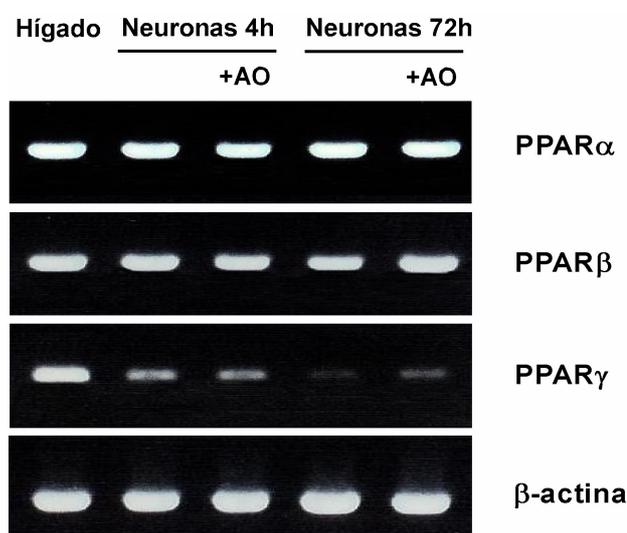
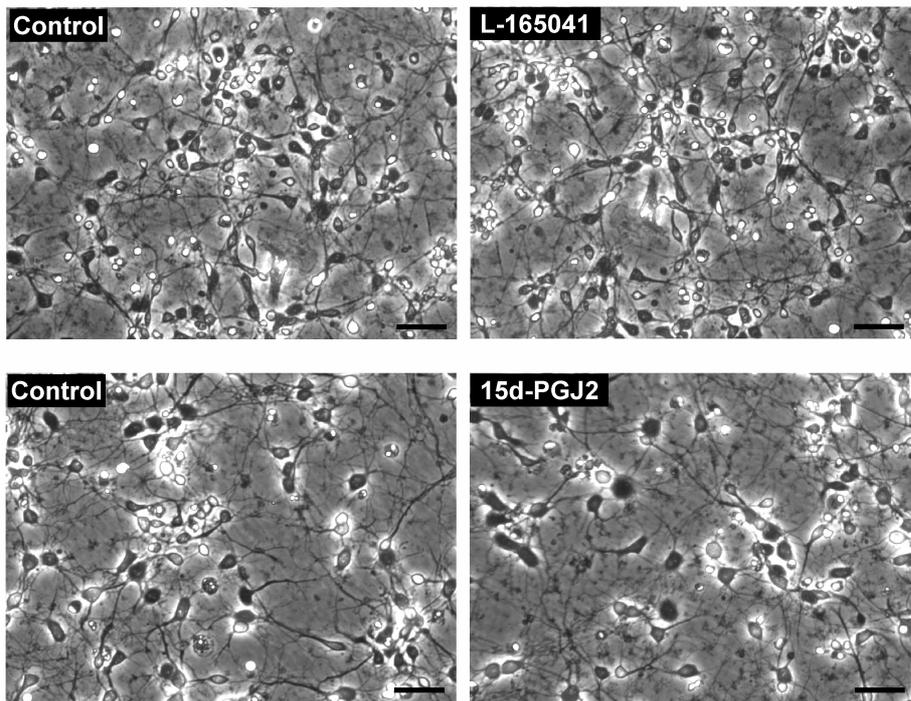


Figura 21. Expresión del mRNA de los PPAR α , β y γ en neuronas en cultivo primario. Las neuronas de rata fueron cultivadas como se describe en “Material y Métodos”. Las neuronas se incubaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M durante 4 y 72 horas y se extrajo el RNA total. Los niveles de mRNA de los PPAR α , β y γ se analizaron por RT-PCR. El RNA de hígado de rata se utilizó como control positivo para la expresión de las tres isoformas de PPAR. Los niveles de mRNA de β -actina se utilizaron como control de carga.

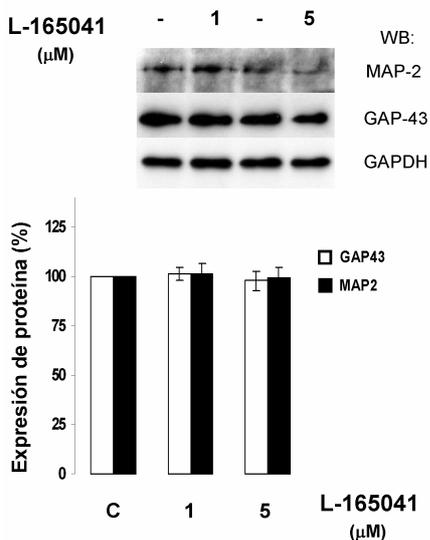
4.3.3 La activación del PPAR β y del PPAR γ por agonistas específicos no induce la diferenciación neuronal

Se ha descrito que el ácido oleico es un ligando para las tres isoformas de PPAR (Schoonjans et al. 1996; Forman et al. 1997; Kliewer et al. 1997). Tras confirmar la presencia de estos receptores en neuronas, se decidió explorar el posible papel de los PPAR como mediadores en el efecto neurotrófico del ácido oleico.

A



B



C

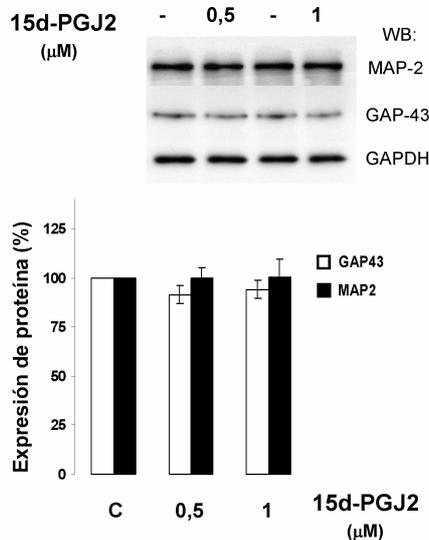


Figura 22. La activación del PPAR β y del PPAR γ por agonistas específicos no modifica la diferenciación neuronal. Las neuronas se incubaron en presencia de L165041, un agonista específico del PPAR β , y de 15d-PGJ2, un agonista específico de PPAR γ , durante 72 horas. **A** Imágenes de contraste de fases representativas de cada condición. Ninguna alteración morfológica se observa con L165041 1 μ M o con 15d-PGJ2 1 μ M, cuando se compara con los controles. Barra de calibrado: 40 μ m. Western blot y cuantificación de GAP-43 y MAP-2 en neuronas cultivadas en presencia de L165041 (B) ó 15d-PGJ2 (C). Las concentraciones de los agonistas están indicadas; en cada condición se utilizó como control la misma cantidad de vehículo, representada como un guión. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

Para ello, las neuronas se cultivaron en medio definido o en medio definido suplementado con albúmina al 2% (p/v), durante 72 horas, en presencia de concentraciones crecientes de L165041, un potente y específico agonista del PPAR β (Berger et al. 1999), o en presencia de 15d-PGJ2, ligando natural y de alta afinidad de PPAR γ (Forman et al. 1995). Se analizó la morfología neuronal, así como los niveles de GAP-43 y MAP-2. Los resultados revelan que ni el agonista específico de PPAR β , L165041, ni el agonista específico del PPAR γ , 15d-PGJ2, modifican significativamente la morfología neuronal (Figura 22 A). Además, no se observaron alteraciones en los niveles de las proteínas GAP-43 y MAP-2 en presencia de los agonistas del PPAR β o del PPAR γ (Figura 22 B y C, respectivamente). En esta figura se presentan los resultados obtenidos en medio definido suplementado con albúmina al 2% (p/v). Los resultados obtenidos en medio definido son idénticos (resultados no mostrados). Debemos mencionar que se probaron otras concentraciones de ambos agonistas. De hecho, en presencia de concentraciones más bajas de agonista (0,25 ó 0,5 μ M en el caso del L165041 y 0,1 ó 0,25 μ M para el 15d-PGJ2), no se detectaron efectos en la morfología neuronal ni en la expresión de GAP-43 y MAP-2, mientras que con concentraciones más elevadas (10 ó 20 μ M en el caso de L165041 y 5 ó 10 μ M para 15d-PGJ2), la viabilidad celular de las neuronas se vio seriamente comprometida.

4.3.4 Los agonistas del PPAR α , en presencia de albúmina, inducen la diferenciación neuronal

Para estudiar el papel del PPAR α en la diferenciación neuronal, se probó inicialmente el agonista Wy14643. Este compuesto sintético está descrito como un potente y específico agonista del PPAR α (Dowell et al. 1997; Forman et al. 1997). Las neuronas se cultivaron en medio definido o en medio definido suplementado con albúmina al 2% (p/v), durante 72 horas en presencia de concentraciones crecientes de Wy14643. Se analizaron la morfología neuronal, así como los niveles de GAP-43 y MAP-2. En ausencia de albúmina, el agonista Wy14643 (1-20 μ M) no modificó significativamente la morfología neuronal (Figura 23 A). Además, se observó un ligero incremento no significativo (10%) en los niveles de las proteínas GAP-43 y MAP-2 solamente en las concentraciones más elevadas de Wy14643 (10 y 20 μ M) (Figura 23 B).

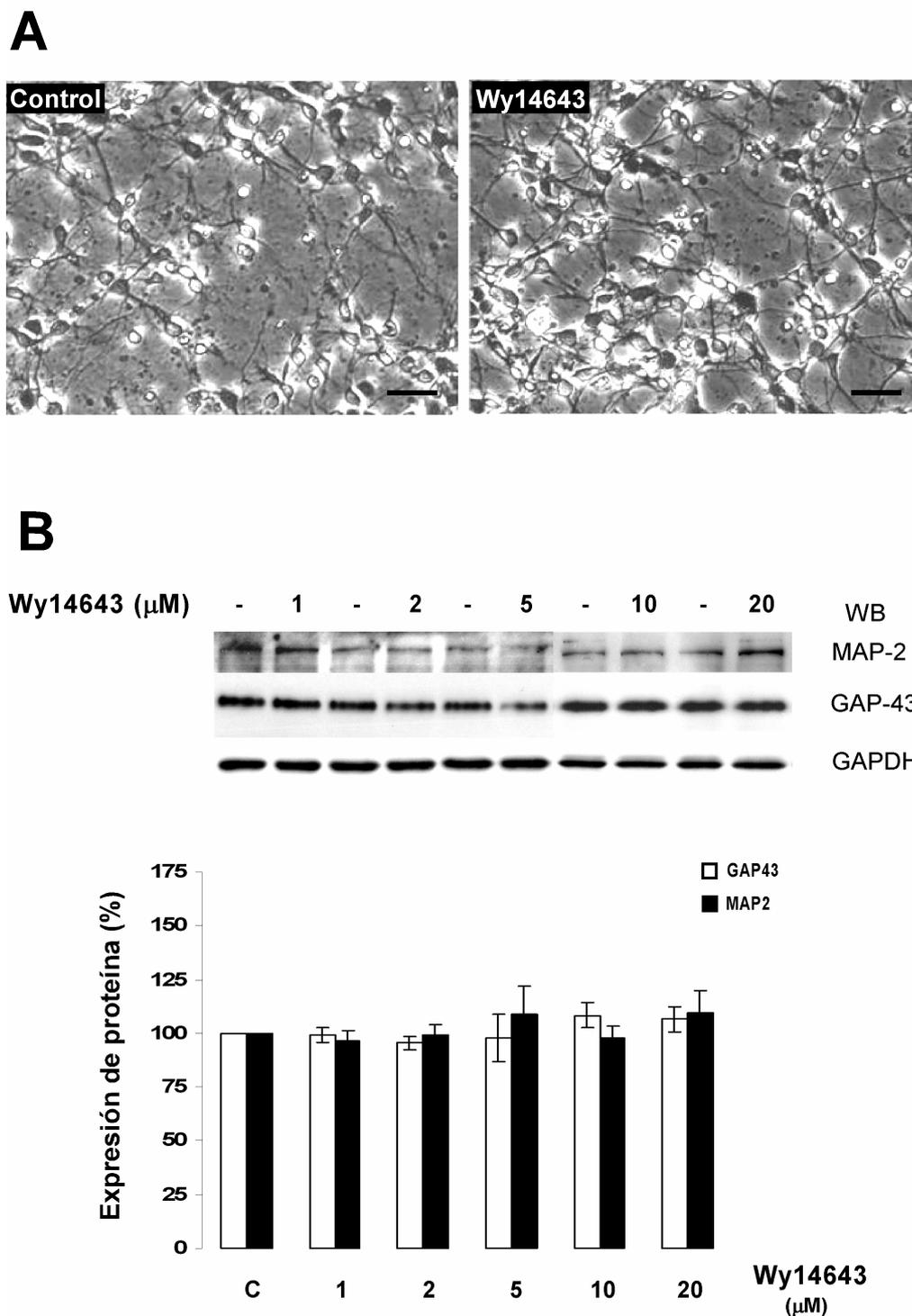


Figura 23. La activación del PPAR α por el agonista específico Wy14643 en ausencia de albúmina no modifica la diferenciación neuronal. Las neuronas se incubaron en medio definido en ausencia de albúmina 2% (p/v) y en presencia del agonista específico del PPAR α , Wy14643, durante 72 horas. **A** Imágenes de contraste de fases. No se observaron alteraciones morfológicas significativas con Wy14643 10 μM , cuando se compara con los controles. Barra de calibrado: 40 μm . **B** Western blot y cuantificación de GAP-43 y MAP-2 en neuronas cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de Wy14643. Las concentraciones de los agonistas están indicadas en la figura. En cada condición se utilizó como control la misma cantidad de vehículo, representada como un guión. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes.

Sin embargo, cuando se cultivaron las neuronas en presencia de albúmina, se observó que el agonista Wy14643 inducía modificaciones en la morfología neuronal (Figura 24 A), caracterizadas por el crecimiento axonal y el agrupamiento neuronal, semejantes a las modificaciones morfológicas promovidas por el ácido oleico.

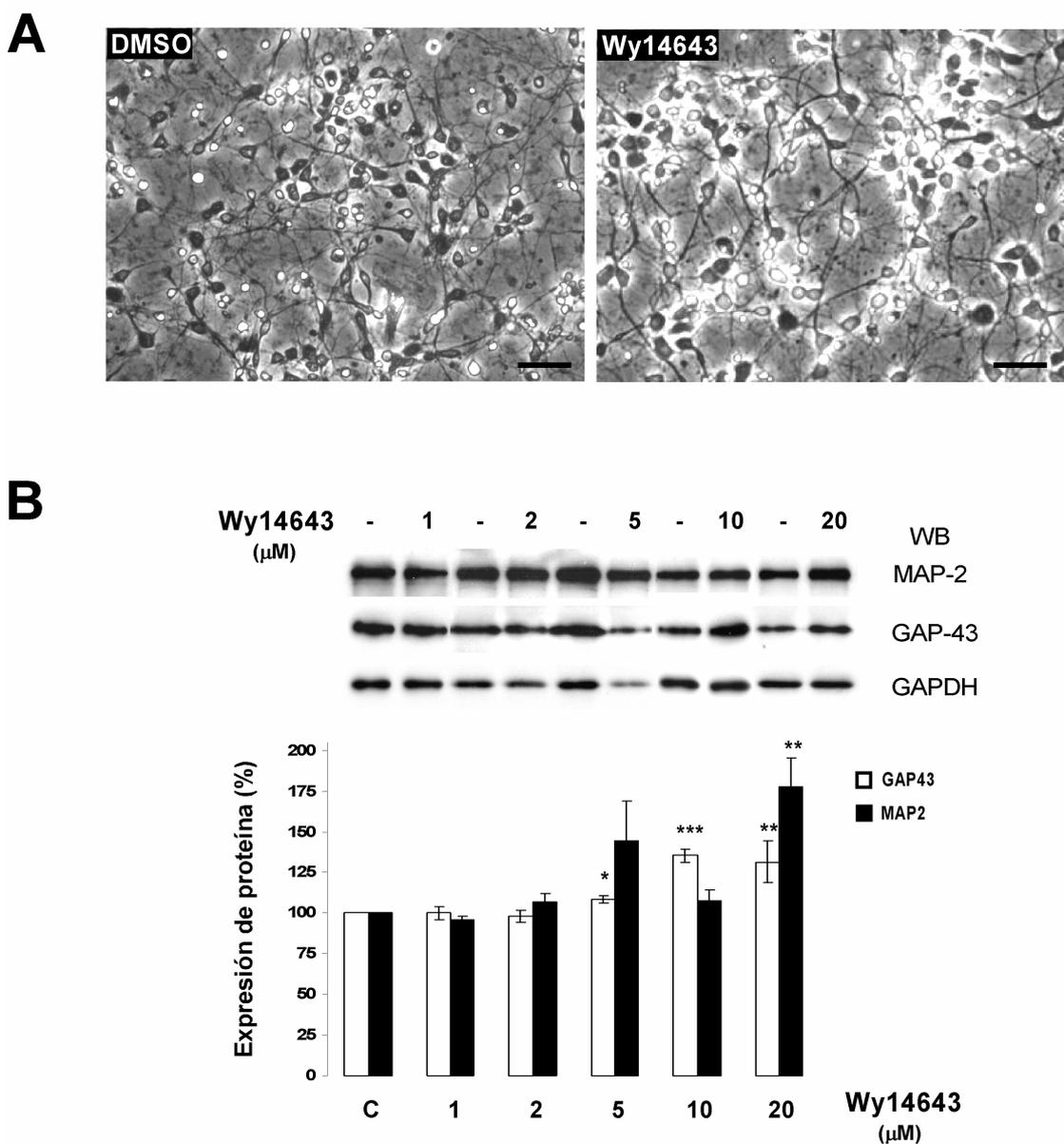


Figura 24. La activación del PPAR α por el agonista específico Wy14643 en presencia de albúmina induce la diferenciación neuronal. Las neuronas se incubaron en medio definido en presencia de albúmina 2% (p/v) y del agonista específico del PPAR α , Wy14643, durante 72 horas. **A** Imágenes de contraste de fases, mostrando las alteraciones morfológicas inducidas por Wy14643 10 μ M, cuando se compara con los controles. Barra de calibrado: 40 μ m. **B** Western blot y cuantificación de GAP-43 y MAP-2 en neuronas cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de Wy14643. Las concentraciones de los agonistas están indicadas en la figura. En cada condición se utilizó como control la misma cantidad de vehículo, representada como un guión. El agonista Wy14643 indujo un aumento en los niveles de las proteínas GAP-43 y MAP-2. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, cuando se compara con los controles (test t de Student).

No se observaron alteraciones significativas en la expresión de las proteínas GAP-43 y MAP-2 con concentraciones bajas de agonista (1-5 μM). Sin embargo, en presencia de Wy14643 10 μM , la expresión de GAP-43 se incrementó cerca del 35% y, además, la incubación con Wy14643 20 μM produjo un aumento del 31% y del 78% en la expresión de GAP-43 y MAP-2, respectivamente (Figura 24 B). También se testaron concentraciones más elevadas de agonista (datos no mostrados), pero a partir de Wy14643 50 μM la viabilidad celular se vio seriamente afectada.

Para confirmar los resultados obtenidos con el agonista Wy14643, se decidió realizar experimentos similares con otro agonista sintético y específico del PPAR α , como es el GW7674 (Brown 2000), y también con la OEA, un ligando endógeno con alta afinidad para el PPAR α (Fu et al. 2003; Guzman et al. 2004). Las neuronas se incubaron con concentraciones crecientes de estos agonistas (0,1-1 μM), en presencia de albúmina al 2% (p/v), durante 72 horas. Se observó que ambos agonistas inducían modificaciones en la morfología neuronal (Figura 25 A), caracterizadas por el crecimiento axonal y por el agrupamiento neuronal, semejantes a las modificaciones morfológicas promovidas por el ácido oleico. Además, los resultados muestran que el GW7674 0,5 μM y la OEA 0,5 μM incrementan significativamente la expresión de MAP-2 (cerca del 34% y 55%, respectivamente; Figura 25 B y C). El tratamiento de las neuronas con GW7674 1 μM u OEA 1 μM , indujo un aumento significativo en la expresión de GAP-43 (cerca del 43% y 40%, respectivamente; Figura 25 B y C). La expresión de GAP-43 y MAP-2 obtenida con GW7674 2 μM y OEA 2 μM fue similar a la lograda con la concentración de 1 μM (datos no mostrados).

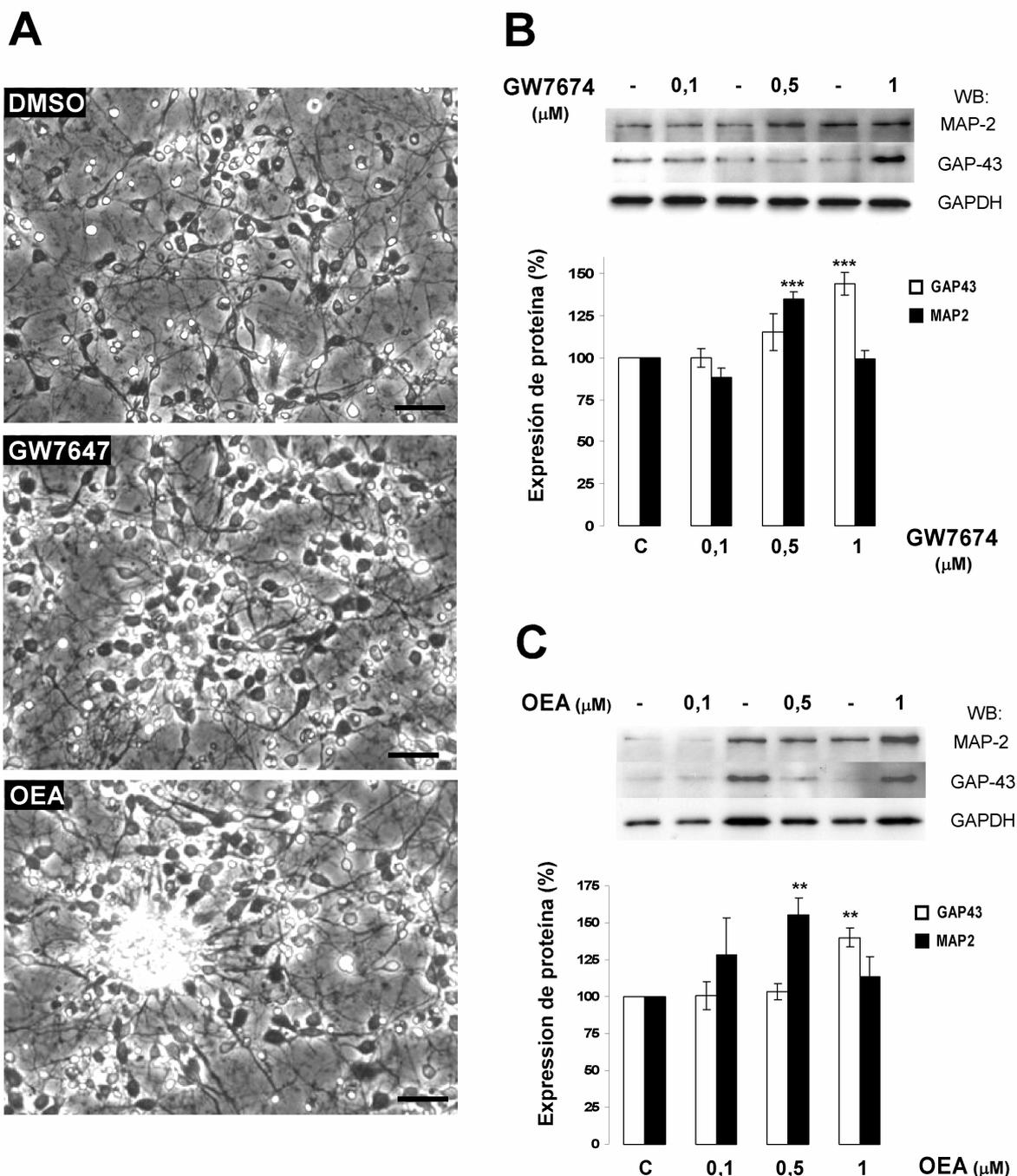


Figura 25. La activación del PPAR α por los agonistas específicos GW7674 y OEA induce la diferenciación neuronal. Las neuronas se incubaron en medio definido en presencia de albúmina 2% (p/v) y en presencia de los agonistas específicos del PPAR α , GW7674 y OEA, durante 72 horas. **A** Imágenes de contraste de fases, mostrando las alteraciones morfológicas inducidas por GW7674 1 μM y OEA 1 μM , cuando se compara con los controles. Barra de calibrado: 40 μm . Western blot y cuantificación de GAP-43 y MAP-2 en neuronas cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de GW7674 (**B**) u OEA (**C**). Las concentraciones de los agonistas están indicadas en la figura. En cada condición se utilizó como control la misma cantidad de vehículo, representada como un guión. Los dos agonistas indujeron un aumento en los niveles de las proteínas GAP-43 y MAP-2. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, cuando se compara con los controles (test *t* de Student).

4.3.5 Los efectos del ácido oleico y del agonista del PPAR α Wy14643 no son sinérgicos, ni aditivos

Para estudiar los posibles efectos aditivos o sinérgicos entre el ácido oleico y el agonista del PPAR α Wy14643, las neuronas se incubaron en presencia de ácido oleico 100 μ M, de Wy14643 10 μ M o de ácido oleico 100 μ M + Wy14643 10 μ M. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de Wy14643 no modifica el efecto del ácido oleico en la expresión de GAP-43 y MAP-2 (Figura 26).

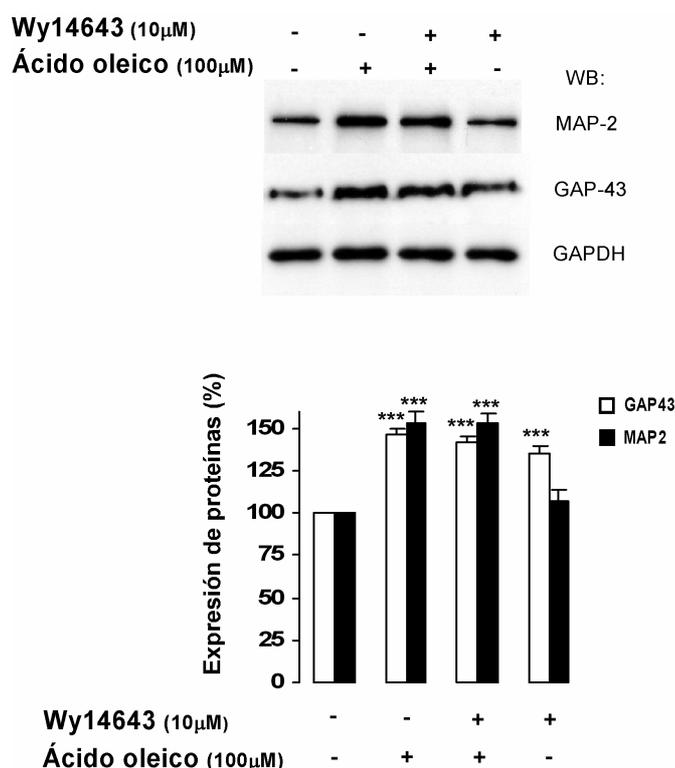


Figura 26. Los efectos del ácido oleico y del agonista del PPAR α Wy14643 no son sinérgicos ni aditivos. Western blot y cuantificación de GAP-43 y MAP-2 en neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico 100 μ M, de Wy14643 10 μ M, o de ácido oleico 100 μ M + Wy14643 10 μ M, durante 72 horas. El agonista Wy14643 no modifica el efecto del ácido oleico en la expresión de GAP-43 y MAP-2. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$, cuando se compara con los controles (test t de Student).

4.3.6 El ácido oleico activa PPAR α en neuronas en cultivo primario

Con objeto de conocer la capacidad del ácido oleico de activar PPAR α , se analizaron los niveles del gen de la lipoproteína lipasa (LPL), un conocido gen diana de PPAR α (Schoonjans et al. 1996).

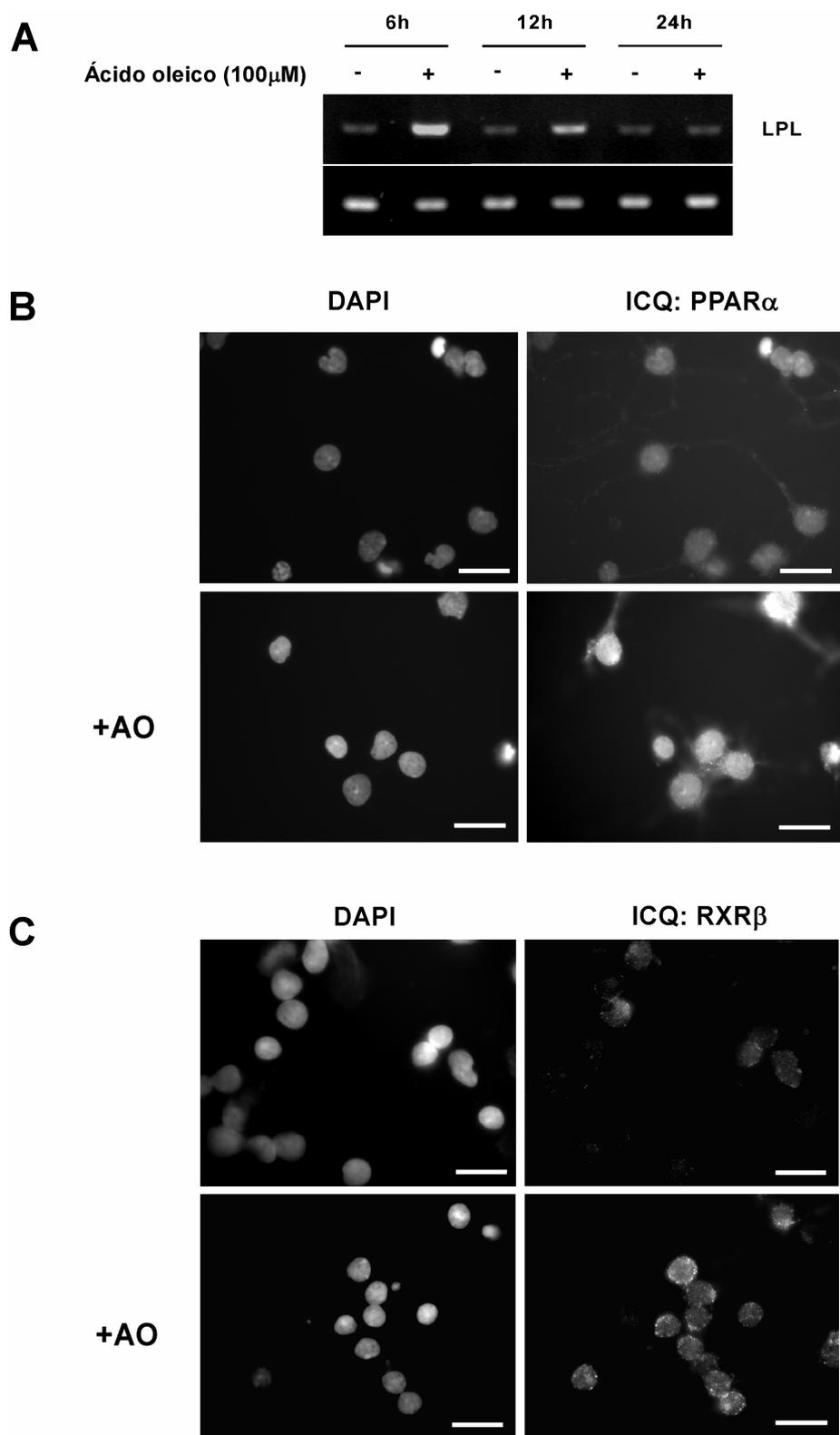


Figura 27. El ácido oleico incrementa los niveles del mRNA de la lipoproteína lipasa (LPL) y promueve la localización nuclear del PPAR α y del RXR β . Las neuronas de rata fueron cultivadas como se describe en "Material y Métodos". Las neuronas se incubaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M durante 6, 12, 24 y 72 horas. **A** Los niveles del mRNA de la LPL se analizaron por RT-PCR. Los niveles de mRNA de β -actina se utilizaron como control de carga. Inmunocitoquímica del PPAR α (**B**) y del RXR β (**C**) de neuronas cultivadas en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M durante 72 horas. El DNA nuclear se tiñó con DAPI. Barra de calibrado: 20 μ m.

Además, la localización nuclear de PPAR α y RXR β se monitorizó tras el tratamiento con ácido oleico. Los resultados muestran que el ácido oleico promueve un incremento transitorio en los niveles de LPL. Así, los niveles del mRNA de LPL aumentaron después de 6 y 12 horas de tratamiento y disminuyeron posteriormente (Figura 27 A). Además, el análisis por inmunocitoquímica mostró un aumento en la localización nuclear del PPAR α y del RXR β tras el tratamiento con el ácido oleico (Figura 27 B y C).

4.3.7 La proteína kinasa C está implicada en el efecto neurotrófico del ácido oleico y de OEA

Dado que en trabajos previos se demostró que la inhibición de la PKC prevenía el efecto neurotrófico del ácido oleico (Tabernero et al. 2001; Granda et al. 2003; Rodríguez-Rodríguez et al. 2004), en este trabajo decidimos estudiar la posible participación de la PKC en el efecto neurotrófico de los agonistas de PPAR α . Para ello, se utilizó como inhibidor específico de la PKC un péptido basado en el dominio pseudosustrato de la PKC, el péptido miristoilado myr- ψ PKC(20-28) (Eichholtz et al. 1993; Ward and O'Brian 1993). Los resultados muestran que, al igual que ocurría con el ácido oleico, el efecto de la OEA 1 μ M sobre la diferenciación neuronal se previno cuando la actividad de la PKC fue inhibida por la presencia del myr- ψ PKC(20-28) (Figura 28). Así, la incubación con ácido oleico 100 μ M u OEA 1 μ M indujo modificaciones morfológicas en las neuronas, como se muestra en las imágenes de contraste de fases. Estas modificaciones morfológicas no se observaron cuando la PKC fue inhibida por myr- ψ PKC(20-28) (Figura 28 A). Además, cuando la actividad de la PKC se encontraba inhibida por myr- ψ PKC(20-28), no se observaron alteraciones significativas en la expresión de GAP-43 por la presencia del ácido oleico o de la OEA (Figura 28 B).

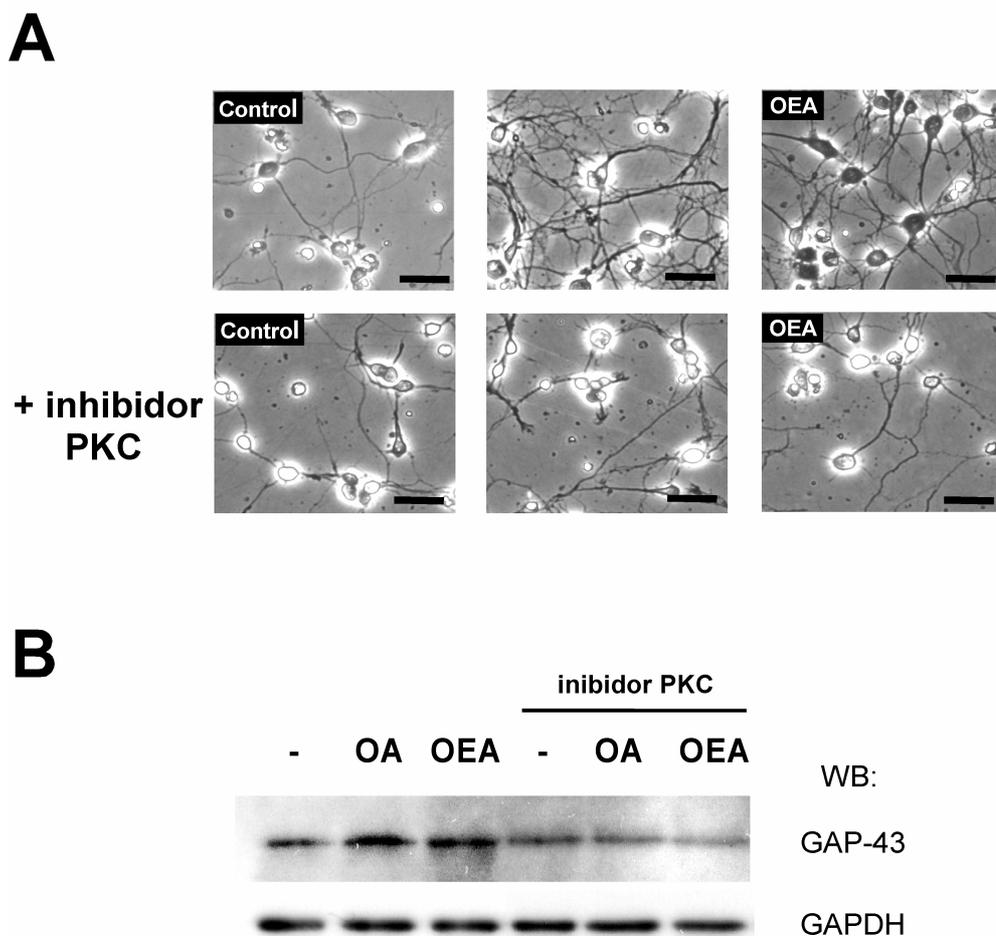


Figura 28. La PKC está implicada en el efecto neurotrófico del ácido oleico y de la OEA. Las neuronas se incubaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M u OEA 1 μ M durante 72 horas. Para inhibir la PKC, en los casos indicados, las células se preincubaron a 37°C durante 30 minutos en presencia de myr- ψ PKC(20–28) 50 μ M. El inhibidor se mantuvo a esta concentración a lo largo de todo el experimento. **A** Imágenes de contraste de fases, mostrando las alteraciones morfológicas inducidas por el ácido oleico 100 μ M y por la OEA 1 μ M, cuando se compara con los controles. El inhibidor de la PKC previno los efectos inducidos por el ácido oleico y por la OEA. Barra de calibrado: 20 μ m. **B** Western blot representativo de la expresión de GAP-43.

4.3.8 El silenciamiento de PPAR α previene la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico

Dado que los agonistas del PPAR α inducen la diferenciación neuronal y que el ácido oleico es capaz de activar el PPAR α , decidimos evaluar la participación del PPAR α en los efectos neurotróficos del ácido oleico. Para ello, se silenció el PPAR α mediante siRNA. En primer lugar, se optimizaron las condiciones de transfección de siRNA en neuronas en cultivo primario.

4.3.8.1 Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en neuronas en cultivo primario

Para determinar las condiciones de transfección de siRNA que permitirían obtener la mejor eficacia de silenciamiento proteico, las neuronas se transfectaron con concentraciones crecientes (50-100 nM) de un siRNA validado contra GAPDH y con distintas cantidades del agente de transfección (2 ó 3 μ L de Lipofectamina 2000 por mL de medio de cultivo). Los resultados muestran una fuerte reducción en la expresión de GAPDH en todas las condiciones probadas, en particular con 75 nM de siRNA y 3 μ L de Lipofectamina 2000 por mL de medio de cultivo (Figura 29), siendo estas condiciones las utilizadas en todos los experimentos posteriores.

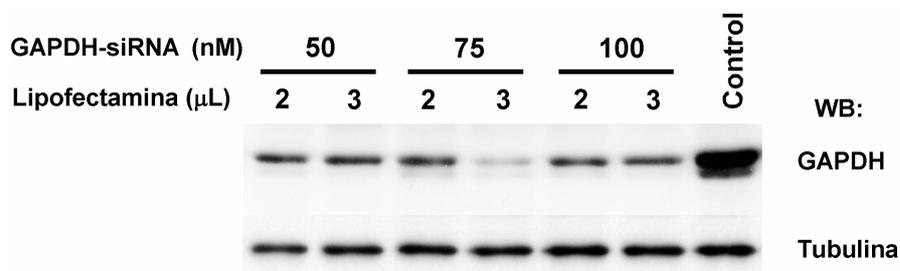


Figura 29. Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en neuronas. Las neuronas se transfectaron con cantidades crecientes de siRNA y distintas cantidades de Lipofectamina 2000. El Western blot de GAPDH muestra una reducción en la expresión de esta proteína. La expresión de la tubulina se utilizó como control de carga.

4.3.8.2 El silenciamiento de PPAR α previene la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico

Con objeto de evaluar la participación del PPAR α en los efectos neurotróficos del ácido oleico, se silenció el PPAR α mediante siRNA. Se utilizó como control una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana (designada NT-siRNA). Tras la transfección con siRNAs, las neuronas se incubaron durante 72 horas en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M. Como se puede observar en las imágenes de contraste de fases (Figura 30), la viabilidad celular no fue afectada por el proceso de transfección con NT-siRNA ni con siRNA específico para PPAR α (designado PPAR α -siRNA).

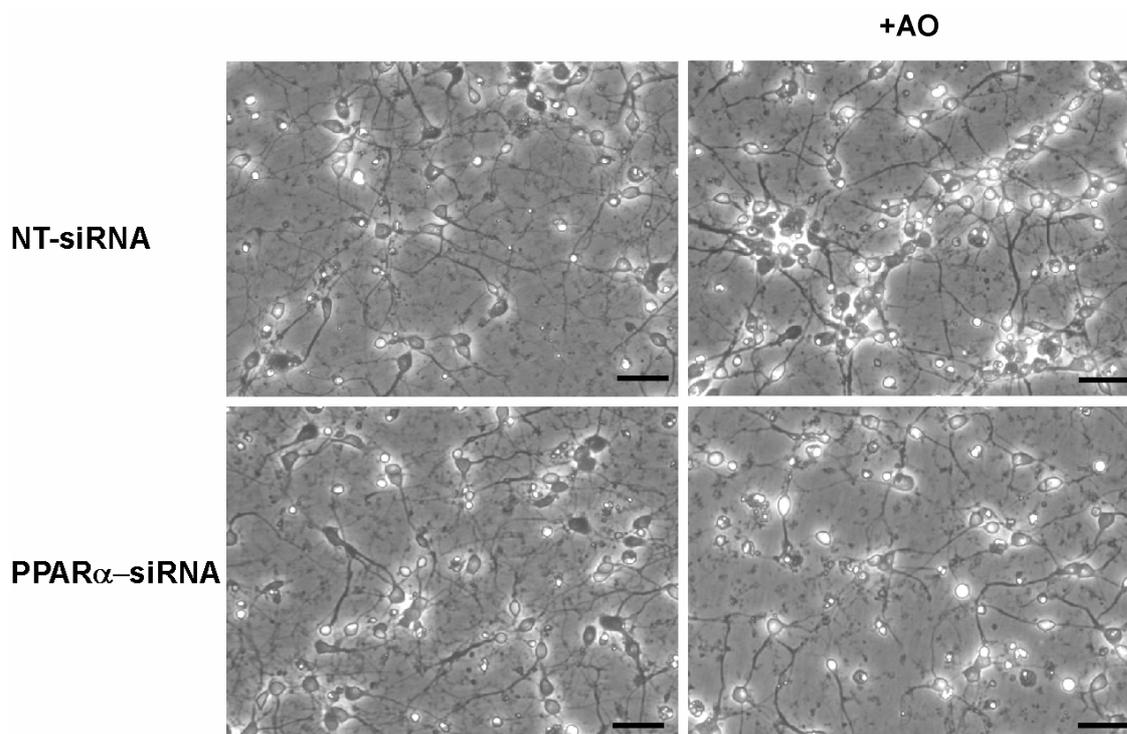


Figura 30. La viabilidad celular no se afecta tras la transfección con siRNA. Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA y con PPAR α -siRNA y, tras 8 horas, se incubaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M durante 72 horas. Las imágenes de contraste de fases muestran que la viabilidad celular no se afecta en ninguna condición. Además, las imágenes de contraste de fases muestran las alteraciones morfológicas inducidas por el ácido oleico, exclusivamente en las neuronas transfectadas con NT-siRNA. Barra de calibrado: 40 μ m.

A continuación, se monitorizaron los niveles del PPAR α durante el período de tiempo en el que se realizarían los experimentos de silenciamiento. Como se puede observar en la figura 31, la expresión del mRNA del PPAR α es constante desde las 6 horas hasta las 72 horas en neuronas en cultivo.

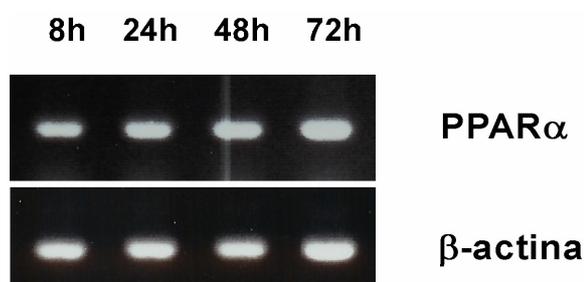
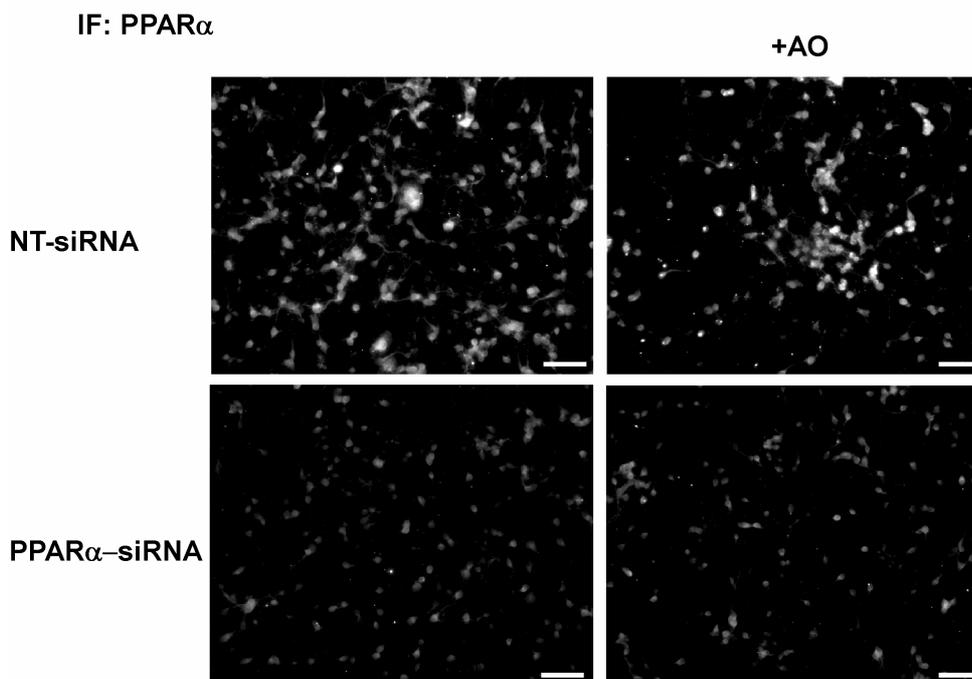


Figura 31. Expresión del mRNA del PPAR α en neuronas en cultivo primario durante las primeras 72 horas. Las neuronas de rata fueron cultivadas como se describe en “Material y Métodos”. Las neuronas se incubaron en ausencia de ácido oleico durante 6, 24, 48 y 72 horas, y se extrajo el RNA total. Los niveles de mRNA del PPAR α se analizaron por RT-PCR. Los niveles de mRNA de β -actina se utilizaron como control de carga.

Dado que la expresión del PPAR α se mostró constante durante el período de tiempo en el que se realizarían los experimentos de silenciamiento y que el proceso de transfección no afectaba la viabilidad celular, se silenció el PPAR α mediante siRNA y se analizó su expresión.

A



B

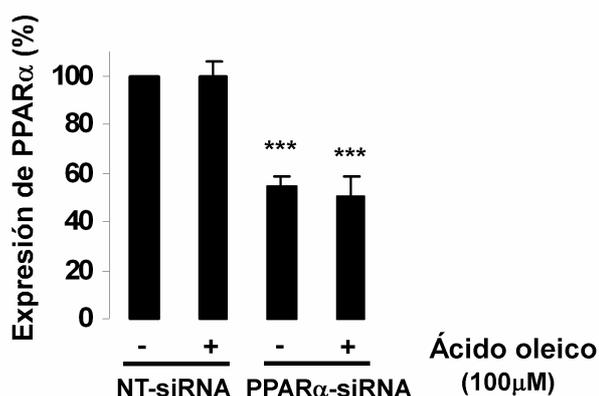


Figura 32. Silenciamiento del PPAR α en neuronas en cultivo primario. Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA y con PPAR α -siRNA y, tras 8 horas, se incubaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M durante 72 horas. **A** Inmunocitoquímica de PPAR α . Las imágenes de inmunofluorescencia muestran una reducción en la expresión del PPAR α en las células transfectadas con PPAR α -siRNA, cuando se compara con neuronas transfectadas con NT-siRNA. Barra de calibrado: 40 μ m. **B** Cuantificación de la expresión del PPAR α . Las imágenes de fluorescencia de las condiciones representadas en la figura 31 A se cuantificaron. Los resultados son medias \pm SEM de, al menos, 6 campos de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del control (NT-siRNA sin ácido oleico). *** $p < 0,001$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test *Tukey HSD*).

Para monitorizar las neuronas transfectadas, se utilizó siRNA marcado con Cy3, realizándose a continuación una inmunocitoquímica para la proteína diana (Figura 33). Los resultados muestran que la transfección con PPAR α -siRNA disminuyó significativamente la expresión del PPAR α (Figura 33, verde), cuando se compara con la situación control. Además, el ácido oleico no modificó la expresión del PPAR α , tanto en las células transfectadas con NT-siRNA como en las transfectadas con PPAR α -siRNA (Figura 32 A y B y figura 33).

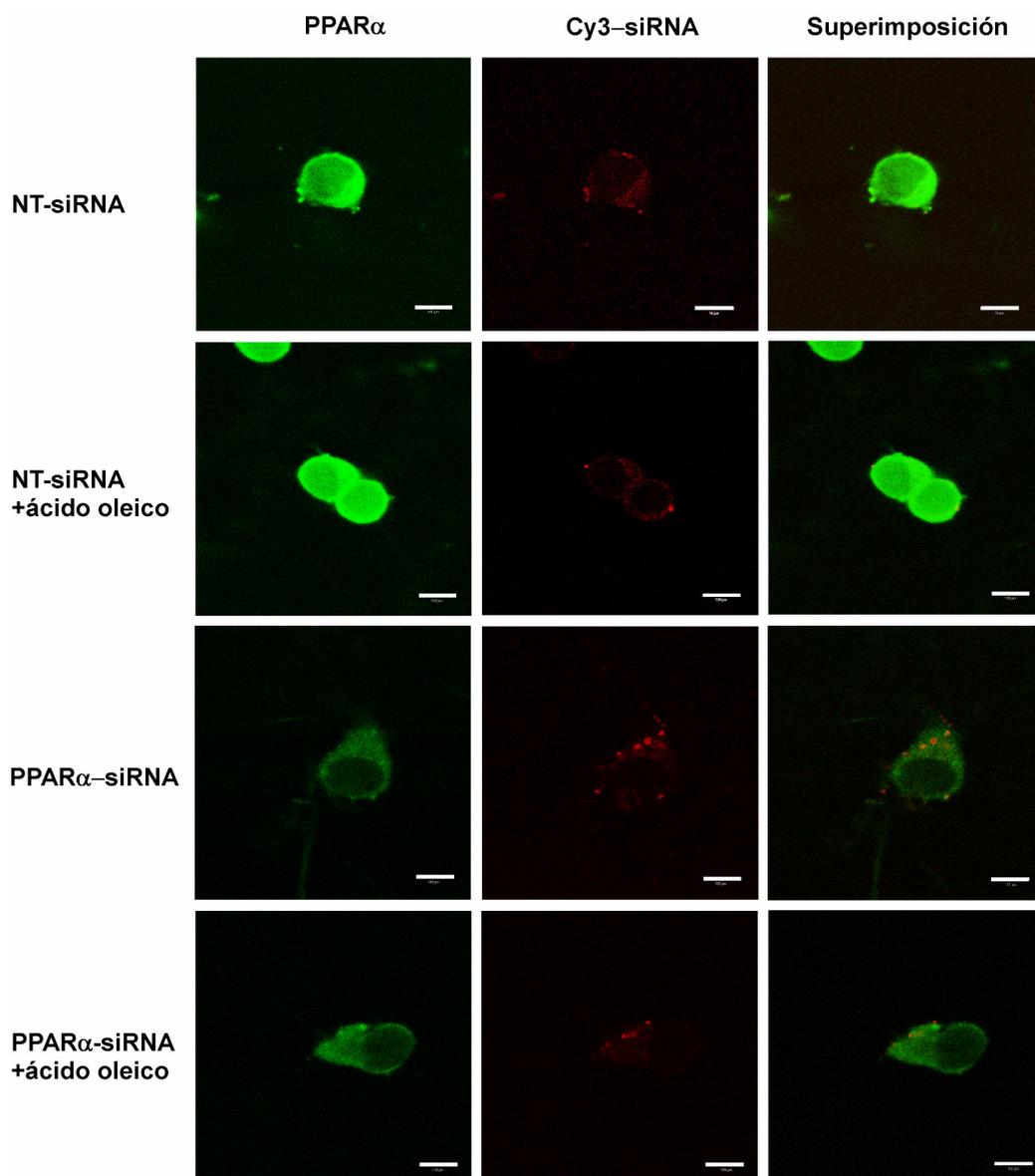


Figura 33. Silenciamiento del PPAR α en neuronas en cultivo primario. Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA o con PPAR α -siRNA y, tras 8 horas, se incubaron en ausencia o en presencia del ácido oleico 100 μ M durante 72 horas. Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica del PPAR α (verde) y para el siRNA marcado con Cy3 (rojo). Las imágenes de microscopía confocal muestran una reducción en la expresión de PPAR α en las neuronas transfectadas con siRNA marcado con Cy3, cuando se compara con las transfectadas con NT-siRNA marcado con Cy3. Barra de calibrado: 10 μ m.

Una vez silenciada la expresión del PPAR α , se quiso determinar si el ácido oleico podría inducir la diferenciación neuronal en estas circunstancias. Los resultados muestran que el ácido oleico indujo una diferenciación morfológica en las neuronas transfectadas con NT-siRNA, mientras que no se observó ningún cambio morfológico significativo en las neuronas cuyo PPAR α fue silenciado (Figura 30).

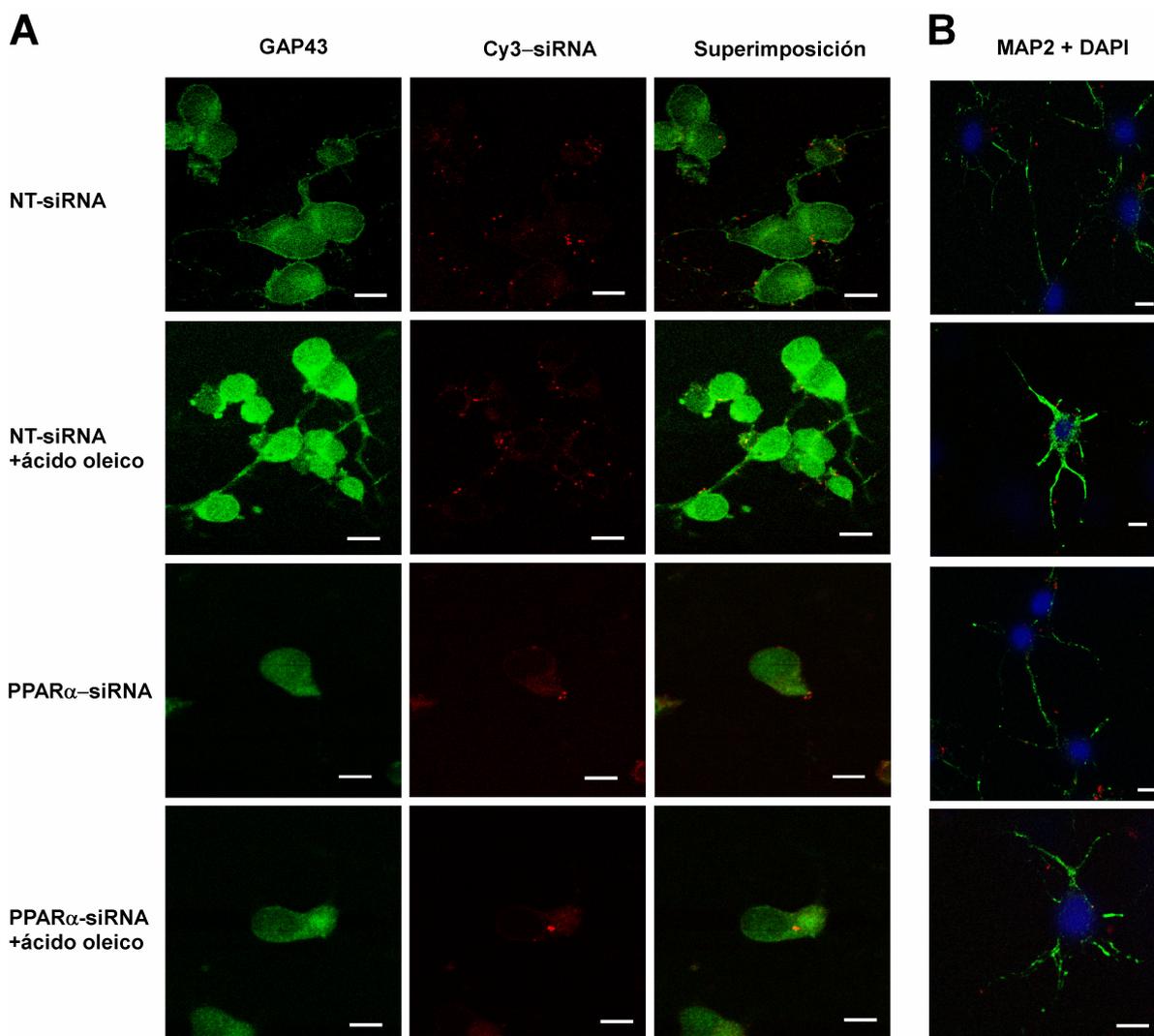


Figura 34. El silenciamiento del PPAR α inhibe el efecto del ácido oleico en la diferenciación neuronal. Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA y con PPAR α -siRNA y, tras 8 horas se incubaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M durante 72 horas. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de GAP-43 (verde) y del siRNA marcado con Cy3 (rojo). **B** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de MAP-2 (verde) y del siRNA marcado con Cy3 (rojo); se muestra sólo la superimposición. El DNA nuclear se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes de microscopía confocal muestran un incremento en la expresión de GAP-43 y MAP-2 promovido por el ácido oleico en las neuronas transfectadas con NT-siRNA marcadas con Cy3, pero no en las transfectadas con PPAR α -siRNA marcadas con Cy3. Barra de calibrado: 10 μ m.

La figura 34 muestra el aumento de la expresión de GAP-43 y de MAP-2 promovida por el ácido oleico en las neuronas transfectadas con NT-siRNA marcado con Cy3. Sin embargo, el aumento en la expresión de GAP-43 y MAP-2 no se verificó en las neuronas transfectadas con PPAR α -siRNA marcado con Cy3.

En las imágenes de mayor aumento de la inmunocitoquímica de GAP-43 se observó que la mayoría de las neuronas respondió de una forma similar al ácido oleico (Figura 35 A). De acuerdo con estos resultados, el análisis por *Western blot* reveló que el ácido oleico incrementó la expresión de GAP-43 y MAP-2 cerca del 46% y 55%, respectivamente, en las neuronas transfectadas con NT-siRNA. Sin embargo, el efecto del ácido oleico sobre la expresión de GAP-43 y MAP-2 se redujo notablemente en las neuronas cuyo PPAR α estaba silenciado (una disminución cercana al 48% y 52%, respectivamente; Figura 35 B). Esta reducción fue coherente con la eficacia del silenciamiento del PPAR α (cerca del 50%; Figura 32 B). Se debe mencionar que el silenciamiento del PPAR α , por sí solo, modificó la diferenciación neuronal, a juzgar por la morfología (Figura 30) y por los niveles de GAP-43 y MAP-2 (Figura 35 B), cuando se compara con los controles.

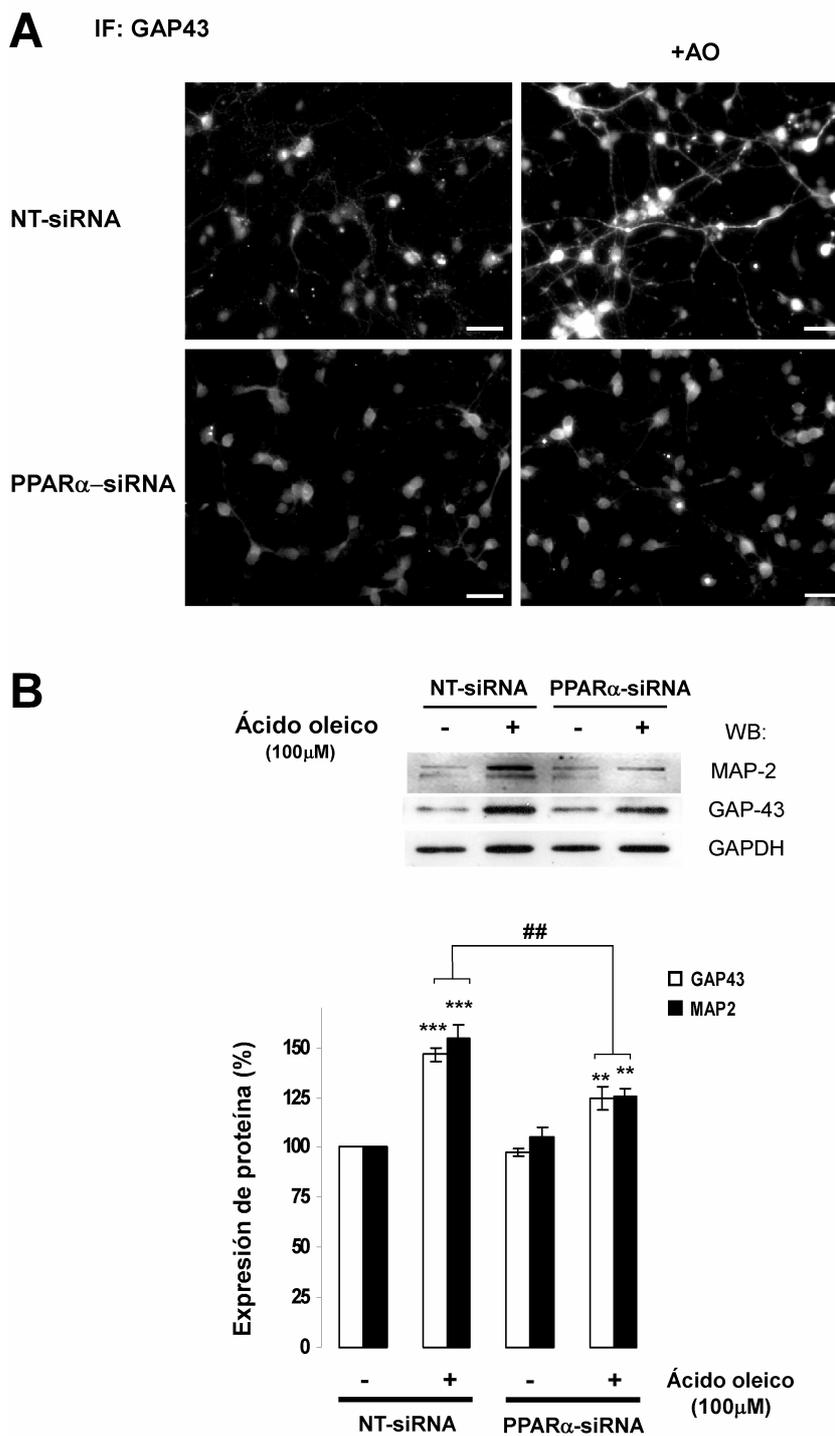


Figura 35. El silenciamiento del PPAR α inhibe el efecto del ácido oleico en la diferenciación neuronal. Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA o con PPAR α -siRNA y tras, 8 horas se incubaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M durante 72 horas. **A** Inmunocitoquímica de GAP-43, mostrando que el ácido oleico promueve el aumento de la expresión de GAP-43 en la mayoría de las neuronas transfectadas con NT-siRNA pero no en las transfectadas con PPAR α -siRNA. Barra de calibrado: 30 μ m. **D** Western blot y cuantificación de GAP-43 y MAP-2 en neuronas transfectadas con NT-siRNA o PPAR α -siRNA, en ausencia o en presencia de ácido oleico. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, diferencias significativas cuando se compara con la ausencia de ácido oleico (test t de Student); ## $p < 0,01$ diferencias significativas cuando se compara con NT-siRNA (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

5. Discusión

5.1 La megalina es el receptor de la albúmina en astrocitos, mediando su internalización a través de endocitosis dependiente de caveolas

El descubrimiento de que la albúmina se reabsorbía en el túbulo proximal renal indicaba que el único mecanismo capaz de mediar este proceso era la endocitosis mediada por receptor, puesto que ni su tamaño ni el gradiente entre el túbulo y la sangre permitían la reabsorción pasiva de la albúmina por las uniones estrechas (Tojo and Endou 1992). En este sentido, se identificó a la megalina como el receptor de la albúmina en las células del túbulo proximal de rata (Cui et al. 1996). La megalina es una glicoproteína de membrana, que tiene múltiples ligandos macromoleculares, incluyendo la albúmina (Mayor and Pagano 2007).

Por otro lado, varias líneas de investigación han sugerido que la internalización de la albúmina en los astrocitos era mediada por un receptor glicoproteico, dado que este proceso era sensible a la temperatura y se inhibía por PAO (un inhibidor de la endocitosis mediada por receptor), así como por el tratamiento breve con proteasas o con SBA (una lectina que une específicamente residuos de glicoproteínas) (Tabernero et al. 2002a). Sin embargo, se desconocía todavía la naturaleza del receptor, así como el tipo de endocitosis empleada en los astrocitos.

En este trabajo, hemos descubierto que el receptor para la albúmina en astrocitos es la megalina. Así, los astrocitos en cultivo primario expresan la megalina (Figura 2), que colocaliza con la albúmina en la membrana plasmática (Figura 4). De hecho, nuestros resultados muestran que la megalina es necesaria para la unión de la albúmina a la membrana de los astrocitos y para su posterior internalización. Así, cuando la expresión de la megalina se silenció por siRNA, la capacidad de la albúmina para unirse a la membrana de los astrocitos se redujo significativamente (Figura 7). Además, la internalización de la albúmina disminuyó notablemente en los astrocitos silenciados en megalina (Figura 8). Estos resultados indican claramente que la megalina es el receptor para la endocitosis de la albúmina en los astrocitos. De hecho, la existencia de una relación entre los tejidos donde se expresa la megalina y los tejidos donde ocurre la captación de albúmina por endocitosis mediada por receptor (Schnitzer and Oh 1994; Christensen et al. 1998; Schubert et al. 2001; Singh et al. 2003; Carro et al. 2005) parece indicar que la captación de albúmina es, efectivamente, mediada por la megalina y no por las glicoproteínas gp30 ó gp60, como había postulado Cessac-Guillemet (Cessac-Guillemet et al. 1996). De hecho, se ha sugerido que gp30 y gp60 sean productos de degradación de la cubilina, una proteína que une albúmina y que se coexpresa con la megalina en algunos tejidos, puesto

que anticuerpos contra cubilina también reconocen proteínas con 30 y 60kDa (Birn et al. 2000).

La existencia de un receptor específico para la albúmina en el cerebro, cuya expresión se encuentra regulada durante el desarrollo, se ha postulado durante décadas, aunque no se ha identificado (Laborda et al. 1989; Habgood et al. 1992; Ohsugi et al. 1992). En este trabajo mostramos que la expresión de la megalina en el cerebro está regulada durante el desarrollo (Figura 3), siendo, probablemente, responsable de la elevada concentración de albúmina encontrada en el cerebro durante el periodo de vida posnatal (Mollgard et al. 1979; Trojan and Uriel 1979; Dziegielewska et al. 1980; Mollgard et al. 1988; Velasco et al. 2003). La expresión de la megalina durante el periodo de vida posnatal se ha corroborado mediante qPCR (datos no mostrados; Bento-Abreu, 2008, in press). Además, nuestro grupo ha mostrado previamente que, durante el desarrollo cerebral, el perfil de expresión de la albúmina coincide con el de la SCD-1, la enzima limitante en la síntesis del ácido oleico, y con el de GAP-43 y MAP-2, marcadores de la diferenciación axonal y dendrítica, respectivamente (Velasco et al. 2003). En este trabajo mostramos que el perfil de expresión de la megalina coincide con los mencionados previamente, sugiriendo que la megalina se requiere para la entrada de la albúmina en los astrocitos y, consecuentemente, para iniciar la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico.

En este sentido, se ha descrito que el ratón transgénico deficiente en megalina presenta severas anomalías en el desarrollo neural, incluyendo la ausencia de los bulbos olfatorios, la ausencia del cuerpo caloso y la fusión de los hemisferios cerebrales, todas ellas características del síndrome de la holoprosencefalia (Willnow et al. 1996; Spoelgen et al. 2005). En conjunto, este fenotipo indica que la megalina es esencial para la correcta formación del sistema nervioso y, en general, para el desarrollo (Assemat et al. 2005). Además, el papel de la megalina en el desarrollo está reforzado por su interacción con la *Sonic hedgehog* (Shh), una proteína que actúa como morfógeno, controlando la formación del SNC, el sistema pulmonar, el tracto reproductivo, el ojo y otros órganos. El hecho de que el ratón *knockout* de Shh presente, como el de megalina, un síndrome holoprosencefálico y que la expresión de Shh se pierda en el día E10,5 en el ratón *knockout* de la megalina, así como que la megalina funcione como receptor de Shh (McCarthy et al. 2002), parece indicar que la megalina tiene un papel crucial en el desarrollo cerebral dirigido por Shh (McCarthy and Argraves 2003). Sin embargo, los mecanismos que regulan el modo de acción de la megalina y de la Shh durante el desarrollo no se encuentran definidos. Se podría especular que el cese del paso de la albúmina por los astrocitos, provocado por la ausencia de megalina, podría impedir la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico y que esta deficiencia podría contribuir a las

anormalidades del desarrollo neural. Se debe mencionar que la megalina es un receptor multiligando y que, de este modo, otros ligandos pueden estar implicados en el síndrome de la holoprosencefalia descrito en los ratones deficientes en megalina (McCarthy and Argraves 2003).

La endocitosis de la albúmina es diferente dependiendo del tipo de tejido. Así, se ha descrito que la albúmina puede ser internalizada por endocitosis mediada por caveolas en células endoteliales (endotelio pulmonar, endotelio del plexo coroideo) y fibroblastos humanos (Schnitzer and Oh 1994; Schubert et al. 2001; Singh et al. 2003; Carro et al. 2005), por endocitosis mediada por clatrina en las células del túbulo proximal renal o del epitelio mamario (Christensen et al. 1998; Monks and Neville 2004) y por un mecanismo independiente de clatrina y caveolina (dependiente de RhoA) en las células CHO (*Chinese hamster ovary*) (Cheng et al. 2006). Del mismo modo, la megalina está implicada en la internalización de la albúmina tanto por endocitosis mediada por clatrina como por caveolas (Christensen et al. 1998; Carro et al. 2005). En los astrocitos, se desconoce el mecanismo de endocitosis que media la internalización de la albúmina.

En este trabajo hemos demostrado que la endocitosis de la albúmina en los astrocitos está mediada por caveolas y no por vesículas recubiertas de clatrina. Así, pese a que los astrocitos expresan caveolina-1, caveolina-2 y clatrina (Figura 9), la albúmina solo interacciona con las proteínas constituyentes de las caveolas, tanto a nivel de la membrana (Figura 10 A-E) como tras su internalización (Figura 11 A y C-E). De hecho, estudios de microscopía electrónica muestran que los complejos oro-BSA están presentes solamente en las caveolas y no en las vesículas recubiertas de clatrina (Figura 12). Del mismo modo, la megalina, en presencia de albúmina, interacciona con la caveolina-1 y la caveolina-2, pero no con la clatrina, tanto en la membrana (Figura 10 C y F) como tras la internalización (Figura 11 B). Así, nuestros resultados muestran que la caveolina-1 se requiere para la unión de la albúmina a la membrana de los astrocitos (a su receptor) y posterior internalización. De hecho, cuando la expresión de la caveolina-1 se silencia, la unión a la membrana y la internalización de la albúmina en los astrocitos se reduce significativamente (Figura 14 A y figura 15, respectivamente). Sin embargo, la caveolina-2 no es, aparentemente, esencial para la unión de la albúmina a la membrana, aunque sí colabora en la internalización de la albúmina en los astrocitos. Así, el silenciamiento de la caveolina-2 sólo afecta a la internalización de la albúmina, reduciendo significativamente este proceso (Figura 14 B y figura 16). En este sentido, aunque la caveolina-2 modula el ensamblaje de la caveolina-1 en las caveolas y ambas forman un complejo estable heterooligomérico (Figura 10 C-D y figura 11 C-D), la formación de las caveolas sólo depende de

la oligomerización de la caveolina-1 (Razani et al. 2002b; Williams and Lisanti 2004). Así, nuestros resultados parecen indicar que la caveolina-1 es la responsable del reclutamiento de la megalina y que la caveolina-2 participa en la formación e internalización de la caveola. De hecho, la interacción de la megalina con la caveolina-2 en la membrana es, comparativamente, menor que con la caveolina-1 (Figura 10 F). Por último, nuestros resultados muestran que la clatrina no participa ni en la unión ni en la internalización de la albúmina en los astrocitos, puesto que su silenciamiento no modifica significativamente estos procesos (Figura 14 C y figura 17). Sin embargo, la endocitosis mediada por clatrina es un proceso activo en los astrocitos, dado que la internalización de la transferrina (un marcador de este tipo de endocitosis (Puri et al. 2001)) se reduce prácticamente en su totalidad por el fármaco CPZ (Figura 18 A), un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina (Wang et al. 1993). Sin embargo, este inhibidor no modificó la internalización de la albúmina (Figura 18 B y C), corroborando que la endocitosis de la albúmina en los astrocitos es un proceso independiente de clatrina.

Los procesos de endocitosis dependientes de caveolinas y de clatrina son independientes. Así, nuestros resultados muestran que en la membrana no hay interacción entre estas proteínas (Figura 10 C-E). Sin embargo, durante la internalización de la albúmina, se observó la interacción de la clatrina con las caveolinas (Figura 11 C y D), aunque estos resultados no se confirmaron en los experimentos complementarios (Figura 11 E). Tanto en la endocitosis mediada por clatrina como por caveolinas, las vesículas internalizadas se funden con el endosoma temprano en un proceso dependiente de la GTPasa Rab5 y desde este compartimento son recicladas a la membrana (Parton and Simons 2007). Es posible que vesículas de clatrina con su recubrimiento parcialmente dissociado se fundan con el endosoma temprano y que se unan a las secuencias señal NPXY (para la endocitosis mediada por clatrina) de la megalina, interactuando, así, con las caveolinas en este orgánulo intracelular. Sin embargo, nuestros resultados en este apartado son insuficientes y sólo nos permiten especular respecto a esta interacción.

Se debe mencionar que en este trabajo no se estudió la participación de la caveolina-3 en la endocitosis de la albúmina en los astrocitos puesto que varios estudios han demostrado que las funciones de las caveolinas 1 y 3 se solapan (Galbiati et al. 2001; Williams and Lisanti 2004).

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que la albúmina estimula, en los astrocitos, la síntesis y liberación al espacio extracelular del factor neurotrófico ácido oleico (Taberero et al. 2001 Rodríguez-Rodríguez, 2004). Este proceso requiere la internalización de la albúmina en los astrocitos, seguida de un proceso de transcitosis que

incluye el paso de la albúmina por el retículo endoplasmático y por el Golgi (Medina and Tabernero 2002; Tabernero et al. 2002a). Es precisamente en el RE donde se sintetiza el ácido oleico y donde la albúmina lleva a cabo la activación de la SCD-1 a través del SREBP-1. En este trabajo confirmamos el paso de la albúmina por el Golgi y el RE, mediante inmunocitoquímica contra marcadores de estos orgánulos intracelulares, como son TGN38 y GRP78BiP, respectivamente (Figura 19). Además, nuestro grupo ha mostrado recientemente que la megalina, la caveolina-1 y la caveolina-2, pero no la clatrina, se requieren para el efecto de la albúmina en la síntesis y liberación del ácido oleico (datos no mostrados; Bento-Abreu, 2008, *in press*). Así, tras el análisis por HPLC, se verificó que cuando la expresión de la megalina, de la caveolina-1 y de la caveolina-2 se encontraban silenciadas por siRNA (65%, 64% y 62%, respectivamente), la síntesis y liberación del ácido oleico promovida por la albúmina se encontraba fuertemente reducida (50%, 53% y 46%, respectivamente). Sin embargo, el silenciamiento de la clatrina no modificó significativamente (reducción del 2%) la síntesis y liberación del ácido oleico promovida por la albúmina (datos no mostrados; Bento-Abreu, 2008, *in press*). Este estudio funcional corrobora los resultados presentados en este trabajo, implicando a las caveolas en la endocitosis de la albúmina mediada por megalina en los astrocitos. Así, este evento puede ser un paso clave en el desarrollo cerebral, pues estimula la síntesis del ácido oleico, que, a su vez, promueve la diferenciación neuronal. De este modo, estos resultados indican otra posible función de la megalina durante el desarrollo del SNC, la participación en la endocitosis de albúmina mediada por caveolas para sintetizar el factor neurotrófico ácido oleico.

Además de tener un papel en el desarrollo cerebral, la albúmina se utiliza para el tratamiento del infarto cerebral agudo, encontrándose en la fase III de ensayos clínicos (Ginsberg et al. 2006; Palesch et al. 2006). Por otro lado, se ha demostrado que el colesterol y los glicosfingolípidos exógenos juegan un papel importante en la regulación de la endocitosis por caveolas. De hecho, la incubación de fibroblastos humanos con colesterol y glicosfingolípidos estimula la endocitosis de albúmina por caveolas (Sharma et al. 2004). De esta forma, sería tentador especular que la utilización de colesterol o glicosfingolípidos conjuntamente con la albúmina podría mejorar la eficacia del tratamiento del infarto cerebral agudo.

5.2 El PPAR α es el receptor del ácido oleico en neuronas

Nuestro grupo ha mostrado previamente que el ácido oleico sintetizado por los astrocitos actúa como factor neurotrófico para las neuronas, induciendo la expresión de las proteínas marcadoras del crecimiento axonal y dendrítico, GAP-43 y MAP-2, respectivamente (Tabernero et al. 2001; Tabernero et al. 2002a). Pese a que el efecto neurotrófico del ácido oleico está caracterizado, la naturaleza del receptor implicado en este efecto neurotrófico se desconocía. Dado que se ha descrito al ácido oleico como un ligando natural y activador de los factores de transcripción de la familia de receptores nucleares PPAR, quisimos dilucidar si alguna isoforma de los PPARs estaba implicada en el efecto neurotrófico del ácido oleico.

En este trabajo demostramos que, aunque las tres isoformas de los PPARs se expresan en neuronas en cultivo primario (Figura 21), sólo los agonistas del PPAR α promueven la diferenciación neuronal. Así, mientras los agonistas del PPAR β y del PPAR γ no modifican la morfología neuronal ni la expresión de los marcadores de la diferenciación neuronal GAP-43 y MAP-2 (Figura 22), los agonistas del PPAR α Wy14643, GW7647 y OEA sí inducen cambios en la morfología neuronal, tales como el aumento del número y tamaño de las neuritas (Figura 24 A y 25 A). Además, los agonistas del PPAR α promueven el aumento de los marcadores de diferenciación axonal y dendrítica, GAP-43 y MAP-2, respectivamente, indicando que la activación del PPAR α puede mediar en la diferenciación neuronal (Figura 24 B y 25 B y C). La presencia del PPAR α en el SNC y, en particular, en neuronas se ha descrito previamente (Kainu et al. 1994; Cullingford et al. 1998; Cimini et al. 2005). Además, el PPAR α ha sido implicado en la prevención de la muerte celular neuronal y de la pérdida de la red neurítica inducida por el péptido β -amiloide (Santos et al. 2005), así como en la reducción de las consecuencias neurológicas deletéreas de un infarto (Deplanque et al. 2003). A pesar de que varios trabajos han mostrado que el PPAR α puede estar implicado en la neuroprotección, la primera evidencia que sugiere un papel del PPAR α en la diferenciación neuronal se presenta en este trabajo. Estudios previos han mostrado un papel de otra isoforma, el PPAR γ , en la diferenciación neuronal, aunque el papel de este receptor no está, todavía, claro. Así, mientras que Park y cols (2004) muestran que los agonistas del PPAR γ estimulan la diferenciación de células embrionarias del mesencéfalo en neuronas dopaminérgicas, Wada y cols (2006) proponen que la activación del PPAR γ por sus agonistas inhibe la diferenciación de células embrionarias neurales en neuronas.

Es necesario mencionar que los efectos neurotróficos inducidos por agonistas del PPAR α , así como los experimentos con agonistas del PPAR β y del PPAR γ , se han realizado en presencia de albúmina en el medio de incubación. Inicialmente, los experimentos con el agonista del PPAR α , Wy14643, se realizaron en ausencia de albúmina y pese a que no se encontraron cambios significativos en la expresión de las proteínas marcadoras GAP-43 y MAP-2 (Figura 23 B), el tratamiento con Wy14643 10 μ M sí indujo ligeras alteraciones morfológicas (Figura 23 A). La existencia de un receptor para la albúmina en los astrocitos, la megalina, sugiere la posibilidad de existencia de un receptor para la albúmina en las neuronas, responsable de la endocitosis del complejo albúmina-ácido oleico. Del mismo modo que une con elevada afinidad ácidos grasos (Spector and Fletcher 1978), hemos postulado que la albúmina uniría el agonista Wy14643, formando un complejo, el cual sería endocitado por las neuronas de la misma forma que el complejo albúmina-ácido oleico. Efectivamente, el agonista Wy14643, así como los demás agonistas del PPAR α utilizados, indujeron la diferenciación neuronal en presencia de albúmina, como ya se ha mencionado. Estos resultados refuerzan la existencia de un receptor de albúmina en la membrana de las neuronas, responsable de la endocitosis del ácido oleico.

Varios autores han publicado que el ácido oleico podría ser un ligando del PPAR α (Gottlicher et al. 1992; Kliewer et al. 1997; Hostetler et al. 2005). En este trabajo, mostramos que la presencia del ácido oleico induce la localización nuclear del PPAR α y del RXR β y aumenta los niveles del mRNA de la LPL, un gen diana del PPAR α (Figura 27), sugiriendo que el ácido oleico activa PPAR α en neuronas en cultivo primario. Además, el efecto neurotrófico de los agonistas del PPAR α y del ácido oleico es muy similar y sus efectos no son aditivos, sugiriendo una vía común para todos ellos (Figura 26). De este modo, nos hemos centrado en el PPAR α como el posible receptor para el efecto neurotrófico del ácido oleico. Los resultados muestran que el efecto del ácido oleico está significativamente reducido en las neuronas en que la expresión del PPAR α se silenció por siRNA. De hecho, el efecto del ácido oleico en la morfología neuronal y en la expresión de GAP-43 y MAP-2 disminuyó en las neuronas después del silenciamiento del PPAR α (Figuras 30, 34 y 35). Aunque el silenciamiento del PPAR α previno los efectos de los agonistas en la diferenciación neuronal, nuestros resultados muestran que el silenciamiento de este factor de transcripción, *per se*, no modifica la diferenciación neuronal (Figura 30 y figura 35 B).

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que el PPAR α se requiere para el efecto neurotrófico del ácido oleico y sugieren que el PPAR α puede ser un receptor nuclear para el ácido oleico en neuronas. Como el PPAR α , una vez activado, actúa como factor de

transcripción de varios genes diana, se puede especular que el PPAR α inicia una cascada de señalización que conduce a la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico.

Se debe mencionar que la actividad del PPAR α puede estar regulada por la proteína quinasa C a través de residuos fosforilables. De hecho, la inhibición de la actividad de la PKC induce una disminución en la actividad transcripcional del PPAR α (Blanquart et al. 2004). En concordancia, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que la PKC está implicada en el efecto neurotrófico del ácido oleico puesto que su inhibición suprime los efectos neurotróficos del ácido oleico (Tabernerero et al. 2001; Granda et al. 2003; Rodríguez-Rodríguez et al. 2004). En este trabajo mostramos que, al igual que el ácido oleico, el efecto neurotrófico del agonista del PPAR α , OEA, se previno por la inhibición de la PKC (Figura 28), sugiriendo una relación cruzada entre estas vías de señalización en la diferenciación neuronal.

Las funciones clásicas atribuidas a los PPARs son la regulación del metabolismo lipídico y el control de la diferenciación adipocítica. Sin embargo, varios estudios revelan que estos receptores también juegan un papel importante en aterosclerosis, inflamación, inmunidad y cáncer (Desvergne and Wahli 1999; Kersten et al. 2000; Daynes and Jones 2002; Desvergne et al. 2004; Evans et al. 2004; Grommes et al. 2004; Michalik et al. 2004; Zhang and Chawla 2004). En este trabajo proponemos una nueva función para el PPAR α como receptor para el efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas, expandiendo todavía más el rango de funciones atribuidas a esta familia de factores de transcripción.

Conclusión primera: El receptor multiligando megalina ó LRP-2 se expresa en astrocitos en cultivo primario. Además, su expresión en el cerebro *in vivo* está regulada durante el desarrollo postnatal, alcanzando sus niveles más altos tras el nacimiento y disminuyendo a partir de la primera semana.

Conclusión segunda: La megalina colocaliza con la albúmina en la membrana plasmática de los astrocitos. Dado que el silenciamiento de la megalina reduce la capacidad de la albúmina para unirse a la membrana e internalizarse, se puede concluir que la megalina es el receptor de la albúmina en los astrocitos.

Conclusión tercera: En los astrocitos, ni la albúmina ni la megalina interactúan con la clatrina. De hecho, el silenciamiento de la clatrina o su inhibición no modifican el proceso de internalización de la albúmina, lo que sugiere que la endocitosis de albúmina en astrocitos no se lleva a cabo por vesículas recubiertas de clatrina.

Conclusión cuarta: Tanto la albúmina como la megalina interactúan con las proteínas constituyentes de las caveolas, caveolina-1 y caveolina-2. El silenciamiento de la caveolina-1 reduce significativamente la unión y la internalización de albúmina en los astrocitos, mientras que el silenciamiento de la caveolina-2 sólo reduce la internalización. En conjunto, estos resultados indican que la endocitosis de la albúmina en astrocitos se lleva a cabo a través de caveolas.

Conclusión quinta: Las neuronas en cultivo primario expresan las tres isoformas de los receptores nucleares y factores de transcripción PPARs. Mientras que los agonistas del PPAR β y del PPAR γ no modifican la diferenciación neuronal, los agonistas del PPAR α inducen la diferenciación neuronal caracterizada por cambios en la morfología y por el aumento de la expresión de los marcadores de diferenciación axonal y dendrítica, GAP-43 y MAP-2, respectivamente.

Conclusión sexta: El ácido oleico activa la expresión de LPL, uno de los genes diana del PPAR α . Además, promueve la translocación del RXR al núcleo. Estos resultados indican que el ácido oleico activa el PPAR α en las neuronas en cultivo primario.

Conclusión séptima: Los efectos del ácido oleico y de los agonistas del PPAR α sobre la diferenciación neuronal no son sinérgicos ni aditivos, indicando una vía común para todos ellos. De hecho, la inhibición de la PKC impide la diferenciación neuronal promovida por

los agonistas del PPAR α o por el ácido oleico, indicando que la PKC forma parte de esta vía de señalización.

Conclusión octava: El silenciamiento del PPAR α previene la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico, lo que sugiere que el PPAR α es el receptor del ácido oleico para su efecto neurotrófico en la diferenciación neuronal.

Conclusión Final

En este trabajo hemos aportado la descripción de dos receptores claves para el diálogo molecular entre neuronas y glía durante el desarrollo postnatal del SNC. Así, la megalina media la endocitosis caveolar de la albúmina en los astrocitos, paso clave para la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico. Por su parte el PPAR α media el efecto neurotrófico que el ácido oleico promueve en las neuronas.

7. Bibliografía

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D. (1996) *Biología Molecular de la Célula*. Garland Publishing, Inc., Barcelona.
- Alvarez-Buylla A. and Garcia-Verdugo J. M. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* **22**, 629-634.
- Aminoff M., Carter J. E., Chadwick R. B., Johnson C., Grasbeck R., Abdelaal M. A., Broch H., Jenner L. B., Verroust P. J., Moestrup S. K., de la Chapelle A. and Krahe R. (1999) Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nature genetics* **21**, 309-313.
- Anderson H. A., Chen Y. and Norkin L. C. (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular biology of the cell* **7**, 1825-1834.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. P. and Haydon P. G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**, 208-215.
- Arias C., Becerra-Garcia F., Arrieta I. and Tapia R. (1998) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus in vivo. *Exp Neurol* **153**, 242-254.
- Assemat E., Vinot S., Gofflot F., Linsel-Nitschke P., Illien F., Chatelet F., Verroust P., Louvet-Vallee S., Rinninger F. and Kozyraki R. (2005) Expression and role of cubilin in the internalization of nutrients during the peri-implantation development of the rodent embryo. *Biology of reproduction* **72**, 1079-1086.
- Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J. P., Staels B., Auwerx J., Laville M. and Vidal H. (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 1319-1327.
- Austin C. P. and Cepko C. L. (1990) Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development (Cambridge, England)* **110**, 713-732.
- Ávila J., Dominguez J. and Diaz-Nido J. (1994) Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *The International journal of developmental biology* **38**, 13-25.
- Bar-Or D., Rael L. T., Lau E. P., Rao N. K., Thomas G. W., Winkler J. V., Yukl R. L., Kingston R. G. and Curtis C. G. (2001) An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. *Biochemical and biophysical research communications* **284**, 856-862.
- Barak Y., Nelson M. C., Ong E. S., Jones Y. Z., Ruiz-Lozano P., Chien K. R., Koder A. and Evans R. M. (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular cell* **4**, 585-595.
- Barbin G., Pollard H., Gaiarsa J. L. and Ben-Ari Y. (1993) Involvement of GABA_A receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **152**, 150-154.
- Barish G. D., Narkar V. A. and Evans R. M. (2006) PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation* **116**, 590-597.
- Baskin D. G., Figlewicz D. P., Woods S. C., Porte Jr. D. and Dorsa D. M. (1987) Insulin in the brain. *Ann. Rev. Physiol.* **49**, 335-347.
- Bayer S. A. (1985) The development of the central nervous system, in *Development Neurochemistry* (Wiggins R. C., McCandless D. W. and Enna S. J., eds), pp 18-56. University of Texas Press, Austin.
- Bayer S. A. (1995) Neurogenesis and Neuronal Migration, in *The Rat Nervous System*. (Paxinos G., ed.), pp 1041-1076. Academic Press, Sydney.

- Beattie E. C., Carroll R. C., Yu X., Morishita W., Yasuda H., von Zastrow M. and Malenka R. C. (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature neuroscience* **3**, 1291-1300.
- Behar T. N., Li Y. X., Tran H. T., Ma W., Dunlap V., Scott C. and Barker J. L. (1996) GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* **16**, 1808-1818.
- Belayev L., Liu Y., Zhao W., Busto R. and Ginsberg M. D. (2001) Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **32**, 553-560.
- Benlimame N., Le P. U. and Nabi I. R. (1998) Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* **9**, 1773-1786.
- Benowitz L. I. and Routtenberg A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *TINS* **20**, 84-91.
- Berger J., Tanen M., Elbrecht A., Hermanowski-Vosatka A., Moller D. E., Wright S. D. and Thieringer R. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit adipocyte 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *The Journal of biological chemistry* **276**, 12629-12635.
- Berger J., Leibowitz M. D., Doebber T. W., Elbrecht A., Zhang B., Zhou G., Biswas C., Cullinan C. A., Hayes N. S., Li Y., Tanen M., Ventre J., Wu M. S., Berger G. D., Mosley R., Marquis R., Santini C., Sahoo S. P., Tolman R. L., Smith R. G. and Moller D. E. (1999) Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *The Journal of biological chemistry* **274**, 6718-6725.
- Bhattacharya A. A., Grune T. and Curry S. (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *Journal of molecular biology* **303**, 721-732.
- Birn H., Fyfe J. C., Jacobsen C., Mounier F., Verroust P. J., Orskov H., Willnow T. E., Moestrup S. K. and Christensen E. I. (2000) Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1353-1361.
- Blanquart C., Mansouri R., Paumelle R., Fruchart J. C., Staels B. and Glineur C. (2004) The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **18**, 1906-1918.
- Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H. and Moras D. (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* **375**, 377-382.
- Bradford H. F. (1986) *Chemical Neurobiology. An introduction to Neurochemistry*. W. H. Freeman & Company, New York.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braissant O. and Wahli W. (1998) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* **139**, 2748-2754.
- Braissant O., Foufelle F., Scotto C., Dauca M. and Wahli W. (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354-366.

- Brenneman D. E., Phillips T. M., Festoff B. W. and Gozes I. (1997) Identity of neurotrophic molecules released from astroglia by vasoactive intestinal peptide. *Ann N Y Acad Sci* **814**, 167-173.
- Breuer S., Pech K., Buss A., Spitzer C., Ozols J., Hol E. M., Heussen N., Noth J., Schwaiger F. W. and Schmitt A. B. (2004) Regulation of stearyl-CoA desaturase-1 after central and peripheral nerve lesions. *BMC neuroscience* **5**, 15.
- Brodsky F. M., Chen C. Y., Knuehl C., Towler M. C. and Wakeham D. E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annual review of cell and developmental biology* **17**, 517-568.
- Brown D. A. and London E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology* **14**, 111-136.
- Brown P. J. (2000) Chemical compounds as selective activators of PPAR-alpha. *PCT Int. Appl.* **32**.
- Bulloch A. G. M. (1987) Somatostatin enhances neurite outgrowth and electrical coupling of regenerating neurons in *Helisoma*. *Brain Res.* **412**, 6-17.
- Cáceres A., Banker G. A. and Binder L. (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **6**, 714-722.
- Cáceres A., Banker G., Steward O., Binder L. and Payne M. (1984) MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain research* **315**, 314-318.
- Cameron P. L., Ruffin J. W., Bollag R., Rasmussen H. and Cameron R. S. (1997) Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci* **17**, 9520-9535.
- Camp H. S. and Tafuri S. R. (1997) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **272**, 10811-10816.
- Cardona-Gómez G. P., Mendez P., DonCarlos L. L., Azcoitia I. and Garcia-Segura L. M. (2001) Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev* **37**, 320-334.
- Carey E. M. (1982) The biochemistry of fetal brain development and myelination, in *Biochemical Development of the Fetus and Neonate* (Jones C. T., ed.), pp 287-336. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Carro E., Spuch C., Trejo J. L., Antequera D. and Torres-Aleman I. (2005) Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* **25**, 10884-10893.
- Cattaneo E. and McKay R. (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* **347**, 762-765.
- Caviness J. V. S. (1989) Normal development of cerebral neocortex, in *Developmental Neurobiology*, Vol. 12 (Evrard P. and Minkowski A., eds), pp 1-10. Vevey, Raven Press, New York.
- Caviness V. S., Jr. (1982) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain research* **256**, 293-302.
- Caviness V. S., Jr. and Takahashi T. (1995) Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain & development* **17**, 159-163.
- Cessac-Guillemet A. L., Mounier F., Borot C., Bakala H., Perichon M., Schaefferbeke M. and Schaefferbeke J. (1996) Characterization and distribution of albumin binding protein in normal rat kidney. *The American journal of physiology* **271**, F101-107.

- Chawla A., Schwarz E. J., Dimaculangan D. D. and Lazar M. A. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798-800.
- Chen G. G., Lee J. F., Wang S. H., Chan U. P., Ip P. C. and Lau W. Y. (2002) Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma is associated with Bcl-2 and NF-kappaB in human colon cancer. *Life sciences* **70**, 2631-2646.
- Cheng Z. J., Singh R. D., Sharma D. K., Holicky E. L., Hanada K., Marks D. L. and Pagano R. E. (2006) Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Molecular biology of the cell* **17**, 3197-3210.
- Chiaramello A., Neuman T., Peavy D. R. and Zuber M. X. (1996) The GAP-43 gene is a direct downstream target of the basic helix-loop-helix transcription factors. *The Journal of biological chemistry* **271**, 22035-22043.
- Christensen E. I. and Birn H. (2002) Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 256-266.
- Christensen E. I., Birn H., Verroust P. and Moestrup S. K. (1998) Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *International review of cytology* **180**, 237-284.
- Cimini A., Benedetti E., Cristiano L., Sebastiani P., D'Amico M. A., D'Angelo B. and Di Loreto S. (2005) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience* **130**, 325-337.
- Clark R. B., Bishop-Bailey D., Estrada-Hernandez T., Hla T., Puddington L. and Padula S. J. (2000) The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* **164**, 1364-1371.
- Cohen A. W., Hnasko R., Schubert W. and Lisanti M. P. (2004) Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological reviews* **84**, 1341-1379.
- Cohen S. (1960) Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the Mouse Salivary Gland and Its Neuro-Cytotoxic Antiserum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **46**, 302-311.
- Collet P., Domenjoud L., Devignes M. D., Murad H., Schohn H. and Dauca M. (2004) The human semaphorin 6B gene is down regulated by PPARs. *Genomics* **83**, 1141-1150.
- Collins B. M., McCoy A. J., Kent H. M., Evans P. R. and Owen D. J. (2002) Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**, 523-535.
- Conner S. D. and Schmid S. L. (2003) Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology* **162**, 773-779.
- Cowan W. M. (1987) Desarrollo del cerebro, in *El Cerebro* (Hubel D. H., ed.), pp 69-81. Prensa Científica, Barcelona.
- Cui S., Verroust P. J., Moestrup S. K. and Christensen E. I. (1996) Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *The American journal of physiology* **271**, F900-907.
- Cullingford T. E., Bhakoo K., Peuchen S., Dolphin C. T., Patel R. and Clark J. B. (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* **70**, 1366-1375.
- Curry S., Brick P. and Franks N. P. (1999) Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochimica et biophysica acta* **1441**, 131-140.
- Damke H., Baba T., van der Blik A. M. and Schmid S. L. (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *The Journal of cell biology* **131**, 69-80.
- Dani J. W., Chernjavsky A. and Smith S. J. (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* **8**, 429-440.

- Daynes R. A. and Jones D. C. (2002) Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **2**, 748-759.
- De Camilli P. and Takei K. (1996) Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron* **16**, 481-486.
- De Camilli P., Takei K. and McPherson P. S. (1995) The function of dynamin in endocytosis. *Current opinion in neurobiology* **5**, 559-565.
- De Pablo F. and Roth J. (1990) Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 339-342.
- Deane R., Wu Z. and Zlokovic B. V. (2004) RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **35**, 2628-2631.
- Dehay C. and Kennedy H. (2007) Cell-cycle control and cortical development. *Nature reviews* **8**, 438-450.
- Deplanque D., Gele P., Petraut O., Six I., Furman C., Bouly M., Nion S., Dupuis B., Leys D., Fruchart J. C., Cecchelli R., Staels B., Duriez P. and Bordet R. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci* **23**, 6264-6271.
- Desvergne B. and Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**, 649-688.
- Desvergne B., Michalik L. and Wahli W. (2004) Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **18**, 1321-1332.
- Di Fiore P. P. and De Camilli P. (2001) Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* **106**, 1-4.
- Di Paolo G. and De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657.
- Dicicco-Bloom E., Lu N., Pintar J. E. and Zhang J. (1998) The PACAP ligand/receptor system regulates cerebral cortical neurogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **865**, 274-289.
- Dinsmore J. H. and Solomon F. (1991) Inhibition of MAP-2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* **64**, 817-826.
- DiRenzo J., Soderstrom M., Kurokawa R., Ogliaastro M. H., Ricote M., Ingrey S., Horlein A., Rosenfeld M. G. and Glass C. K. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Molecular and cellular biology* **17**, 2166-2176.
- Doray B., Lee I., Knisely J., Bu G. and Kornfeld S. (2007) The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Molecular biology of the cell* **18**, 1887-1896.
- Doweiko J. P. and Nompleggi D. J. (1991) Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *Jpen* **15**, 207-211.
- Dowell P., Peterson V. J., Zabriskie T. M. and Leid M. (1997) Ligand-induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha conformational change. *The Journal of biological chemistry* **272**, 2013-2020.
- Drab M., Verkade P., Elger M., Kasper M., Lohn M., Lauterbach B., Menne J., Lindschau C., Mende F., Luft F. C., Schedl A., Haller H. and Kurzchalia T. V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science (New York, N.Y)* **293**, 2449-2452.
- Dringen R., Gebhardt R. and Hamprecht B. (1993) Glycogen in astrocytes, possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* **62**, 208-214.

- Du Y. and Dreyfus C. F. (2002) Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res* **68**, 647-654.
- Duncan L. M., Piper S., Dodd R. B., Saville M. K., Sanderson C. M., Luzio J. P. and Lehner P. J. (2006) Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *The EMBO journal* **25**, 1635-1645.
- Dussault J. H. and Ruel J. (1987) Thyroid hormones and brain development. *Ann. Rev. Physiol.* **49**, 321-334.
- Dziegielewska K., Evans C., Malinowska D., Mollgard K., Reynolds M. and Saunders N. (1980) Blood-cerebrospinal fluid transfer of plasma proteins during fetal development in the sheep. *J. Physiol.* **300**, 457-465.
- Dziegielewska K. M., Evans C. A. N., Lai P. C. W., Lorscheider F. L., Malinowska D. H., Mollgard K. and Saunders N. R. (1981) Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal rats during development. *Dev. Biol.* **83**, 193-200.
- Edelman G. M. (1983) Cell adhesion molecules. *Science.* **219**, 450-457.
- Edidin M. (2001) Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends in cell biology* **11**, 492-496.
- Eichholtz T., de Bont D. B., de Widt J., Liskamp R. M. and Ploegh H. L. (1993) A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **268**, 1982-1986.
- Elliot K. A. C. (1969) The use of brain slices, in *Handbook of Neurochemistry*, Vol. VOL. 2 (Lajtha A., ed.), pp 103-114. Plenum Press, New York.
- Engqvist-Goldstein A. E., Kessels M. M., Chopra V. S., Hayden M. R. and Drubin D. G. (1999) An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *The Journal of cell biology* **147**, 1503-1518.
- Escrive M B. J., Ciruela F, Canela EI, Mallol J, Enrich C, Lluís C, Franco R. (2003) Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. *Exp Cell Res.* **285(1)**, 72-90.
- Evans R. M., Barish G. D. and Wang Y. X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* **10**, 355-361.
- Fedoroff S. (1987) From neuroepithelium to mature astrocytes, in *Glial-Neuronal Communication in Development and Regeneration*, Vol. vol. 2 (Althaus H. H. and Seifert W., eds), pp 4-23. Springer-Verlag, Berlin.
- Ferreiro B., Pastor R. and Bernal J. (1990) T₃ receptor occupancy and T₃ levels in plasma and cytosol during rat brain development. *Acta Endocrinol.* **123**, 95-99.
- French-Constant C., Miller R. H., Kruse J., Schachner M. and Raff M. C. (1986) Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve. *J. Cell Biol* **102**, 844-852.
- Fisher C. E. and Howie S. E. (2006) The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Developmental biology* **296**, 279-297.
- Fishman P. S., Farrand D. A. and Kristt D. A. (1990) Internalization of plasma proteins by cerebellar purkinje cells. **100**, 43-49.
- Forman B. M., Chen J. and Evans R. M. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4312-4317.
- Forman B. M., Tontonoz P., Chen J., Brun R. P., Spiegelman B. M. and Evans R. M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812.

- Fra A. M., Williamson E., Simons K. and Parton R. G. (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8655-8659.
- Fu J., Gaetani S., Oveisi F., Lo Verme J., Serrano A., Rodriguez De Fonseca F., Rosengarth A., Luecke H., Di Giacomo B., Tarzia G. and Piomelli D. (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature* **425**, 90-93.
- Fukuchi-Shimogori T. and Grove E. A. (2001) Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science (New York, N.Y)* **294**, 1071-1074.
- Gal J. S., Morozov Y. M., Ayoub A. E., Chatterjee M., Rakic P. and Haydar T. F. (2006) Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci* **26**, 1045-1056.
- Galbiati F., Engelman J. A., Volonte D., Zhang X. L., Minetti C., Li M., Hou H., Jr., Kneitz B., Edelmann W. and Lisanti M. P. (2001) Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *The Journal of biological chemistry* **276**, 21425-21433.
- Gardner-Medwin A. R. (1986) A new framework for assessment of potassium-buffering mechanisms. *Ann. NY Acad. Sci.* **481**, 287-302.
- Garel S., Huffman K. J. and Rubenstein J. L. (2003) Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants. *Development (Cambridge, England)* **130**, 1903-1914.
- Garofalo R. S. and Rosen O. M. (1989) Insulin and insuline like growth factor 1 (IGF-1) receptors during central nervous system development: expression of two immunologically distinct IGF-1 receptor b subunits. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2806-2817.
- Gearing A. J., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A. H., Drummond A. H., Galloway W. A., Gilbert R., Gordon J. L. and et al. (1994) Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* **370**, 555-557.
- Gekle M. (2005) Renal tubule albumin transport. *Annual review of physiology* **67**, 573-594.
- Gekle M., Mildenerger S., Freudinger R. and Silbernagl S. (1995) Endosomal alkalization reduces Jmax and Km of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells. *The American journal of physiology* **268**, F899-906.
- Gekle M., Mildenerger S., Freudinger R., Schwerdt G. and Silbernagl S. (1997) Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *The American journal of physiology* **272**, F668-677.
- Ghitescu L., Fixman A., Simionescu M. and Simionescu N. (1986) Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *The Journal of cell biology* **102**, 1304-1311.
- Giaume C. and Venance L. (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* **24**, 50-64.
- Ginsberg M. D., Palesch Y. Y. and Hill M. D. (2006) The ALIAS (ALbumin In Acute Stroke) Phase III randomized multicentre clinical trial: design and progress report. *Biochemical Society transactions* **34**, 1323-1326.
- Glebov O. O., Bright N. A. and Nichols B. J. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature cell biology* **8**, 46-54.
- Glennay J. R., Jr. and Zokas L. (1989) Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *The Journal of cell biology* **108**, 2401-2408.
- Goetze S., Bungenstock A., Czupalla C., Eilers F., Stawowy P., Kintscher U., Spencer-Hansch C., Graf K., Nurnberg B., Law R. E., Fleck E. and Grafe M. (2002) Leptin induces

endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands. *Hypertension* **40**, 748-754.

Gosset P., Charbonnier A. S., Delerive P., Fontaine J., Staels B., Pestel J., Tonnel A. B. and Trottein F. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology* **31**, 2857-2865.

Gottlicher M., Widmark E., Li Q. and Gustafsson J. A. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4653-4657.

Gotz M. and Huttner W. B. (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-788.

Granda B., Tabernero A., Tello V. and Medina J. M. (2003) Oleic acid induces GAP-43 expression through a protein kinase C-mediated mechanism that is independent of NGF but synergistic with NT-3 and NT-4/5. *Brain research* **988**, 1-8.

Grdadolnik J. and Marechal Y. (2005) Hydrogen-deuterium exchange in bovine serum albumin protein monitored by fourier transform infrared spectroscopy, part I: structural studies. *Applied spectroscopy* **59**, 1347-1356.

Greenberg S., Burridge K. and Silverstein S. C. (1990) Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *The Journal of experimental medicine* **172**, 1853-1856.

Grimm-Jorgensen Y. (1987) Somatostatin and calcitonin stimulate neurite regeneration of molluscan neurons in vitro. *Brain Res.* **403**, 121-126.

Grommes C., Landreth G. E. and Heneka M. T. (2004) Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* **5**, 419-429.

Gurr M. I., Harwood J. L. and Frayn K. N. (2002) *Lipid Biochemistry*. Blackwell Science, Cornwall.

Guzman M., Lo Verme J., Fu J., Oveisi F., Blazquez C. and Piomelli D. (2004) Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *The Journal of biological chemistry* **279**, 27849-27854.

Habgood M. D., Sedgwick J. E., Dziegielewska K. M. and Saunders N. R. (1992) A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. *The Journal of physiology* **456**, 181-192.

Haffner C., Di Paolo G., Rosenthal J. A. and de Camilli P. (2000) Direct interaction of the 170 kDa isoform of synaptotagmin 1 with clathrin and with the clathrin adaptor AP-2. *Curr Biol* **10**, 471-474.

Hamburger V. and Levi-Montalcini R. (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *The Journal of experimental zoology* **111**, 457-501.

Hamon M., Bourgoin S., Chanez C. and De Vitry F. (1989) Do serotonin and other neurotransmitters exert a trophic influence on the immature brain?, in *Developmental Neurobiology*, Vol. vol. 12 (Evrard P. and Minkowski A., eds), pp 171-183. Vevey, Raven Press, New York.

Hartfuss E., Galli R., Heins N. and Gotz M. (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental biology* **229**, 15-30.

Hatten M. E. and Mason C. A. (1986) Neuron-astroglia interactions in vitro and in vivo. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 168-174.

Haubensak W., Attardo A., Denk W. and Huttner W. B. (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**, 3196-3201.

Haucke V. and De Camilli P. (1999) AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science (New York, N.Y)* **285**, 1268-1271.

Hayashi M. (1992) Ontogeny of some neuropeptides in the primate brain. *Prog Neurobiol* **38**, 231-260.

He P. and Curry F. E. (1993) Albumin modulation of capillary permeability: role of endothelial cell [Ca²⁺]_i. *The American journal of physiology* **265**, H74-82.

He X. M. and Carter D. C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209-215.

Hebert J. M., Mishina Y. and McConnell S. K. (2002) BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline. *Neuron* **35**, 1029-1041.

Heneka M. T. and Landreth G. E. (2007) PPARs in the brain. *Biochimica et biophysica acta* **1771**, 1031-1045.

Henley J. R., Krueger E. W., Oswald B. J. and McNiven M. A. (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology* **141**, 85-99.

Hermanowski-Vosatka A., Gerhold D., Mundt S. S., Loving V. A., Lu M., Chen Y., Elbrecht A., Wu M., Doebber T., Kelly L., Milot D., Guo Q., Wang P. R., Ippolito M., Chao Y. S., Wright S. D. and Thieringer R. (2000) PPARalpha agonists reduce 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the liver. *Biochemical and biophysical research communications* **279**, 330-336.

Herschkowitz N. (1988) Brain development in the fetus, neonate and infant. *Biol. Neonate* **54**, 1-19.

Hinrichsen L., Meyerholz A., Groos S. and Ungewickell E. J. (2006) Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8715-8720.

Hinrichsen L., Harborth J., Andrees L., Weber K. and Ungewickell E. J. (2003) Effect of clathrin heavy chain- and alpha-adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory proteins and receptor trafficking in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 45160-45170.

Hinshaw J. E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annual review of cell and developmental biology* **16**, 483-519.

Hostetler H. A., Petrescu A. D., Kier A. B. and Schroeder F. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *The Journal of biological chemistry* **280**, 18667-18682.

Houlgatte R., Mallat M., Brachet P. and Prochiantz A. (1989) Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **24**, 143-152.

Hsu M. H., Palmer C. N., Song W., Griffin K. J. and Johnson E. F. (1998) A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *The Journal of biological chemistry* **273**, 27988-27997.

Hu E., Kim J. B., Sarraf P. and Spiegelman B. M. (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science (New York, N.Y)* **274**, 2100-2103.

Huttner W. B. and Schmidt A. (2000) Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Current opinion in neurobiology* **10**, 543-551.

- Ikezu T., Ueda H., Trapp B. D., Nishiyama K., Sha J. F., Volonte D., Galbiati F., Byrd A. L., Bassell G., Serizawa H., Lane W. S., Lisanti M. P. and Okamoto T. (1998) Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain research* **804**, 177-192.
- Inestrosa N. C., Godoy J. A., Quintanilla R. A., Koenig C. S. and Bronfman M. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. *Experimental cell research* **304**, 91-104.
- Ivins J. K. and Pittman R. N. (1989) Growth cone-growth cone interactions in cultures of rat sympathetic neurons. *Dev. Biol.* **135**, 147-157.
- Janzer R. C. and Raff M. C. (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**, 253-256.
- Jeannin E., Wahli W. and Desvergne B. (1997) Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *The Journal of biological chemistry* **272**, 20108-20117.
- Jessell T. and Sanes J. (2001a) Generación y supervivencia de las células nerviosas, in *Principios de Neurociencia* (Kandel E., Schwartz J. and Jessell T., eds), pp 1041-1062. McGraw-Hill/ Interamericana De España, Madrid.
- Jessell T. and Sanes J. (2001b) Inducción y configuración del sistema nervioso, in *Principios de Neurociencia* (Kandel E., Schwartz J. and Jessell T., eds), pp 1019-1040. McGraw-Hill/ Interamericana de España, Madrid.
- Jiang C., Ting A. T. and Seed B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**, 82-86.
- Joergensen K. A. and Stoffersen E. (1979) Heparin like activity of albumin. *Thrombosis research* **16**, 569-574.
- Juge-Aubry C. E., Hammar E., Siegrist-Kaiser C., Pernin A., Takeshita A., Chin W. W., Burger A. G. and Meier C. A. (1999) Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *The Journal of biological chemistry* **274**, 10505-10510.
- Juurlink B. H. J. and Devon R. M. (1990) Macromolecular translocation-a possible function of astrocytes. *Brain Res.* **533**, 73-77.
- Kainu T., Wikstrom A. C., Gustafsson J. A. and Peltö-Huikko M. (1994) Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain. *Neuroreport* **5**, 2481-2485.
- Kalil R. E. (1990) Formación de sinapsis durante el desarrollo del cerebro. *Investigación y Ciencia Febrero*, 26-34.
- Kandel E. R., Schwartz J. H. and Jessell T. M. (2001) *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid.
- Kaplan M. R., Meyer-Franke A., Lambert S., Bennett V., Duncan I. D. and Levinson S. R. (1997) Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* **17**, 724-728.
- Kersten S., Desvergne B. and Wahli W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**, 421-424.
- Kersten S., Seydoux J., Peters J. M., Gonzalez F. J., Desvergne B. and Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of clinical investigation* **103**, 1489-1498.
- Keyel P. A., Mishra S. K., Roth R., Heuser J. E., Watkins S. C. and Traub L. M. (2006) A single common portal for clathrin-mediated endocytosis of distinct cargo governed by cargo-selective adaptors. *Molecular biology of the cell* **17**, 4300-4317.

- Khan W. A., Blobe G. C. and Hannun Y. A. (1992) Activation of protein kinase C by oleic acid. *J. Biol. Chem.* **267**, 3605-3612.
- Kirchhausen T. (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 705-732.
- Kirchhausen T. (2000) Clathrin. *Annual review of biochemistry* **69**, 699-727.
- Kirchhoff F., Dringen R. and Giaume C. (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **251**, 159-169.
- Kirkham M., Fujita A., Chadda R., Nixon S. J., Kurzchalia T. V., Sharma D. K., Pagano R. E., Hancock J. F., Mayor S. and Parton R. G. (2005) Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *The Journal of cell biology* **168**, 465-476.
- Kliwer S. A., Umesono K., Noonan D. J., Heyman R. A. and Evans R. M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**, 771-774.
- Kliwer S. A., Sundseth S. S., Jones S. A., Brown P. J., Wisely G. B., Koble C. S., Devchand P., Wahli W., Willson T. M., Lenhard J. M. and Lehmann J. M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4318-4323.
- Koleske A. J., Baltimore D. and Lisanti M. P. (1995) Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1381-1385.
- Kounnas M. Z., Haudenschild C. C., Strickland D. K. and Argraves W. S. (1994) Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In vivo (Athens, Greece)* **8**, 343-351.
- Krendel M., Osterweil E. K. and Mooseker M. S. (2007) Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis. *FEBS letters* **581**, 644-650.
- Krey G., Braissant O., L'Horset F., Kalkhoven E., Perroud M., Parker M. G. and Wahli W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **11**, 779-791.
- Kuffler S. W., Nicholls J. G. and Orkand R. K. (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**, 768-787.
- Laborda J., Naval J., Calvo M., Lampreave F. and Uriel J. (1989) Alpha-fetoprotein and albumin uptake by mouse tissues during development. *Biol. Neonate* **56**, 332-341.
- Lahtinen U., Honsho M., Parton R. G., Simons K. and Verkade P. (2003) Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells. *FEBS letters* **538**, 85-88.
- Lamaze C., Dujancourt A., Baba T., Lo C. G., Benmerah A. and Dautry-Varsat A. (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular cell* **7**, 661-671.
- Lazennec G., Canaple L., Saugy D. and Wahli W. (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **14**, 1962-1975.
- Lee J. E. (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Current opinion in neurobiology* **7**, 13-20.
- Lee S. S., Pineau T., Drago J., Lee E. J., Owens J. W., Kroetz D. L., Fernandez-Salguero P. M., Westphal H. and Gonzalez F. J. (1995) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the

pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Molecular and cellular biology* **15**, 3012-3022.

Lee Y. H., Fang K. M., Yang C. M., Hwang H. M., Chiu C. T. and Tsai W. (2000) Kainic acid-induced neurotrophic activities in developing cortical neurons. *J Neurochem* **74**, 2401-2411.

Lemmon S. K. (2001) Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr Biol* **11**, R49-52.

Levi-Montalcini R. (1982) Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Ann. Rev. Neurosci.* **5**, 341-362.

Linden D. J. (1997) Long term potentiation of glial synaptic currents in cerebellar culture. *Neuron* **18**, 983-994.

Lipton S. A. and Kater S. B. (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 265-270.

Liu Y., Belayev L., Zhao W., Busto R., Belayev A. and Ginsberg M. D. (2001) Neuroprotective effect of treatment with human albumin in permanent focal cerebral ischemia: histopathology and cortical perfusion studies. *Eur J Pharmacol* **428**, 193-201.

Ljung B., Bamberg K., Dahllof B., Kjellstedt A., Oakes N. D., Ostling J., Svensson L. and Camejo G. (2002) AZ 242, a novel PPARalpha/gamma agonist with beneficial effects on insulin resistance and carbohydrate and lipid metabolism in ob/ob mice and obese Zucker rats. *Journal of lipid research* **43**, 1855-1863.

Luckenbill E. L. (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res.* **23**, 1-27.

Maccioni R. B. and Cambiazo V. (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol. Rev.* **75**, 835-864.

Madtes J. P. and Redburn D. A. (1983) GABA as a trophic factor during development. *Life Sci.* **33**, 979-984.

Marechal V., Prevost M. C., Petit C., Perret E., Heard J. M. and Schwartz O. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *Journal of virology* **75**, 11166-11177.

Marti E., Takada R., Bumcrot D. A., Sasaki H. and McMahon A. P. (1995) Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* **121**, 2537-2547.

Mattson M. P. (1990) Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca²⁺ influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **4**, 105-117.

Mauch D. H., Nagler K., Schumacher S., Goritz C., Muller E. C., Otto A. and Pfriederger F. W. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science (New York, N.Y)* **294**, 1354-1357.

Mayor S. and Rao M. (2004) Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **5**, 231-240.

Mayor S. and Pagano R. E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 603-612.

Mayor S., Rothberg K. G. and Maxfield F. R. (1994) Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science (New York, N.Y)* **264**, 1948-1951.

McCarthy R. A. and Argraves W. S. (2003) Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *Journal of cell science* **116**, 955-960.

McCarthy R. A., Barth J. L., Chintalapudi M. R., Knaak C. and Argraves W. S. (2002) Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 25660-25667.

McDonald J. W. and Johnston M. V. (1993) Excitatory amino acid neurotoxicity in the developing brain. *NIDA Res Monogr* **133**, 185-205.

- McMahon H. T. (1999) Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr Biol* **9**, R332-335.
- Means A. L. and Gudas L. J. (1995) The roles of retinoids in vertebrate development. *Annual review of biochemistry* **64**, 201-233.
- Medina J. M. and Taberero A. (2002) Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *J Physiol Paris* **96**, 265-271.
- Medina J. M., Giaume C. and Taberero A. (1999) Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis, in *Advances in Experimental Medicine and Biology. The function of glial cells in health and disease: Dialogue between glia and neurons*, Vol. 468 (Matsas R. and Tsacopoulos M., eds), pp 361-371. Plenum Publishers, New York.
- Megias L., Guerri C., Fornas E., Azorin I., Bendala E., Sancho-Tello M., Duran J. M., Tomas M., Gomez-Lechon M. J. and Renau-Piqueras J. (2000) Endocytosis and transcytosis in growing astrocytes in primary culture. Possible implications in neural development. *The International journal of developmental biology* **44**, 209-221.
- Meisami E. and Timiras P. S. (1982) Normal and abnormal biochemical development of the brain after birth, in *Biochemical Development of the Fetus and Neonate* (Jones C. T., ed.), pp 759-821. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Mellman I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology* **12**, 575-625.
- Michalik L., Desvergne B. and Wahli W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer* **4**, 61-70.
- Michler A. (1990) Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. *Int. J. Dev. Neurosci.* **8**, 463-472.
- Miller M. W. (1985) Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. *Develop. Brain Res.* **23**, 187-192.
- Minelli A., Brecha N. C., Karschin C., DeBiasi S. and Conti F. (1995) GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J Neurosci* **15**, 7734-7746.
- Mobbs P., Brew H. and Attwell D. A. (1988) A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axotolol (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Res.* **460**, 235-245.
- Moestrup S. K., Kozyraki R., Kristiansen M., Kaysen J. H., Rasmussen H. H., Brault D., Pontillon F., Goda F. O., Christensen E. I., Hammond T. G. and Verroust P. J. (1998) The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *The Journal of biological chemistry* **273**, 5235-5242.
- Mollgard K. and Jacobsen M. (1984) Immunohistochemical identification of some plasma proteins in human embryonic and fetal forebrain with particular reference to the development of the neocortex. *Brain research* **315**, 49-63.
- Mollgard K., Jacobsen M., Jacobsen G., Clausen P. and Saunders N. (1979) Immunohistochemical evidence for an intracellular localization of plasma proteins in human foetal choroid plexus and brain. *Neurosci. Lett.* **14**, 85-90.
- Mollgard K., Dziegielewska K. M., Saunders N. R., Zakut H. and Soreq H. (1988) Synthesis and localization of plasma proteins in the developing human brain. *Dev. Biol.* **128**, 207-221.
- Molyneaux B. J., Arlotta P., Menezes J. R. and Macklis J. D. (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews* **8**, 427-437.
- Monks J. and Neville M. C. (2004) Albumin transcytosis across the epithelium of the lactating mouse mammary gland. *The Journal of physiology* **560**, 267-280.

Montesano R., Roth J., Robert A. and Orci L. (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* **296**, 651-653.

Morrison R. F. and Farmer S. R. (1999) Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* **274**, 17088-17097.

Mueller B. K. (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annual review of neuroscience* **22**, 351-388.

Murase K., Odaka H., Suzuki M., Tayuki N. and Ikeda H. (1998) Pioglitazone time-dependently reduces tumour necrosis factor-alpha level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* **41**, 257-264.

Murata M., Peranen J., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T. V. and Simons K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 10339-10343.

Nadal A., Fuentes E., Pastor J. and McNaughton P. A. (1995) Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1426-1430.

Nedergaard M. (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain-cells. *Science (New York, N.Y)* **263**, 1768-1771.

Newmyer S. L. and Schmid S. L. (2001) Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *The Journal of cell biology* **152**, 607-620.

Nichols B. J. and Lippincott-Schwartz J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends in cell biology* **11**, 406-412.

Nichols B. J., Kenworthy A. K., Polishchuk R. S., Lodge R., Roberts T. H., Hirschberg K., Phair R. D. and Lippincott-Schwartz J. (2001) Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *The Journal of cell biology* **153**, 529-541.

Niquet J., Ben-Ari Y. and Represa A. (1994) Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *J Neurocytol* **23**, 641-656.

Nishiyama K., Trapp B. D., Ikezu T., Ransohoff R. M., Tomita T., Iwatsubo T., Kanazawa I., Hsiao K. K., Lisanti M. P. and Okamoto T. (1999) Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **19**, 6538-6548.

Noctor S. C., Martínez-Cerdeno V., Ivic L. and Kriegstein A. R. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* **7**, 136-144.

Noctor S. C., Flint A. C., Weissman T. A., Dammerman R. S. and Kriegstein A. R. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**, 714-720.

O'Kane R. L., Martínez-López I., DeJoseph M. R., Vina J. R. and Hawkins R. A. (1999) Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31891-31895.

Oestreicher B. A., De Graan P. N. E., Gispen H. W., Verhaagen J. and Schrama L. H. (1997) B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **53**, 627-686.

Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H. and Nakatani Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959.

- Oh P., McIntosh D. P. and Schnitzer J. E. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *The Journal of cell biology* **141**, 101-114.
- Ohno H., Stewart J., Fournier M. C., Bosshart H., Rhee I., Miyatake S., Saito T., Gallusser A., Kirchhausen T. and Bonifacino J. S. (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science (New York, N.Y)* **269**, 1872-1875.
- Ohsugi M., Sato H. and Yamamura H. (1992) Transfer of I-125-albumin from blood to brain in newborn rats and the effect of hyperbilirubinemia on the transfer. *Biol. Neonate* **62**, 47-54.
- Ohtsuka T., Asahi M., Matsuura N., Kikuchi H., Hojo M., Kageyama R., Ohkubo H. and Hoshimaru M. (1998) Regulated expression of neurogenic basic helix-loop-helix transcription factors during differentiation of the immortalized neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons. *Cell Tissue Res* **293**, 23-29.
- Oliver W. R., Jr., Shenk J. L., Snaith M. R., Russell C. S., Plunket K. D., Bodkin N. L., Lewis M. C., Winegar D. A., Sznaidman M. L., Lambert M. H., Xu H. E., Sternbach D. D., Kliewer S. A., Hansen B. C. and Willson T. M. (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5306-5311.
- Olmsted J. B. (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 421-457.
- Oppenheim R. W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience* **14**, 453-501.
- Orkand R. K., Nicholls J. G. and Kuffler S. W. (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**, 788-806.
- Osada S., Tsukamoto T., Takiguchi M., Mori M. and Osumi T. (1997) Identification of an extended half-site motif required for the function of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Genes Cells* **2**, 315-327.
- Owen D. J., Collins B. M. and Evans P. R. (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 153-191.
- Palade G. E. (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Physiol* **24**, 1424.
- Palesch Y. Y., Hill M. D., Ryckborst K. J., Tamariz D. and Ginsberg M. D. (2006) The ALIAS Pilot Trial: a dose-escalation and safety study of albumin therapy for acute ischemic stroke--II: neurologic outcome and efficacy analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **37**, 2107-2114.
- Pappenheimer J. R., Renkin E. M. and Borrero L. M. (1951) Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *The American journal of physiology* **167**, 13-46.
- Park K. S., Lee R. D., Kang S. K., Han S. Y., Park K. L., Yang K. H., Song Y. S., Park H. J., Lee Y. M., Yun Y. P., Oh K. W., Kim D. J., Yun Y. W., Hwang S. J., Lee S. E. and Hong J. T. (2004) Neuronal differentiation of embryonic midbrain cells by upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via the JNK-dependent pathway. *Experimental cell research* **297**, 424-433.
- Parpura V. and Basarsky T. A. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**, 744-747.
- Parton R. G. and Simons K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185-194.
- Parton R. G., Joggerst B. and Simons K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology* **127**, 1199-1215.

- Pelkmans L., Kartenbeck J. and Helenius A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature cell biology* **3**, 473-483.
- Pelkmans L., Puntener D. and Helenius A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science (New York, N.Y)* **296**, 535-539.
- Pelkmans L., Fava E., Grabner H., Hannus M., Habermann B., Krausz E. and Zerial M. (2005) Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* **436**, 78-86.
- Perrone-Bizzozero N. I., Cansino V. V. and Kohn D. T. (1993) Post-transcriptional regulation of GAP-43 gene expression in PC12 cells through protein kinase C-dependent stabilization of the messenger RNA. *J. Cell Biol.* **120**, 1263-1270.
- Pincus D. W., DiCicco-Bloom E. M. and Black I. B. (1990) Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature* **343**, 564-567.
- Piwon N., Gunther W., Schwake M., Bosl M. R. and Jentsch T. J. (2000) ClC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* **408**, 369-373.
- Plateel M., Teissier E. and Cecchelli R. (1997) Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J. Neurochem.* **68**, 874-877.
- Poirier J. (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **17**, 525-530.
- Privalsky M. L. (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual review of physiology* **66**, 315-360.
- Puri V., Watanabe R., Singh R. D., Dominguez M., Brown J. C., Wheatley C. L., Marks D. L. and Pagano R. E. (2001) Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *The Journal of cell biology* **154**, 535-547.
- Raff M. C. (1989) Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science (New York, N.Y)* **243**, 1450-1455.
- Rakic P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* **145**, 61-84.
- Rakic P. (1978) Neuronal migration and contact guidance in primate telencephalon. *Postgrad. Med. J.* **54**, 25-40.
- Rakic P. (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science (New York, N.Y)* **227**, 1054-1056.
- Raper J. and Tessier-Lavigne M. (1999) Growth cones and axon pathfinding, in *Fundamental Neuroscience* (Zimond M., Bloom F., Landis S., Roberts J. and Squire L., eds), pp 519-546. Academic Press, San Diego.
- Rash B. G. and Grove E. A. (2006) Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. *Current opinion in neurobiology* **16**, 25-34.
- Razani B., Combs T. P., Wang X. B., Frank P. G., Park D. S., Russell R. G., Li M., Tang B., Jelicks L. A., Scherer P. E. and Lisanti M. P. (2002a) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *The Journal of biological chemistry* **277**, 8635-8647.
- Razani B., Wang X. B., Engelman J. A., Battista M., Lagaud G., Zhang X. L., Kneitz B., Hou H., Jr., Christ G. J., Edelmann W. and Lisanti M. P. (2002b) Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Molecular and cellular biology* **22**, 2329-2344.
- Razani B., Engelman J. A., Wang X. B., Schubert W., Zhang X. L., Marks C. B., Macaluso F., Russell R. G., Li M., Pestell R. G., Di Vizio D., Hou H., Jr., Kneitz B., Lagaud G., Christ

- G. J., Edelman W. and Lisanti M. P. (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *The Journal of biological chemistry* **276**, 38121-38138.
- Reisert I., Han V., Hartwig S., Ahnert-Hilger G. and Pilgrim C. (1989) Rapid maturation of synaptic functions of prenatal serotonergic neurons in short-term cultures: absence of sex differences and hormone effects. *Neurosci.* **32**, 133-139.
- Represa A., Niquet J., Charriaut-Marlangue C. and Ben-Ari Y. (1993) Reactive astrocytes in the kainic acid damaged hippocampus have the phenotypic features of type-2 astrocytes. *J. Neurocytol.* **22**, 299-310.
- Ricote M., Huang J. T., Welch J. S. and Glass C. K. (1999) The peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *Journal of leukocyte biology* **66**, 733-739.
- Rodríguez-Rodríguez R. A., Taberner A., Velasco A., Lavado E. M. and Medina J. M. (2004) The neurotrophic effect of oleic acid includes dendritic differentiation and the expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2. *J Neurochem* **88**, 1041-1051.
- Rosen E. D., Sarraf P., Troy A. E., Bradwin G., Moore K., Milstone D. S., Spiegelman B. M. and Mortensen R. M. (1999) PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell* **4**, 611-617.
- Rothberg K. G., Ying Y. S., Kolhouse J. F., Kamen B. A. and Anderson R. G. (1990) The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *The Journal of cell biology* **110**, 637-649.
- Rothberg K. G., Heuser J. E., Donzell W. C., Ying Y. S., Glenney J. R. and Anderson R. G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- Rubtsov A. M. and Lopina O. D. (2000) Ankyrins. *FEBS letters* **482**, 1-5.
- Sabharanjak S., Sharma P., Parton R. G. and Mayor S. (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Developmental cell* **2**, 411-423.
- Saito A., Pietromonaco S., Loo A. K. and Farquhar M. G. (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 9725-9729.
- Sánchez C., Díaz-Nido J. and Avila J. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* **61**, 133-168.
- Sanes J. and Jessell T. (2001) Guía de los axones hacia sus objetivos, in *Principios de Neurociencia* (Kandel E., Schwartz J. and Jessell T., eds), pp 1063-1086. McGraw-Hill/ Interamericana de España, Madrid.
- Santos M. J., Quintanilla R. A., Toro A., Grandy R., Dinamarca M. C., Godoy J. A. and Inestrosa N. C. (2005) Peroxisomal proliferation protects from beta-amyloid neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* **280**, 41057-41068.
- Sargiacomo M., Sudol M., Tang Z. and Lisanti M. P. (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *The Journal of cell biology* **122**, 789-807.
- Schmechel D. E. and Rakic P. (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.* **156**, 115-152.
- Schmidt A., Wolde M., Thiele C., Fest W., Kratzin H., Podtelejnikov A. V., Witke W., Huttner W. B. and Soling H. D. (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**, 133-141.

- Schnitzer J. E. and Bravo J. (1993) High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors. *The Journal of biological chemistry* **268**, 7562-7570.
- Schnitzer J. E. and Oh P. (1994) Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *The Journal of biological chemistry* **269**, 6072-6082.
- Schnitzer J. E., Liu J. and Oh P. (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *The Journal of biological chemistry* **270**, 14399-14404.
- Schnitzer J. E., Sung A., Horvat R. and Bravo J. (1992) Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism. *The Journal of biological chemistry* **267**, 24544-24553.
- Schnitzer J. E., Oh P., Pinney E. and Allard J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of cell biology* **127**, 1217-1232.
- Schoenfeld T. A. and Obar R. A. (1994) Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *International review of cytology* **151**, 67-137.
- Schoonjans K., Staels B. and Auwerx J. (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *Journal of lipid research* **37**, 907-925.
- Schousboe A. (1981) Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol* **22**, 1-45.
- Schubert W., Frank P. G., Razani B., Park D. S., Chow C. W. and Lisanti M. P. (2001) Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48619-48622.
- Seaton P., Hunt A. and Patel A. J. (1988) Production by astrocytes of a trophic factor for cholinergic neurons. *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 296-297.
- Self T. J., Oakley S. M. and Hill S. J. (2005) Clathrin-independent internalization of the human histamine H1-receptor in CHO-K1 cells. *British journal of pharmacology* **146**, 612-624.
- Serghides L. and Kain K. C. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF-alpha secretion by monocytes/macrophages. *J Immunol* **166**, 6742-6748.
- Seto E. S., Bellen H. J. and Lloyd T. E. (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes & development* **16**, 1314-1336.
- Sharma D. K., Brown J. C., Choudhury A., Peterson T. E., Holicky E., Marks D. L., Simari R., Parton R. G. and Pagano R. E. (2004) Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Molecular biology of the cell* **15**, 3114-3122.
- Shogomori H. and Futerman A. H. (2001) Cholera toxin is found in detergent-insoluble rafts/domains at the cell surface of hippocampal neurons but is internalized via a raft-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry* **276**, 9182-9188.
- Sigismund S., Woelk T., Puri C., Maspero E., Tacchetti C., Transidico P., Di Fiore P. P. and Polo S. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2760-2765.
- Simons K. and Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39.

- Singh R. D., Puri V., Valiyaveetil J. T., Marks D. L., Bittman R. and Pagano R. E. (2003) Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Molecular biology of the cell* **14**, 3254-3265.
- Skene J. H. P. (1989) Axonal growth-associated proteins. *Ann. Rev. Neurosci.* **12**, 127-156.
- Skene J. H. P. and Virág I. (1989) Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *J. Cell Biol.* **108**, 613-624.
- Song H., Stevens C. F. and Gage F. H. (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**, 39-44.
- Song K. S., Scherer P. E., Tang Z., Okamoto T., Li S., Chafel M., Chu C., Kohtz D. S. and Lisanti M. P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *The Journal of biological chemistry* **271**, 15160-15165.
- Sontheimer H. (1994) Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* **11**, 156-172.
- Spector A. A. and Fletcher J. E. (1978) Transport of fatty acid in the circulation., in *Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism.* (Dietschy J. M., Gotto A. M. and Ontko J. A., eds), pp 229-249. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Spoelgen R., Hammes A., Anzenberger U., Zechner D., Andersen O. M., Jerchow B. and Willnow T. E. (2005) LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development (Cambridge, England)* **132**, 405-414.
- Spoerri P. E. (1988) Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. *Synapse* **2**, 11-22.
- Spudich G., Chibalina M. V., Au J. S., Arden S. D., Buss F. and Kendrick-Jones J. (2007) Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P2. *Nature cell biology* **9**, 176-183.
- Srebro Z. and Dziobek K. (2001) Neuroprotection: the role of neuroglia. *Folia Med Cracov* **42**, 113-121.
- Steinman R. M. and Swanson J. (1995) The endocytic activity of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **182**, 283-288.
- Streit W. J. (1995) Microglial cells, in *Neuroglia* (Kettenmann H. and Ransom B. R., eds), pp 85-96. Oxford University Press, New York.
- Tabernero A., Bolaños J. P. and Medina J. M. (1993) Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem. J.* **294**, 635-638.
- Tabernero A., Orfao A. and Medina J. M. (1996a) Astrocyte differentiation in primary culture followed by flow cytometry. *Neurosci. Res.* **24**, 131-138.
- Tabernero A., Giaume C. and Medina J. M. (1996b) Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured rat astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* **16**, 187-195.
- Tabernero A., Medina A., Sánchez-Abarca L. I., Lavado E. and Medina J. M. (1999) The effect of albumin on astrocyte energy metabolism is not brought about through the control of intercellular Ca²⁺ concentrations but by free-fatty acid sequestration. *Glia* **25**, 1-9.
- Tabernero A., Lavado E. M., Granda B., Velasco A. and Medina J. M. (2001) Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* **79**, 606-616.
- Tabernero A., Velasco A., Granda B., Lavado E. M. and Medina J. M. (2002a) Transcytosis of albumin in astrocytes activates the sterol regulatory element-binding protein-1, which promotes the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *The Journal of biological chemistry* **277**, 4240-4246.
- Tabernero A., Granda B., Medina A., Sanchez-Abarca L. I., Lavado E. and Medina J. M. (2002b) Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate. *J Neurochem* **81**, 881-891.

- Takeda T., Yamazaki H. and Farquhar M. G. (2003) Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *American journal of physiology* **284**, C1105-1113.
- Takeichi M. (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* **102**, 639-655.
- Tan S. S., Kalloniatis M., Sturm K., Tam P. P., Reese B. E. and Faulkner-Jones B. (1998) Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* **21**, 295-304.
- Tang Z., Scherer P. E., Okamoto T., Song K., Chu C., Kohtz D. S., Nishimoto I., Lodish H. F. and Lisanti M. P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *The Journal of biological chemistry* **271**, 2255-2261.
- Tanzi R. E. and Bertram L. (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-555.
- Tebar F., Bohlander S. K. and Sorkin A. (1999) Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Molecular biology of the cell* **10**, 2687-2702.
- Thewke D., Kramer M. and Sinensky M. S. (2000) Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **273**, 1-4.
- Tildon J. T. (1993) Differential effects of serum proteins on substrate oxidation by isolated synaptosomes and cultured brain astrocytes. *Dev. Neurosci.* **15**, 226-232.
- Timiras P. S. and Nzekwe E. U. (1989) Thyroid hormones and nervous system development. *Biol. Neonate* **55**, 376-385.
- Tojo A. and Endou H. (1992) Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *The American journal of physiology* **263**, F601-606.
- Toyota M., Miyazaki Y., Kitamura S., Nagasawa Y., Kiyohara T., Shinomura Y. and Matsuzawa Y. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cancer cells through the reduction of cyclin D1. *Life sciences* **70**, 1565-1575.
- Trojan J. and Uriel J. (1979) [Intracellular localization of alpha-fetoprotein and serum albumin in the central nervous system of the rat during fetal and postnatal development]. *C R Seances Acad Sci D* **289**, 1157-1160.
- Trushina E., Singh R. D., Dyer R. B., Cao S., Shah V. H., Parton R. G., Pagano R. E. and McMurray C. T. (2006) Mutant huntingtin inhibits clathrin-independent endocytosis and causes accumulation of cholesterol in vitro and in vivo. *Human molecular genetics* **15**, 3578-3591.
- Tsunoda S., Sierralta J. and Zuker C. S. (1998) Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 419-422.
- Tugwood J. D., Issemann I., Anderson R. G., Bundell K. R., McPheat W. L. and Green S. (1992) The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *The EMBO journal* **11**, 433-439.
- Tuma P. L. and Hubbard A. L. (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiological reviews* **83**, 871-932.
- Underhill D. M. and Ozinsky A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology* **14**, 103-110.
- Varon S., Skaper S. D., Facci L., Rudge J. S. and Manthorpe M. (1987) Trophic and metabolic couplings between astroglia and neurons, in *Glial-Neuronal Communication in*

- Development and Regeneration*, Vol. vol. 2 (Althans H. H. and Seifert W., eds), pp 493-504. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Vega-Agapito V., Almeida A., Hatzoglou M. and Bolanos J. P. (2002) Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system $\gamma(+)$ in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *The Journal of biological chemistry* **277**, 29753-29759.
- Velasco A., Tabernero A. and Medina J. M. (2003) Role of oleic acid as a neurotrophic factor is supported in vivo by the expression of GAP-43 subsequent to the activation of SREBP-1 and the up-regulation of stearyl-CoA desaturase during postnatal development of the brain. *Brain research* **977**, 103-111.
- Vernadakis A. (1988) Neuron-glia interrelations. *Int. Rev. Neurobiol.* **30**, 149-224.
- Vicario C. and Medina J. M. (1992) Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period. *J. Neurochem.* **58**, 32-40.
- Vicario C., Tabernero A. and Medina J. M. (1993) Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture. *Pediatr. Res.* **34**, 709-715.
- Vigers G. P., Crowther R. A. and Pearse B. M. (1986) Three-dimensional structure of clathrin cages in ice. *The EMBO journal* **5**, 529-534.
- Vogel S. M., Minshall R. D., Pilipovic M., Tiruppathi C. and Malik A. B. (2001) Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L1512-1522.
- Vogel V. and Sheetz M. (2006) Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 265-275.
- Wada K., Nakajima A., Katayama K., Kudo C., Shibuya A., Kubota N., Terauchi Y., Tachibana M., Miyoshi H., Kamisaki Y., Mayumi T., Kadowaki T. and Blumberg R. S. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 12673-12681.
- Walsh C. and Cepko C. L. (1992) Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science (New York, N.Y)* **255**, 373.
- Wang L. H., Rothberg K. G. and Anderson R. G. (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *The Journal of cell biology* **123**, 1107-1117.
- Wang Y. X., Lee C. H., Tjep S., Yu R. T., Ham J., Kang H. and Evans R. M. (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113**, 159-170.
- Ward N. E. and O'Brian C. A. (1993) Inhibition of protein kinase C by N-myristoylated peptide substrate analogs. *Biochemistry* **32**, 11903-11909.
- Wells A., Welsh J. B., Lazar C. S., Wiley H. S., Gill G. N. and Rosenfeld M. G. (1990) Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science (New York, N.Y)* **247**, 962-964.
- Wiesinger H., Hamprecht B. and Dringen R. (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* **21**, 22-34.
- Williams T. M. and Lisanti M. P. (2004) The caveolin proteins. *Genome biology* **5**, 214.
- Willnow T. E., Hilpert J., Armstrong S. A., Rohlmann A., Hammer R. E., Burns D. K. and Herz J. (1996) Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalyn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8460-8464.
- Wolf N. J. (1998) A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol* **55**, 59-77.
- Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Parks D. J., Blanchard S. G., Brown P. J., Sternbach D. D., Lehmann J. M., Wisely G. B., Willson T. M., Kliewer S. A. and Milburn

- M. V. (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Molecular cell* **3**, 397-403.
- Yamada E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **1**, 445-458.
- Yamamoto S., Kitadai Y., Tsuchida A., Sasaki T., Matsubara K. and Kajiyama G. (2000) Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human gallbladder lesions. *Eur J Cancer* **36**, 257-263.
- Yuan J. and Yankner B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802-809.
- Zeidman R., Lofgren B., Pahlman S. and Larsson C. (1999) PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *The Journal of cell biology* **145**, 713-726.
- Zhang B., Berger J., Zhou G., Elbrecht A., Biswas S., White-Carrington S., Szalkowski D. and Moller D. E. (1996) Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of biological chemistry* **271**, 31771-31774.
- Zhang L. and Chawla A. (2004) Role of PPARgamma in macrophage biology and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 500-505.
- Zhu Y., Qi C., Korenberg J. R., Chen X. N., Noya D., Rao M. S. and Reddy J. K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7921-7925.
- Zlokovic B. V., Martel C. L., Matsubara E., McComb J. G., Zheng G., McCluskey R. T., Frangione B. and Ghiso J. (1996) Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 4229-4234.
- Zoellner H., Hofler M., Beckmann R., Hufnagl P., Vanyek E., Bielek E., Wojta J., Fabry A., Lockie S. and Binder B. R. (1996) Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. *Journal of cell science* **109 (Pt 10)**, 2571-2580.
- Zschocke J., Bayatti N. and Behl C. (2005) Caveolin and GLT-1 gene expression is reciprocally regulated in primary astrocytes: association of GLT-1 with non-caveolar lipid rafts. *Glia* **49**, 275-287.