

# VNiVERSiDAD DSALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQVÍMICA y Biología Molecular



### INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS (FABPS), EN LA CADENA DE SEÑALIZACIÓN DEL EFECTO NEUROTRÓFICO DEL ÁCIDO OLEICO EN NEURONAS

> ÁNGEL ALBERTO ARROYO MARTÍN 2012

D. JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ, Catedrático de Universidad, y Dª. 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: "Papel de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABPs), en la cadena de señalización del efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas", realizada bajo su dirección por el Licenciado en Química y Bioquímica, D. Ángel Alberto Arroyo Martín, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, firman el documento, en Salamanca a 09 de Julio de 2012.

Fdo. José María Medina Jiménez

Fdo. Aránzazu Tabernero Urbieta

### ILMO SR. DR. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

### Agradecimientos

Es el momento de agradecer a las personas que me han enseñado y ayudado, y han compartido conmigo el tiempo durante el que se ha gestado este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis por su ayuda y dirección. Al Dr. José María Medina, por haberme dado la oportunidad y el soporte para realizar el presente trabajo, y por compartir sus amplios conocimientos, tanto científicos, como "mundanos" cuando se presentaba la ocasión. A la Dra. Arantxa Tabernero, que me acogió inicialmente en mi intención de trabajar en el laboratorio, por guiarme en el trabajo, transmitirme optimismo y corregirme cuando era lo indicado. Por ser una persona siempre dispuesta a escuchar, ser capaz de sacar un momento a pesar de la ingente cantidad de trabajo sobre sus espaldas y recordar de qué le hablaba cuando la asaltaba con dudas y preguntas.

A la Dra. Josefina Martín Barrientos, por su ayuda incondicional, su paciencia en la gestión del laboratorio y su sentido del humor en los cafés y comidas.

A la Dra. Ana Velasco, madre de dos preciosas criaturas que he visto crecer en este tiempo, y *"madre",* en el buen sentido, de todos los *niños* del laboratorio 15. Ánimo y mucha suerte. A los Dres. Mª Ángeles Serrano y Enrique Villar, por sus palabras y consejos, y por toda la ayuda prestada en estos años.

A los Dres. Juan Pedro Bolaños y Ángeles Almeida, por la ayuda prestada durante el desarrollo de esta Tesis y por su generosidad. Al Dr. Emilio Fernández, por su ayuda en la gestión de los animales y por tener siempre abierta la puerta de su despacho para solventar cualquier duda o problema, mucha suerte en la actual dirección del departamento.

A los Dres. Luciano Muñoz Barragán y Mª Benita Gómez Esteban, por permitirme participar en su trabajo.

A los Dres. Juan Carlos Arévalo y Enrique López Poveda, por su ayuda y por cederme el uso de la aplicación de software para el análisis de colocalización de imágenes.

A la Dra Victoria García por sus consejos y su ayuda en la impartición de las prácticas de laboratorio de Farmacia.

A Tomy del Rey, integrante del antiguo laboratorio 129 y que todavía continúa echándonos una mano para evitar que el laboratorio sea "una selva sin control". Se te echa de menos: cuídate mucho. A Javier Escudero, por su ayuda con todas las gestiones administrativas.

A la parte importante de la "vida laboral, y también social" durante estos años, mis compañeros de laboratorios, antes y después del traslado al edificio *inteligente y con vistas* (soy el último de los *peques* que vivió la gloriosa mudanza...). A Ester que me ha acompañado estos últimos años, y con la he compartido *un año viajero*, por hacerme menos irresponsable y transmitirme alegría con su sonrisa. A Maruan, *el presidente*, por su vitalidad y a quién deseo mucho ánimo con la recuperación: Ánimo y paciencia. A Marta por soportar mis sustos y bromas, sabes que son con buena intención, y por ser paciente conmigo. A Ana "G." por su espíritu y su inestimable ayuda con el alemán. A la última incorporación, mi "vecina" de laboratorios 122 y 129, y ocasionalmente, 119: A Vega y Erica que me acogieron y enseñaron el maravilloso mundo de los cultivos *in vitro y ex vivo (creo ser de los últimos en comerme un pollo a la Vega...*), pero sobre todo, por todos los buenos

ratos de café. A André, por sus enseñanzas y recomendaciones. A Lourdes, a quien no conocí hasta mucho tiempo después de llevar intercambiados numerosos correos, por su energía, y su ayuda y consejos durante la continuación de su trabajo de Alzheimer. A los miembros de la línea de *las conexinas*, Teresa, Sandra y José Carlos, por los buenos ratos pasados. Y por último, al "reciente" doctor, a Alex, el jedi que me tuvo como padawan brevemente, y con el que he compartido muchas horas de laboratorio y he vivido los momentos buenos y aquellos en los que no salen las cosas.

My gratitude to Prof. Hannah Monyer from Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums – Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), at Heidelberg, for the opportunity to be in her lab and the chance to learn new techniques, and participate in her research projects and interesting lab meetings. Special thanks to Dr. Julieta Alfonso and Dr. Corentin Le Magueresse for helping me during my stay and their guidance in the work. Thank you, all of you, Kostia, Jacob, Verena, Sarah, Magda, Antonio, Elke, Christina, Kevin, Annalisa, Yasu, Sebastian Thilemann, Anton, Oleg, Zhijun, Sebastian Wieland, Ulla... for your help and the meal's times during my stay. Thank you so much, Dr. Anne Herb and Ms Laura Winkel for making me easy the incorporation to the laboratory and helping with the administrative requirements. Thank you, Ms Irmgard Preugschat-Gumprecht and Ms Regina Hinz-Herkommer, both of you, made me feel like at home during my stay in the lab.

A los compañeros del laboratorio 102, ahora integrantes del 122 y 128, futuros integrantes del IBFG, a los que todavía siguen y a los se encuentran repartidos por múltiples laboratorios. A la Dra. María Delgado, a Nacho, Ángel, Rubén, Mónica, Patricia, Seila, Verónica,... por los momentos vividos, especialmente en las cenas y los congresos.

A los compañeros de Biología Celular, Carmela, Gloria, Fernando, Azucena, David, Miguel, y todos los que me dejo en el tintero, por toda la ayuda prestada y los ratos fuera del trabajo. A Verónica, del laboratorio 13, por sus palabras y consejos dentro y fuera del INCyL.

A los miembros del racimo de bioquímica, Raquel, Julia, Mercedes, Ariadna, Pilar y Néstor, por las risas, los viajes y los cafés.

A los amigos, los que me han soportado durante ya bastante tiempo, en los buenos y malos momentos. A Ro. A Noe, Pablo y Marta. A Olga (*best-friend ever*), a pesar de que me llames viejo, y porque las clases con D. Julio y las horas compartidas son ya muchas. A Jesús por toda su ayuda y sus consejos, por los cafés y las noches de póker a las que se incorporaba María, la hermana de uno de los siguientes. A esos dos caballeros de escapadas y vivencias, que me conocen desde hace ya demasiado tiempo, y a pesar de todo me llaman amigo, Javier y José Carlos (siempre *Berme*). Porque ya son como de la familia.

A mi *tía* Olga y toda la *familia gallega* y, en recuerdo de Manolo ahora que no está, por ser inspiración para el trabajo y por su perseverancia en el día a día.

A los más importantes, los que de verdad han hecho esto posible, mis padres. Porque todo lo que bueno que diga de ellos será poco, porque me lo han dado todo y siguen haciéndolo día a día, por aguantarme, por enseñarme, por quererme, y por querer que ante todo y sobre todo crezca y sea mejor persona. Gracias por todo. Os quiero.

Y agradecido de tos aquellos que me he dejado y que me han ayudado en este tiempo, espero que perdonéis mi mala memoria y sepáis que tenéis mi agradecimiento y mi cariño.

### Abreviaturas

AcbC: núcleo Accumbens

ADP: adenosine difosfato

AFP: alfa-fetoproteína

AMPS: persulfato amónico

ANOVA: análisis de varianza

ATP: adenosina trifosfato

BDNF: factor de crecimiento derivado del cerebro

bHLH: motivo hélice-giro-hélice (basic Helix loop Helix)

BLBP: proteína de unión a ácidos grasos cerebral

BMP: proteína transformadora ósea (bone mophogenetic protein)

BP: progenitor basal

BrdU: 5 bromo-2'-desoxiuridina

BSA: albúmina sérica bovina

BSA +Oleico: complejo albúmina + ácido oleico

CAMK-II: proteína kinasa II dependiente de calcio/calmodulina

CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

CC: Cuerpo calloso

CP: placa cortical

CPI: plexo coroideo

CRABP: proteína de union a ácido retinoico

CRBP: proteína de unión a retinol

Cy3: cianina 3

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro

DCX: doblecortina, proteína marcadora de migración neuronal

DEPC: dietilpirocarbonato

DHA: ácido docosahexanoico

DIV: días in vitro

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's médium)

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

DTT: ditiotreitol

E: día embrionario

EBSS: solución balanceada de Earle

FABP: proteínas de unión y transporte de ácidos grasos

FAT: translocador de ácidos grasos

FATP: transportador (putativo) de ácidos grasos

FCS: suero fetal bovino

FL: capa filamentosa

GABA: ácido gamma aminobutírico

GAP43: proteína asocidada al crecimiento axonal 43

GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: proteína ácida glial

H: hipocampo

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (high performance liquid chromatography)

IFL: capa filamentosa interna

IGF: factor de crecimiento insulínico (insulin-like growth factor)

IP: yoduro de propidio

IPC: célula precursora intermedia

ISVZ: zona subventricular interna

IZ: zona intermedia

kDA: kiloDalton

KO: knock-out. Ratón modificado genéticamente para que alguno de sus genes esté inactivo

LCFA: ácidos grasos de cadena larga

LCR: líquido cefalorraquídeo

LGE: eminencia ganglionar lateral

LMS: corriente migratoria lateral

LPL: lipoproteína lipasa

LV: ventrículo lateral

MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2

MGE: eminencia ganglionar medial

MD: medio definido

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MTT: 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MZ: zona marginal

NCAM: molécula de adhesión celular neuronal

NCx: neocórtex

NE: neuroepitelio

NGF: factor de crecimiento nervioso

NT-siRNA: ácido ribonucleico de cadena corta sin diana

Oleico: ácido oleico

OFL: capa filamentosa externa

OSVZ: zona subventricular externa

P: día postnatal

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDH: piruvato deshidrogenasa

PKA: proteína kinasa A

PKC: proteína kinasa C

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro

PP: preplaca

PPARs: receptores activados por proliferadores de peroxisomas

PUFA: ácido graso poliinsaturado

p/v: relación peso/volumen

RA: ácido retinoico

RE: retículo endoplasmático

- RGC: células de la glía radial
- RMS: corriente migratoria rostral
- RNA: ácido ribonucleico
- RT: retrotranscripción o transcripción inversa
- RXR: receptor X de retinoico
- SCD: estearil-CoA desaturasa
- SDS: docecilsulfato sódico
- SEM: error estándar de la media
- siRNA: RNA de interferencia de cadena corta
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SNP: Sistema Nervioso Periférico
- SP: subplaca
- SREBP ó SREBF: factor de unión al elemento regulado por estrógenos
- SSC: tampón citrato sódico
- Str: núcleo estriado
- SVZ: zona subventricular
- TAE: tris acetato
- TBS: tampón Tris salino
- TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- TUJ1: tubulina beta-III específica de neuronas
- TUNEL: marcaje de extremos mellados con dUTP mediado por la desoxinucleotidil
- transferasa terminal (Terminal transferasemediated dUTP Nick End Labelling)
- UTR: región no traducible
- VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad
- VLDLR: receptor de lipoproteínas de muy baja densidad
- VZ: zona ventricular
- WB: transferencia tipo Western-blot

### Correspondencia entre las FABPs y nomenclatura alternativa:

FABP1  $\equiv$  L-FABP  $\equiv$  Hepática

FABP2 E I-FABP E Intestinal

FABP3 E H-FABP E Muscular o del corazón E MDGI (inhibidor del crecimiento derivado de

### Mamíferos)

FABP4  $\Xi$  A-FABP  $\Xi$  Adipocito

FABP5 E E-FABP E Epidérminca E PA-FABP o asociada a psoriasis

E S-FABP ó C-FABP, de la piel o cutánea

Ξ K-FABP ó proteína de unión a lípidos en keratinocitos

Ξ DA11

FABP6 EII-FABP E Íleon E Gastrotropina

FABP7  $\Xi$  B-FABP  $\Xi$  Cerebral  $\Xi$  BLBP

FABP8 E M-FABP E Mielina E MP2

FABP9 E T-FABP E Teticular

### SUMARIO:

> 1 INTRODUCCIÓN	.1
1.1. Desarrollo del Sistema Nervioso Central	.3
1.1.1. Desarrollo celular del Sistema Nervioso Central	3
1.1.2. Células madre neurales y progenitores celulares	5
1.1.2.1. Células neuroepiteliales	.6
1.1.2.2. Glía radial	.7
<b>1.1.2.3.</b> Progenitores basales o progenitores de la "zona subventricular" (SVZ)	.7
1.1.3. Desarrollo neuronal del Sistema Nervioso Central	7
1.1.3.1. Neurogénesis	. 8
1.1.3.1.1. Neurogénesis adulta	. 12
1.1.3.1.2. Factores que afectan a la proliferación neuronal	. 12
1.1.3.1.3. Tipos neuronales principales de la corteza cerebral	. 13
1.1.1.1.1.1. Neuronas glutamatérgicas: neuronas piramidales	. 13
1.1.1.1.1.2. Interneuronas GABAérgicas	. 15
1.1.1.2. Migración neuronal1	16
1.1.1.2.1. Migración tangencial de las interneuronas corticales	. 18
1.1.1.2.2. Migración tangencial: la corriente migratoria rostral y la migración postnatal y en el adulto	. 18
1.1.1.2.3. Factores que influyen en la migración de las neuronas de la corteza	. 20
1.1.1.2.3.1. El "leading process" o proceso de guía	. 20
1.1.1.2.3.2. Señales que dirigen la migración neuronal	. 20
1.1.1.3. Agregación neuronal	22
1.1.1.4.1. El "sustrato permisivo" y factores que favorecen la diferenciación	. 24
1.1.1.4.2. GAP43, proteína asociada al crecimiento axonal	. 24
1.1.1.4.3. MAPs, proteínas asociadas a microtúbulos	. 26
1.1.1.5. Sinaptogénesis	28
1.1.1.6. Muerte neuronal	28
1.2. Ácidos grasos y Sistema Nervioso Central	. 29

1.2	2.1. Pro	oteínas transportadoras de ácidos grasos	30
	1.2.1.1.	Albúmina	
	1.2.1.1.	1. Estructura y unión a ligandos	32
	1.2.1.1.	2. La albúmina en el Sistema Nervioso Central	34
	1.2.1.2.	Proteínas de unión a ácidos grasos, FABPs	35
	1.2.1.2.	1. Tipos de FABPs presentes en el Sistema Nervioso Central	
	1.2.1	.2.1.1. FABP3 (H-FABP)	39
	1.2.1	.2.1.2. FABP5 (E-FABP)	39
	1.2.1	.2.1.3. FABP7 (B-FABP)	40
1.2	2.2. El a	ácido oleico en el sistema nervioso	40
	1.2.2.1.	Características generales	40
	1.2.2.2.	Biosíntesis, localización	40
	1.2.2.3.	Efecto axonogénico durante la diferenciación neuronal	43
1.2	.3. Prote	eína kinasa C	
	1.2.3.1.	Proteína kinasa C alfa (PKCα)	46
	1.2.3.2.	Proteína kinasa C épsilon (PKC ε)	47
$\triangleright$	2 PLAN I	DE TRABAJO	49
$\triangleright$	3 MATEI	RIAL Y MÉTODOS	53
3.1	. Mate	rial	55
3.1	1.1. Esp	pecie ensayada y condiciones del animalario.	55
3.1	1.2. Me	edios instrumentales	55
3.1	1.1. Pro	oductos	58
	3.1.1.1.	Productos utilizados en la preparación de los medios de crecim	niento
	para los cu	ultivos celulares primarios	58
	3.1.1.2.	Productos utilizados para la preparación de cultivos tisulares	58
	3.1.1.3.	Productos utilizados para la preparación de la albúmina libre d	le ácidos
	grasos		59
	3.1.1.5.	Productos empleados para el silenciamiento génico	59

3.1.1.0	6. Productos utilizados para el análisis de las proteínas
3.1.1.7	7. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad celular61
3.1.1.8	8. Productos utilizados en la determinación de la muerte celular
3.1.1.9	9. Productos utilizados en los tratamientos celulares
3.1.1.1	10. Otros productos
3.2. N	Aétodos
3.2.1.	Preparación de los cultivos celulares63
3.2.1.2	<b>1.</b> Preparación del cultivo primario de astrocitos63
3.2.1.2	2. Preparación de cultivo primario de neuronas
3.2.2.	Preparación de los cultivos tisulares64
3.2.2.2	<b>1. Preparación de los cultivos organotípicos de rodajas de cerebro</b> 64
3.2.3.	Preparación de la albúmina libre de ácidos grasos65
3.2.4.	Preparación de los tratamientos empleados en los cultivos65
3.2.4.2	1. Tratamientos en astrocitos
3.2.4.2	2. Tratamientos en neuronas
3.2.4.3	3. Tratamientos en cultivos organotípicos
3.2.4.4 de tiaz	4. Medida de la viabilidad celular por el método de reducción del bromuro zol azul de tetrazolio MTT
3.2.4.! produ	5. Medida temprana mediante el método de la <i>AnexinaV</i> de la muerte icida por apoptosis
3.2.4.0	6. Medida mediante el método de TUNEL de la muerte por apoptosis 69
3.2.5.	<b>RT-PCR</b>
3.2.5.2	1. Extracción del RNA total de los cultivos70
3.2.5.2	2. Cuantificación del RNA70
3.2.5.3	3. Transcripción inversa (Retrotranscripción, RT)71
3.2.5.4	4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)71
3.2.5.	5. Electroforesis de DNA
3.2.6.	Transfección con RNAs de interferencia específicos de cadena corta (siRNA) 

<b>3.2.7.</b> Obtención y preparación de los cortes histológicos
<b>3.2.7.1.</b> Fijación del tejido74
<b>3.2.7.2.</b> Obtención de los cortes histológicos75
<b>3.2.8. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western-blot</b>
<b>3.2.8.1.</b> Extracción de proteínas de neuronas75
<b>3.2.8.2.</b> Extracción de proteínas de astrocitos75
<b>3.2.8.3.</b> Extracción de proteínas de las rodajas del cultivo organotípico
<b>3.2.8.4.</b> Cuantificación de proteínas
<b>3.2.8.4.1. Método Bradford</b>
<b>3.2.8.4.2.</b> Análisis en el fluorímetro Qubit con el kit de análisis de proteínas 76
<b>3.2.8.4.3.</b> Análisis en un nanofotómetro77
3.2.8.5. Preparación de los geles de poliacrilamida78
<b>3.2.8.6.</b> Preparación de las muestras para la electroforesis
<b>3.2.8.7.</b> Electroforesis de las muestras para la electroforesis
<b>3.2.8.8.</b> Electrotransferencia79
<b>3.2.8.9.</b> Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana
<b>3.2.8.10. Inmunodetección</b>
<b>3.2.9.</b> Inmunofluorescencia80
3.2.9.1. Preparación del medio gelificante y preservador de la fluorescencia,
<b>Mowiol</b> 81
<b>3.2.9.2.</b> Inmunocitoquímica
<b>3.2.9.3.</b> Inmunohistoquimica
<b>3.2.10.</b> Análisis de la colocalización inmunocitoquímica e inmunohistoquímica 83
<b>3.2.11.</b> Análisis estadístico
> 4 RESULTADOS
4.1. Expresión de las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) en neuronas y
astrocitos en cultivo primario8

4.1.1. mediant	Loca te técni	alización de las FABPs en neuronas y astrocitos en cultivo primario cas inmunocitoquímicas
4.1.2. Westerr	Det n-blot e	erminación de la expresión de las FABPs mediante transferencia tipo n neuronas en cultivo primario88
4.2. por comp	Efecto plejo al	del silenciamiento de las FABPs sobre el efecto neurotrófico promovido búmina + ácido oleico en neuronas en cultivo
4.2.1. cultivo p	Opt orimario	imización de las condiciones de transfección de los siRNA en neuronas en 0
4.2.2.	Efeo	to del silenciamiento de FABP5 sobre la morfología neuronal90
4.2.	2.1.	Efecto del silenciamiento de FABP5 en la morfología neuronal90
4.2.	2.2.	Efecto del silenciamiento de FABP5 en la viabilidad neuronal91
4.2. neu	2.3. ronal	Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre la apoptosis y necrosis 
4.2.	2.4.	Efecto del silenciamiento de la FABP5 sobre la diferenciación neuronal 
4.2.3. neurona	Efec	to del silenciamiento de FABP3 en la morfología y diferenciación
4.2.4. neurona	Efeo al	cto del silenciamiento de FABP7 sobre la morfología y la diferenciación 
4.3.	Intera	cción de la albúmina con la FABP5 en neuronas en cultivo primario95
4.4.	Estudi	o de la posible interacción de FABP7 y PPAR $\alpha$ en neuronas en cultivo
primario		
4.5.	Estudi	o de la localización de la FABP3 y GAP43 en neuronas en cultivo primario 
4.6.	Estudi	o de la localización de las FABPs en cortes de cerebro de rata postnatal. 
4.7. cultivos d	Estudi organot	o del papel de las FABPs en el efecto neurotrófico del ácido oleico en iípicos de cerebro de rata
4.7.1. diferenc	Estu Liación	udio del papel de la FABP3 en el efecto del ácido oleico sobre la neuronal en cultivos organotípicos
4.7. por	1.1. el com	Estudio del efecto del silenciamiento de FABP3 en el efecto promovido plejo albúmina + oleico en cultivos organotípicos101

**4.7.2.** Estudio del posible papel de la FABP7 en el efecto del complejo albúmina + ácido oleico sobre la migración neuronal en cultivos organotípicos......102

<b>4.7.2.1.</b> Estudio del silenciamiento de FABP7 en el efecto promovido por el ácido oleico en cultivos organotípicos
4.7.3. Estudio de la localización de la FABP5 en presencia del ácido oleico en cultivos organotípicos
4.8. Análisis de las isoformas de la PKC implicadas en el efecto neurotrófico del
ácido oleico en neuronas en cultivo primario
<b>4.8.1.</b> Participación de isoforma PKCα en el efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas en cultivo primario
4.8.2. Participación de la PKCε en la diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico en neuronas en cultivo primario
5 DISCUSIÓN
6 CONCLUSIONES
7 Bibliografía
Anexo I

### Índice de esquemas y figuras:

Esquema 1 Formación del tubo neural	4
Esquema 2 Tipos de proliferación celular y linajes neurogénicos	5
Esquema 3 Migración intercinética nuclear	6
Esquema 4 Progenitores generados en la VZ y la SVZ	9
Esquema 5 Desarrollo cortical del cerebro de roedores y primates	11
Esquema 6 Reconstrucción de una neurona piramidal	14
Esquema 7 Reconstrucción de una interneurona GABAérgica	15
Esquema 8 Esquema de los tipos de migración de las neuronas de proyección de la co cerebral	rteza 16
Esquema 9 Migración neuronal durante el desarrollo embrionario	17
Esquema 10 Migración de los precursores neuronales a través de la corriente migratoria	а
rostral	19
Esquema 11 Mecanismos de control de la migración de las células piramidales e interne	en-
ronas en el córtex cerebral	21
Esquema 12Localización inmunocitoquímica de las proteínas GAP43 y MAP2 en neuron	as
en cultivo primario	23
Esquema 13 Transporte de lípidos e interacción con proteínas de unión transporte o int	ter-
cambio de lípidos	30
Tabla 1.1 Características de las tres grandes superfamilias de proteínas de unión a lípido	SS
	31
Esquema 14 Conformación y sitios de unión a ligandos de la albúmina	32
Esquema 15 Presencia de la albúmina en el Sistema Nervioso Central	34
Tabla 1.2 Distribución de las formas de las FABPs en los diferentes tejidos	36

Esquema 16 Unión a ligandos y estructura terciaria de las FABPs
Esquema 17 Mecanismo de síntesis del ácido oleico en astrocitos41
Esquema 18 Esquema del efecto axonogénico en neuronas promovido por el complejo
albúmina + ácido oleico generado por los astrocitos43
Esquema 19 Regiones estructurales de las proteínas pertencientes a las tres subfamilias de
las PKCs45
Esquema 20 Activación de GAP43 por fosforilación de PKC y dominio de ésta implicado en
la fosforilación46
Tabla 3.1 Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia y "Western-blot"61
Esquema 21 Fundamento bioquímico del método de determinación de la viabilidad celular
MTT67
Esquema 22 Esquema general del método de determinación de apoptosis con Anexina V
Tabla.3.2 Condiciones de la PCR y secuencia de nucleótidos de los cebadores71
Tabla.3.3a Secuencias de nucleótidos de los siRNAs72
Tabla.3.3b Secuencia de nucleótidos de los siRNAs (continuación)73
Esquema 23 Fundamento molecular del método de silenciamiento con siRNA73
Esquema 24 Esquema del protocolo de preparación de muestras con el método Qubit77
Figuras de Resultados:
Fig.1 Localización inmunocitoquímica de las FABPs en astrocitos en cultivo primario109
Fig.2 Localización inmunocitoquímica de las FABPs en neuronas en cultivo primario110
<ul> <li>Fig.3 Efecto del ácido oleico sobre los niveles de los marcadores de diferenciación neuronal, MAP2 y GAP43 en neuronas en cultivo primario</li></ul>

Fig.5 C	Optimización de las condiciones de silenciamiento con la tecnología de siRNA en neu- ronas en cultivo primario113
Fig. 6	Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre los niveles de mRNA de FABP5 a las 24
-	horas de cultivo114
Fig.7 E	fecto del silenciamiento de FABP5 sobre los niveles de mRNA de FABP5 a las 48 Horas de cultivo115
Fig.8 E	fecto del silenciamiento de FABP5 en la morfología de neuronas en cultivo primario 
Fig.9 E	fecto del silenciamiento de FABP5 sobre la viabilidad celular medida por el método
	Del MTT en neuronas en cultivo primario117
Fig.10	Efecto del ácido oleico sobre la viabilidad de las neuronas en cultivo primario118
Fig.11	Determinación de la muerte celular por apoptosis inducida por el silenciamiento de FABP5 mediante la técnica de tinción con <i>Anexina V</i> 119
Fig.12	Cuantificación de los resultados de muerte neuronal por apoptosis inducida por el silenciamiento de FABP5120
Fig.13	Determinación mediante la técnica de TUNEL de la muerte celular por apoptosis inducida por el silenciamiento de FABP5121
Fig.14	Cuantificación de las células teñidas por la técnica TUNEL tras el silenciamiento de FABP5
Fig.15	Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre los niveles de expresión de MAP2, GAP43 y TUJ1 en neuronas en cultivo primario123
Fig.16	Efecto del silenciamiento de FABP3 en la morfología de neurona en cultivo primario
Fig.17	Efecto del silenciamiento de FABP3 sobre los niveles de expresión de MAP2 y GAP43
	en neuronas en cultivo primario125
Fig.18	Efecto del silenciamiento de FABP7 en la morfología de neuronas en cultivo primario
Fig.19	Efecto del silenciamiento de FABP7 sobre los niveles de expresión de MAP2 y GAP43 
Fig.20	Colocalización inmunocitoquímica de FABP5 y albúmina sérica bovina (BSA) en neuronas en cultivo primario128
Fig.21	Localización inmunocitoquímica de FABP7 y PPARα en neuronas en cultivo primario tras 15 minutos de incubación con albúmina o el complejo albúmina + ácido oleico 
Fig.22	Localización inmunocitoquímica de FABP3, GAP43 y Mitotracker en neuronas en en presencia de albúmina
Fig.23	Colocalización inmunocitoquímica de FABP3, GAP43 y Mitotracker en neuronas en cultivo primario en presencia del complejo albúmina + oleico
Fig.24	Colocalización inmunocitoquímica de FABP3 y Mitotracker en neuronas en cultivo primario en presencia del complejo albúmina + ácido oleico
Fig.25	Colocalización inmuoncitoquímica de FABP3 y GAP43 en neuronas en cultivo primario en presencia del complejo albúmina + ácido oleico

Fig.26 Localización inmunohistoquímica de las FABPs en cortes coronales de cerebro de
rata de uno y tres días de vida postnatal (P1 y P3)134
Fig.27 Localización inmunohistoquímica de las FABPs y de la GAP43 en cortes coronales de
cerebro de rata de un día de vida postnatal (P1)
Fig.28 Localización inmunohistoquímica de las FABPs y de la GAP43 en cortes coronales de
cerebro de rata de tres días de vida postnatal (P3)
Fig.29 Localización inmunohistoquímica de FABP3 y MAP2 en cortes coronales de rata en la
etapa postnatal temprana137
Fig.30 Localización inmunohistoquímica de la FABP5 y de la MAP2 en cortes coronales de
cerebro de rata de un día de vida postnatal138
Fig.31 Efecto del ácido oleico en la axonogénesis determinada mediante el marcador de
diferenciación axonal, GAP43, en cultivos organotípicos
Fig.32Efecto del ácido oleico en la localización axonal de GAP43 y FABP3 en cultivos
organotípicos
Fig.33 Efecto del ácido oleico en la localización de MAP2 y FABP3 en cultivos organotípicos
Fig.34 Efecto del silenciamiento de FABP3 sobre los niveles de expresión de MAP2 y GAP43
en cultivo organotípico
Fig.35 Efecto del ácido oleico en la migración y la axonogénesis determinada mediante los
marcadores de migración. DCX. v de la diferenciación axonal. GAP43. en cultivo
organotípico
Fig.36 Efecto del ácido oleico sobre la localización de la DCX y la FABP7 en cultivos
organotípicos
Fig.37 Efecto del silenciamiento de FABP7 sobre los niveles de expresión de MAP2 y GAP43
en cultivos organotípicos
Fig.38 Localización de la FABP5, la GAP43 y la DCX en presencia del complejo albúmina +
ácido oleico en rodajas de cultivo organotípico146
Fig.39Determinación mediante la técnica de tinción TUNEL de la muerte celular por
apoptosis inducida por el silenciamiento de FABP5147
Fig.40 Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre la apoptosis celular en rodajas de cultivo
organotípico
Fig.41 Expresión del RNA de las distintas isoformas de PKC en neuronas y cerebro de rata
Fig.42 Efecto de la inhibición de la PKCα en la morfología de neuronas en cultivo primario
150
Fig.43 Efecto de la inhibición de PKC $\alpha/\beta$ en la diferenciación neuronal promovida por el
ácido oleico en neuronas en cultivo primario
Fig.44 Efecto del silenciamiento de PKC $\alpha$ en la morfología de neuronas en cultivo primario
152

Fig.45	Efecto del silenciamiento de PKC $lpha$ sobre el efecto en la diferenciación neuronal
	promovida por el ácido oleico en neuronas en cultivo primario153
Fig.46	Efecto de la inhibición o activación de PKCɛ en la morfología de neuronas en cultivo
	primario154
Fig.47	Determinación de la ausencia de efectos cruzados en el silenciamiento de PKCa con
	respecto al silenciamiento de PKC en neuronas en cultivo primario155
Fig.48	Efecto de la inhibición o la activación de PKC sobre la diferenciación neuronal
	promovida por el ácido oleico156
Fig.49	Efecto del silenciamiento de PKC en la morfología de neuronas en cultivo primario
Fig.50	Efecto del silenciamiento de PKC sobre la diferenciación neuronal promovida por
	el ácido oleico en neuronas en cultivo primario158
Fig.51	Representación esquemática de las secciones empleadas en los cultivos
	organotípicos193
Fig.52	Efecto del silenciamiento de FABP5 en la viabilidad neuronal medida por el método
	MTT, en neuronas en cultivo primario194

INTRODUCCIÓN MATERIAL Y MÉTODOS PLAN DE TRABAJO DISCUSIÓN Discusión CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

## ▶ 1.- INTRODUCCIÓN

1

INTRODUCCIÓN
PLAN DE TRABAJO
MATERIAL Y MÉTODOS
RESULTADOS
Discusión
CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

### 1.1. Desarrollo del Sistema Nervioso Central

### 1.1.1. Desarrollo celular del Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central es una entidad anatómica protegida eficazmente de los traumas externos mediante formaciones óseas, como son el cráneo y la columna vertebral. Cada una de las tareas funcionales realizadas por el sistema nervioso maduro, desde la percepción de señales sensitivas y el control de las funciones motoras hasta las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria, dependen de la existencia de unas interconexiones muy precisas entre muchos millones de neuronas. Estas conexiones se establecen durante el desarrollo embrionario y postnatal. Hace más de un siglo, Santiago Ramón y Cajal emprendió una serie de estudios anatómicos, que culminaron con una apreciación más precisa de la estructura y organización del sistema nervioso. Sin embargo, aún hoy, existen muchas incógnitas sobre el desarrollo del Sistema Nervioso Central, y los estudios más recientes tratan de descubrir los procesos celulares y moleculares que sirven de base a la formación de los circuitos nerviosos que ya describió Ramón y Cajal (Ramón y Cajal 1911a; Ramón y Cajal 1911b). El desarrollo del sistema nervioso durante las distintas fases del desarrollo.

El sistema nervioso comienza a desarrollarse en un estadio relativamente tardío de la embriogénesis en el ser humano. Cuando empieza a formarse ya se han generado tres capas celulares principales: el endodermo, el mesodermo, y el ectodermo. El sistema nervioso se origina por modificación y sucesiva evolución del ectodermo del embrión, mediante un proceso conocido como neurulación. La invaginación de la blástula crea la placa neural que, al cerrarse sobre sí misma, formará el tubo neural que, posteriormente dará lugar al encéfalo y a la médula espinal. En la línea donde el tubo neural se despega del ectodermo, un cierto número de células migran desde el epitelio hacia el mesodermo. Éstas son las células de la cresta neural, que formarán el sistema nervioso periférico (Ver detalles recogidos en el Esquema 1).

El neuroepitelio, es decir, la zona modificada del ectodermo durante el desarrollo y que forma el tubo neural, está formado por una sola capa de células, denominadas neuroblastos o células madre neurales. Una vez acabada la formación de los neuroblastos, se forma otro tipo celular, los glioblastos. Clásicamente, los neuroblastos son las células que dan origen a las neuronas funcionales y maduras, mientras que los glioblastos dan dos tipos de células maduras: los astroblastos, que se convierten en astrocitos, y los oligodendroblastos, que dan lugar a los oligodendrocitos. En la actualidad, esta estructuración básica y sencilla ha sufrido pequeñas modificaciones, gracias a un mejor conocimiento de la diferenciación y desdiferenciación celulares, por lo que no existen unas divisiones tan claras entre los precursores de los linajes celulares, así como se han descubierto nuevos factores y nuevos "tiempos" en las diversas áreas cerebrales, como veremos más adelante.



### Esquema 1.- Formación del tubo neural

Pliegue secuencial de la placa neural para formar el tubo neural. (A) Posición de la placa neural en relación con el ectodermo no neural, el mesodermo y el ectodermo. (B) Plegamiento de la placa neural para formar el surco neural. (C) Cierre dorsal de los pliegues neurales para formar el tubo neural. (D) Maduración del tubo neural y su posición en relación con la estructura mesodérmica, la notocorda y los somitas (derivados del mesodermo para-axial) (Modificado de Kandel, ER et al. que, a su vez, hace uso de fotomicrografías electrónicas de barrido, de embriones de pollo, cedidas por G. Schoenwolf).

# INTRODUCCIÓN

### 1.1.2. Células madre neurales y progenitores celulares

Una de las clasificaciones de los estadios celulares más aceptada en la actualidad está basada en la aplicación de dos criterios para definir una célula como célula madre, que son la *autorrenovación* o *multiplicidad*, es decir, la capacidad para dividirse un número ilimitado de divisiones celulares, y la *multipotencialidad*, que es la capacidad de generar diferentes tipos de células diferenciadas. La multiplicidad puede dar lugar a divisiones simétricas, generando dos células hijas totalmente iguales, o a divisiones asimétricas, produciendo una célula idéntica a la célula madre original y una segunda célula de diferente tipo. Estas divisiones asimétricas son responsables de que en determinadas condiciones y nichos celulares se origine una neurona o un progenitor celular diferente (Ver Esquema 2).



### 1.1.2.1. Células neuroepiteliales

La placa y el tubo neural, previamente a la neurogénesis, están constituidas por una única capa de células, las células neuroepiteliales, que forman el ya mencionado neuroepitelio. Esta estructura parece estar pseudoestratificada y el núcleo de células neuroepiteliales migra arriba y abajo en el eje ápico-basal, durante el ciclo celular, en el fenómeno conocido como "migración intercinética nuclear" (Ver Esquema 3). Además, estas células están altamente polarizadas, debido a una distribución muy organizada en el eje ápico-basal de las proteínas de membrana. Proteínas de membrana tales como la prominina-1, las proteínas de uniones estrechas o "tight junctions" y las proteínas de uniones adherentes o "adherens junctions", están presentes en la cara apical de la membrana plasmática, mientras que algunos receptores, tales como la integrina- $\alpha$ 6, se concentran en la lámina basal.



### Esquema 3.- Migración intercinética nuclear

La figura muestra la organización polarizada y la migración intercinética nuclear de: (A) las células neuroepiteliales, (B) la glía radial y (C) los progenitores basales. A. - En las células neuroepiteliales, la migración intercinética nuclear abarca el eje ápico-basal entero de la célula. B.- En la glía radial, la migración intercinética nuclear está confinada a la región existente entre la cara apical y el límite de unión que separa la zona ventricular de la zona subventricular. C.- En el caso de los progenitores basales, el núcleo migra desde la cara apical al límite de unión de la zona ventricular con la zona subventricular, durante las fases S y M, y esto es concomitante con la retracción que sufren las células respecto de la cara apical. Los procesos basales de las células neuroepitelia-les y la glía radial continúan durante la mitosis (Modificado de Götz & Huttner, 2005).

#### 1.1.2.2. Glía radial

La generación de neuronas en el neuroepitelio induce la aparición de un tejido estratificado en numerosas capas. La capa adyacente al ventrículo, esto es, la capa más apical y que contiene la mayoría de los progenitores celulares, es la denominada zona ventricular. Cuando se inicia la neurogénesis, las células neuroepiteliales disminuyen la expresión de ciertas características epiteliales y modifican la distribución ápico-basal de ciertas proteínas de la membrana plasmática. Concomitantemente, aparecen en ellas características astrogliales. En consecuencia, y después del comienzo de la neurogénesis, las células neuroepiteliales originan un tipo celular, conocido como glía radial o células de la glía radial (RGC), que exhibe propiedades residuales neuroepiteliales, como la intercinética nuclear y, así mismo, propiedades astrogliales. Como consecuencia de esto, un gran número de neuronas del cerebro derivan, directa o indirectamente, de estas células neuroepiteliales en términos de potencialidad, en que su capacidad de autorrenovación es muy limitada y su diferenciación está restringida a la generación de determinados tipos celulares, tales como astrocitos y oligodendrocitos, dando origen, en la mayoría de los casos, a neuronas.

### **1.1.2.3.** Progenitores basales o progenitores de la "zona subventricular" (SVZ)

El otro tipo de progenitores neuronales, que junto a la glía radial contribuyen a la neurogénesis, se denominan progenitores basales. Proceden tanto de las células neuroepiteliales como de la glía radial, y se diferencian de ambos en que su núcleo migra de la cara apical a la cara basal durante la fase S hasta la fase M, originando células que se retraen de la cara apical. Por este motivo, los progenitores basales durante las etapas tardías de la neurogénesis forman la zona subventricular, una capa de células mitóticas, basal y adyacente a la zona ventricular (Gotz y Huttner, 2005). Este tipo de progenitores contribuyen a la neurogénesis mediante divisiones celulares simétricas, generando dos neuronas hijas.

### 1.1.3. Desarrollo neuronal del Sistema Nervioso Central

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: proliferación neuronal o neurogénesis, migración neuronal, agregación neuronal, diferenciación celular, sinaptogénesis y, por último muerte celular (Cowan 1987; Cowen and Heydrick 1972; Herschkowitz 1988).

### 1.1.3.1. Neurogénesis

El neuroepitelio, como ya se ha mencionado, es mitóticamente activo durante la formación del tubo neural, de tal manera que empiezan a formarse neuroblastos que se acumulan en la superficie ventricular del tubo neural. El período de 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 11 y 17 de la gestación (Caviness and Takahashi 1995) y en la rata comienza el día 13 y finaliza el día 19 de la gestación (Gohlke et al. 2004; Miller 1985). Comparativamente, la neurogénesis en la rata tiene lugar en un período de 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 humanas necesiten un período largo de adaptación al medio para poder ejercer funciones altamente especializadas, como son la memoria, el aprendizaje, etc (Rakic 1985). No obstante, para una misma especie animal, el período de proliferación neuronal varía según la región del Sistema Nervioso Central (Bayer 1995; Bayer 1985; Bayer et al. 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).

Se conocen tres gradientes neurogénicos durante el desarrollo de la corteza cerebral: radial, medio-lateral y antero-posterior (Bayer and Altman 1991) El gradiente radial, también conocido como patrón de neurogénesis desde dentro hacia fuera, supone una organización de la corteza, de tal forma que las neuronas que se originan primero van a ocupar las posiciones más profundas, en comparación con otras neuronas generadas posteriormente, que se dispondrán en capas más superficiales (McConnell 1988; Rakic 1974). Así mismo, está descrito que las neuronas originadas en las regiones laterales de la corteza sufren un desarrollo más rápido que aquéllas que se generan en regiones más mediales. Esto también ocurre con las regiones anteriores respecto de las posteriores (Bayer and Altman 1991).

La mayor parte de las neuronas corticales se generan en el epitelio pseudoestratificado que limita las cavidades ventriculares del tubo neural. Este epitelio, del cual hemos hablado en el apartado de progenitores celulares, se conoce como zona ventricular (VZ).

La neurogénesis se inicia con las primeras divisiones celulares simétricas proliferativas, en las que cada célula neuroepitelial genera dos de estos progenitores, expandiendo así el número de este tipo de células (Molyneaux et al. 2007) (Recordar lo descrito en el Esquema 2). A continuación ocurren muchas divisiones asimétricas, que generan una célula neuroepitelial y una neurona o una célula neuroepitelial y un progenitor neurogénico diferenciado (y sin la capacidad ilimitada de división celular), como la glía radial y los precursores neurales pequeños (Gal et al. 2006; Götz and Huttner 2005; Jessell and Sanes 2000; Noctor et al. 2004). La expansión de estos progenitores genera otra capa proliferativa, adyacente a la VZ, conocida como la zona subventricular (SVZ). Esta zona comienza a generarse en el ratón a partir del día 12,5 del período de gestación.

En la VZ se han identificado dos tipos de precursores corticales: las células de la glía radial (RGC) (Miyata et al. 2001; Noctor et al. 2001; Noctor et al. 2002) y las células neuroepiteliales (NE)(Götz and Huttner 2005). Las células progenitoras de la SVZ, es decir los progenitores basales (BP), se forman a partir de la VZ desde el día 13 prenatal en ratón y el día 15 prenatal en rata (E13 y E15, respectivamente) y su período neurogénico se extiende desde E14 a E17 en ratón, y desde E16 a E19 o E20 en rata, aunque puede extenderse hasta el momento del parto, considerándose este último período como la segunda neurogénesis embrionaria (Campbell 2005).



- durante las etapas del desarrollo y la etapa adulta. A medida que se estrecha el epitelio cerebral, las células neuroepiteliales se elongan y convierten en células de la glía radial (RGC). Las RGC pueden dar lugar a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, desde los progenitores intermedios (distinguiéndose, de esta forma nIPC y oIPC, respectivamente). (Modificado de Kriegstein & Álvarez-Buylla, 2011).
- (B) Se ha postulado que los progenitores de la VZ generan neuronas de las capas profundas que expresarán los genes Otx1 y Fez1, mientras que los progenitores de la SVZ generarían neuronas de las capas superficiales y expresarían los genes Cux2, Tbr2 y Svet1. Células de la glía radial (RGC), precursores pequeños neurales (SNP), progenitores celulares intermedios (IPC) (Modificado de Dehay & Kennedy 2007).

Los progenitores de la VZ y la SVZ expresan diferentes genes (Gal et al. 2006; Molyneaux et al. 2007) y estas diferencias parecen estar relacionadas con la progenie neuronal a la que dan lugar. Se ha postulado que los progenitores de la SVZ generan neuronas de las capas superficiales y expresan los genes Cux2, Tbr2, y Svet1, mientras que los progenitores de la VZ generan neuronas de las capas profundas y expresan los genes Otx1 y Fez1 (Dehay and Kennedy 2007) (Ver Esquema 4). Otra hipótesis sostiene que las células expresan de forma secuencial los diferentes factores de transcripción en su proceso de maduración, de forma independiente del precursor del que procedan (Hevner 2006; Hevner et al. 2006).

La corticogénesis, o desarrollo de la corteza cerebral difiere, entre los roedores y los primates (Ver Esquema 5. Modificado de Sanes (J. Sanes 2001)).

En el ratón, la neurogénesis cortical dura 8 días –desde el día 11 (E11,5) hasta el día 19 (E19) del período de gestación-, continuando la expansión del córtex visual durante 60 días. En primates, aparece de manera temprana –E55-, una capa fibrilar externa (OFL), la VZ se reduce progresivamente desde E65, mientras que la SVZ aumenta progresivamente en profundidad y a partir de E72 se divide en dos capas, la capa interna subventricular (ISVZ) y la capa externa subventricular (OSVZ), por la intrusión de una nueva capa fibrilar (IFL).

Comparativamente, las zonas proliferativas (VZ y SVZ) en los primates son mayores y además existe una importante expansión de la SVZ, que forma la zona externa subventricular (OSVZ), que no existe en los roedores. La OSVZ es, en los primates, la principal área de producción de neuronas, que se destinan a las capas superiores del neocórtex y se considera su existencia como una evolución adaptativa del córtex cerebral de los primates (Rash and Grove 2006). La OSVZ exhibe un patrón único y se parece histológicamente a la VZ, teniendo una organización radial compacta (Dehay and Kennedy 2007). La regulación de la corticogénesis y del modelado de la corteza cerebral está, aparentemente, controlado por las moléculas señalizadoras BMPs, Wnts, Shh y Fgf8, entre otras, que actúan en las zonas proliferativas neurogénicas generando factores para el correcto posicionamiento celular de la corteza (Fukuchi-Shimogori and Grove 2001; Garel et al. 2003; Herbert et al. 2002).



**Esquema 5.- Desarrollo** cortical embrionario del cerebro en roedores y

Comparación de la organización anatómica del córtex embrionario en estadíos del desarrollo comparables (Modificado de Dehay & Kennedy 2007). En la rata las primeras neuronas se generan en el día E12,5 y forman una placa denominada pre-placa (PP). Después, estas neuronas generan la placa cortical, que divide la PP en una zona marginal (MZ) y una subplaca (SP) de neuronas transitorias bajo la placa cortical (CP) (Caviness1982). Los axones de estas neuronas, junto a los axones proyectados desde el tálamo, establecen una zona intermedia (IZ). Las neuronas generadas por los progenitores de la zona ventricular (VZ), la glía radial y los precursores neurales pequeños, forman las capas inferiores V y VI de la CP, mientras que los precursores generados en la zona subventricular (SVZ), forman las capas superiores II-IV de la CP (Noctor et al. 2004). La zona marginal origina la capa l, que se convierte en la sustancia gris de la corteza cerebral y las zonas VZ y SVZ dan lugar a la sustancia blanca en la rata adulta (Jessell & Sanes,

### 1.1.3.1.1. Neurogénesis adulta

La neurogénesis en el cerebro no se ve restringida sólo a la etapa del desarrollo, sino que también en el adulto se conocen nichos neurogénicos (Doetsch 2003; García-Verdugo et al. 2002; Ma et al. 2005). Los primeros estudios que demuestran fehacientemente la existencia de neurogénesis en animales adultos, en el hipocampo, datan de 1965 (Altman and Das 1965). La neurogénesis dirigida al bulbo olfatorio principal (MOB) se describió algo más tarde (Kaplan and Hinds 1977). Sin embargo, estos estudios no tuvieron continuidad durante un largo tiempo, hasta que se produjo el descubrimiento de las células madre en el cerebro adulto (Reynolds and Weiss 1992; Richards et al. 1992), junto con la corroboración de la existencia de células madre en otros órganos adultos como el pulmón y el corazón (Anversa and Kajstura 1998; Beltrami et al. 2003; Engelhardt et al. 1995; Kotton et al. 2004; Oh et al. 2003; Stastna et al. 2009; Verstappen et al. 2009). En la actualidad, está ampliamente aceptada la existencia de dos áreas del cerebro adulto capaces de producir nuevas neuronas en la mayoría de los mamíferos, también conocidas como regiones o nichos neurogénicos (ver, entre otras muchas, la revisión de Pignatelli & Belluzzi (Pignatelli and Belluzzi 2010). Éstas son: la formación hipocampal y la región neurogénica constituida por la SVZ, la corriente migratoria rostral (RMS) y el bulbo olfatorio (OB) (o SVZ-RMS-OB) (Doetsch 2003; Doetsch et al. 1999; Gritti et al. 2002; Merkle et al. 2007; Ventura and Goldman 2007).

### 1.1.3.1.2. Factores que afectan a la proliferación neuronal

La neurogénesis, tanto durante el desarrollo, como en la etapa adulta, además de por la presencia o no de los precursores y su organización en los nichos o regiones, también está regulada por otros factores, es decir, lo que se conoce como la "permisividad" de dichas regiones (Suhonen et al. 1996). No se conocen bien los factores que regulan la proliferación de los neuroblastos, aunque existe la posibilidad de que algunos neurotransmisores, tales como la noradrenalina, la serotonina, la acetilcolina, el GABA y la dopamina actúen como señales reguladoras (Fedoroff et al. 1987; Herschkowitz 1988). Se ha sugerido el papel del potencial de membrana en la mitogénesis celular (Cowan 1987) y se cree que determinadas hormonas, como la insulina y las hormonas tiroideas, también pueden actuar en esta fase del desarrollo neuronal. En trabajos in vitro se ha demostrado que el IGF-I y el factor de crecimiento derivado de los fibroblastos (bFGF) son factores mitogénicos (Dicicco-Bloom et al. 1998). Así mismo, el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimula la proliferación de los neuroblastos, siempre y cuando estas células hayan estado expuestas a bFGF (Cattaneo and McKay 1990). Además, la neurogénesis parece estar negativamente regulada por el factor de crecimiento glial (GGF), una proteína regulada por el gen de la neurregulina (Jessell and Sanes 2000).

Además de los progenitores de carácter glial, se ha demostrado que en las regiones neurogénicas existen otras poblaciones de astrocitos, sin potencial neurogénico, que favorecen la formación de neuronas (Song et al. 2002a; Song et al. 2002b). La microglía parece tener un papel dual en la regulación de la neurogénesis. Por una parte inhibe la proliferación mediante la producción de sustancias como la *interleucina 6* (Bonni et al. 1995; Mehler and Kessler 1995; Vallieres et al. 2002), y por otra, tiene efectos tróficos, al producir neurotrofinas (Battista et al. 2006; Walton et al. 2006).

Los vasos sanguíneos (Palmer et al. 2000) producen moléculas, tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que contribuyen a la homeostasis de los progenitores (Cao et al. 2004; Fabel et al. 2003; Jin et al. 2002; Schanzer et al. 2004), y son otro componente esencial de las regiones neurogénicas. De hecho, los precursores de las regiones neurogénicas adultas se encuentran íntimamente relacionados con ellos, ya que los precursores emiten un proceso que contacta directamente con los vasos: la teoría del "nicho vascularizante"; (Filippov et al. 2003; Mirzadeh et al. 2008; Palmer et al. 2000). Según esta teoría, los progenitores recibirían señales reguladoras mediante factores solubles y moléculas de la matriz extracelular (Leventhal et al. 1999; Mercier et al. 2002; Shen and Zhang 2004).

### 1.1.3.1.3. Tipos neuronales principales de la corteza cerebral

Las neuronas pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios, desde su forma y tamaño, su polaridad, el mediador químico o neurotransmisor secretado, hasta su función clásica. Según su morfología existe una gran diversidad, mientras que clásicamente, según su función se dividen únicamente en tres grandes grupos: motoras, sensoriales e interneuronas. Una clasificación muy utilizada agrupa a las neuronas de la corteza cerebral en dos clases principales: las neuronas excitatorias, la mayor parte de las cuales tienen una morfología piramidal y también son denominadas neuronas de proyección o células piramidales, y las neuronas inhibidoras, también conocidas como interneuronas (DeFelipe and Farinas 1992), unas células de morfología más pequeña. Las neuronas excitatorias piramidales utilizan como neurotransmisor el glutamato (Thomson and Deuchars 1994); mientras que las interneuronas emplean el ácido γ-aminobutírico (GABA) como neurotransmisor principal (McCormick 1989; Thomson et al. 1996). Estos dos tipos neuronales deben coordinarse entre sí para lograr el perfecto funcionamiento de los circuitos corticales (McBain and Traynelis 2006).

### 1.1.1.1.1.1. Neuronas glutamatérgicas: neuronas piramidales

La mayor parte de las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral son piramidales. Constituyen alrededor del 80 % del total de la población neuronal de la corteza cerebral y se encuentran en todas las capas corticales, con la excepción de la capa I. La morfología típica de una neurona piramidal supone un cuerpo celular con forma piramidal, con una INTRODUCCIÓN

prominente dendrita apical que surge de su polo apical y se extiende radialmente hacia la superficie pial. De la base del soma emergen dendritas basales que, típicamente, se extienden lateral o ventralmente. La dendrita apical generalmente alcanza la capa I, aunque la mayoría de las células piramidales que se sitúan en las capas IV y V no lo hacen. La superficie dendrítica está cubierta de espinas, siendo su número muy elevado. El axón de estas neuronas sale de la base del soma o de una dendrita basal, con dirección a la sustancia blanca, y en su camino emite diversas ramificaciones o "colaterales" (Ver esquema de la reconstrucción de una célula piramidal, obtenida por su tinción con Biocytin, recogido en el Esquema 6). Aunque todas las células piramidales tienen una morfología similar, dependiendo de su disposición en las capas de la corteza, difieren entre ellas en su árbol dendrítico, la densidad de las espinas, el patrón de colaterales axónicos y el lugar hacia el cual proyectan.

Existen también, aunque no las detallemos aquí, interneuronas excitatorias (las denominadas SCC por "spiny stellate cells"), pero son una población minoritaria localizada únicamente en la capa IV (Feldmeyer et al. 2002).


#### 1.1.1.1.1.2. Interneuronas GABAérgicas

Las interneuronas representan aproximadamente el otro 20 % del total de las neuronas corticales. Constituyen un grupo altamente heterogéneo de células con una gran diversidad morfológica (aunque generalmente sean de menor tamaño que las neuronas excitatorias), fisiológica, molecular (pudiendo expresar distintos marcadores moleculares como las diversas proteínas de unión a calcio: calbindina (CB), calretinina (CR), parvoalbúmina (PV); tirosinahidroxilasa, algunos neuropétidos, etc), y sináptica (DeFelipe 1997; Kawaguchi and Kubota 1996; Markram et al. 2004)(Ver el esquema de la reconstrucción de una interneurona, obtenido por su tinción con Biocytin, recogido en el Esquema 7). Las Interneuronas, a pesar de su gran diversidad, poseen características y propiedades comunes. Así, carecen de espinas dendríticas, pueden recibir sinapsis, tanto excitatorias como inhibitorias, en diversos puntos de su soma, dendritas y axón, no proyectan a otras partes del cerebro y, tanto su axón como su árbol dendrítico, se encuentran confinados siempre al neocórtex (Kawaguchi and Kubota 1996). Generalmente, las conexiones de las Interneuronas a través de su axón son con otras neuronas próximas, aunque se han descrito algunas poblaciones con largas proyecciones hacia otras zonas de la corteza (Somogyi and Klausberger 2005).



interneurona GABAérgica

#### 1.1.1.2. Migración neuronal

Una clasificación de los tipos neuronales, como se acaba de mencionar, agrupa a las neuronas corticales en dos grandes grupos o clases: neuronas de proyección o piramidales e interneuronas o neuronas de circuito local. Esta clasificación tiene relevancia cuando se habla de migración, pues parece ser que, mientras que las neuronas glutamatérgicas piramidales originadas en la región del palio, en la VZ, migran radialmente hasta alcanzar la placa cortical (Kriegstein and Noctor 2004), las interneurons GABAérgicas, que se generan principalmente en la región del subpalio, lo hacen tangencialmente.

Los estudios clásicos, de marcaje radiactivo, al igual que los más recientes, coinciden en que las neuronas de proyección de la corteza cerebral se originan, principalmente, en la VZ de la región dorsal del encéfalo (palio) y migran radialmente a través de la zona intermedia de la corteza, hasta alcanzar su posición definitiva en la placa cortical (Angevine and Sidman 1961; Nadarajah et al. 2001) (Ver Esquema 8).



# Esquema 8.- Esquema de los tipos de migración de las neuronas de proyección de la corteza cerebral

Las neuronas de proyección se generan tanto en la zona ventricular (VZ) como en la zona subventricular (SVZ). Durante la formación de la pre-placa (PP) al principio de la neurogénesis, las neuronas migran por translocación del soma (A y B, desde la VZ y la SVZ, respectivamente). Sin embargo, en estadios más avanzados del desarrollo, las neuronas migran por locomoción celular (C), empleando la glía radial.

La migración radial de las neuronas de proyección permite la transferencia de información topográfica desde la capa ventricular hasta la placa cortical. Por este motivo, la información derivada de la posición está determinada por su origen en la zona ventricular, y así, progenitores corticales adyacentes dan lugar a neuronas de proyección que se sitúan próximas en la placa cortical y, habitualmente, en la misma columna cortical (Revisión muy completa (Rakic 1988)). La migración radial depende, en gran medida, de la interacción de las neuronas en migración con las prolongaciones de la glía radial (Misson et al. 1988), si bien durante las primeras fases del desarrollo cortical, la migración radial parece ser independiente de la glía radial (Nadarajah et al. 2002; Nadarajah and Parnavelas 2002) (Ver Esquema 9).



Diferentes rutas de migración tangencial y radial de interneruronas desde regiones del telencéfalo ventral. Notación: H, Hipocampo; LGE, Eminencia ganglionar lateral; LV, ventrículo lateral; MGE, eminencia ganglionar medial; NCx, Neocórtex; PCx, Corteza piriforme; Str, estriado; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular.

#### 1.1.1.2.1. Migración tangencial de las interneuronas corticales

La existencia de células orientadas de forma tangencial en la zona intermedia de la corteza en desarrollo sugiere que no todas las células se desplazan de forma radial. Aunque durante mucho tiempo se pensó que las interneuronas corticales que se originaban en la zona ventricular del palio, y que se desplazaban hasta alcanzar su posición definitiva en las áreas corticales, lo hacían mediante la migración radial, de forma similar a las neuronas piramidales, numerosos estudios recientes ha puesto de manifiesto que la migración radial no es el único mecanismo de desplazamiento (de Carlos et al. 1996a; Fishell et al. 1993; Nadarajah et al. 2002; O'Rourke et al. 1997; O'Rourke et al. 1992; Parnavelas et al. 1991; Tan and Breen 1993; Tan et al. 1995).

La idea de que son las interneuronas las neuronas que se desplazan tangencialmente durante el desarrollo de la corteza cerebral tiene su origen en estudios inmunohistoquímicos y de marcaje con bromo-desoxiuridina (BrdU)(DeDiego et al. 1994; Van Eden et al. 1989). El clonaje celular demostró la existencia de un linaje celular diferente entre las neuronas corticales que tienen una migración radial y aquellas neuronas corticales con migración tangencial (Mione et al. 1997; Tan et al. 1998). Las interneuronas se generan en el subpalio (de Carlos et al. 1996a), concentrándose en la eminencia ganglionar del telencéfalo ventral y migrando tangencialmente hacia el córtex en corrientes bien definidas (Corbin et al. 2001; Marin and Rubenstein 2003; Metin et al. 2006; Nakajima 2007). Si bien el primer trabajo en confirmar el origen de las interneuronas en la región del subpalio mostró que luego se dispersaban tangencialmente en la corteza embrionaria (de Carlos et al. 1996a; De Carlos et al. 1996b), estudios más recientes confirmaron que interneuronas de regiones distantes, tales como la neocorteza, el hipocampo o la corteza piriforme tenían su origen común en la región del subpalio, haciendo pensar en un origen común para todas las interneuronas de la corteza cerebral (Pleasure et al. 2000; Wichterle et al. 1999).

En general, la migración tangencial no parece seguir las fibras de la glía radial sino que se basa en la interacción con otros tipos celulares y señales moleculares (Corbin et al. 2001; Marin and Rubenstein 2001). Las células que migran tangencialmente pueden hacerlo como agrupaciones, como es el caso de las interneuronas que migran al bulbo olfatorio (OB), o hacerlo individualmente como las interneuronas corticales o las células de Cajal-Retzius.

# **1.1.1.2.2.** Migración tangencial: la corriente migratoria rostral y la migración postnatal y en el adulto

La SVZ de muchos mamíferos adultos, no humanos (Blakemore and Hague 1972; Kornack and Rakic 2001; Pencea et al. 2001; Perez-Martin et al. 2000; Ponti et al. 2006; Young et al. 2007), y humanos, aunque en este caso parece declinar durante la infancia (Sanai et al. 2011), genera un amplio número de neuronas "nuevas" destinadas al OB. Progenitores neuronales inmaduros migran desde las paredes de los ventrículos laterales en cadenas tangencialmente orientadas, formando una corriente migratoria rostral (RMS) que conecta la SVZ con el OB (Ver Esquema 10).



# Esquema 10.- Migración de los precursores neuronales a través de la corriente migratoria rostral (RMS)

Corte sagital del cerebro de un roedor. Migración neuronal tangencial de progenitores neuronales generados en las paredes de los ventrículos laterales (LV), y que migran de manera agrupada, en cadenas tangenciales, a través de las regiones SVZ-RMS-OB. Los progenitores situados en la región neurogénica de la SVZ son capaces de alcanzar principalmente el OB, pero también las áreas corticales, de forma que las distintas subpoblaciones de interneuronas pueden ver modulada su maduración a lo largo del eje anteroposterior y migrar hacia regiones de la corteza cerebral. Abreviaturas: H, hipocampo; LV, ventrículo lateral; LGE, eminencia ganglionar lateral; MGE, eminencia ganglionar medial; NCx, neocórtex, corteza cerebral; OB, bulbo olfatorio; RMS, corriente migratoria rostral.

En el caso de los humanos, este corredor de progenitores parece estar activo durante la infancia pero se ve reducido considerablemente en la etapa adulta. No obstante, durante la ventana de tiempo en el cual se mantiene la neurogénesis, no todas las células parecen estar destinadas al OB, sino que pueden alcanzar zonas del córtex prefrontal (Sanai et al. 2011).

En el caso de los roedores, se ha demostrado que estímulos olorosos que activen el sistema olfatorio durante el desarrollo postnatal, activan también la migración de los progenitores a través de esta corriente de migración tangencial. Además, existen algunos

tipos de interneuronas cuyo destino final no parece ser el OB (Le Magueresse et al. 2011b).

# 1.1.1.2.3. Factores que influyen en la migración de las neuronas de la corteza

### 1.1.1.2.3.1. El "leading process" o proceso de guía

La migración neuronal es un proceso altamente polarizado, que se basa en la generación, mantenimiento y remodelación de un "proceso de guía" o "leading process", que marca la dirección seguida por la célula. El "leading process" actúa como el compás de rumbo, seleccionando la dirección de migración en respuesta a estímulos quimiotácticos, bien quimioatractivos, como la neurorregulina 1 (Marin and Rubenstein 2001), o quimiorrepulsivos, como las semaforinas de la clase III (de Castro et al. 1999; Marin et al. 2001). La morfología del leading process varía en los diferentes tipos neuronales, reflejando una adaptación a los diferentes requerimientos del proceso de migración radial o tangencial (Marin et al. 2010). Mientras que las neuronas piramidales normalmente tienen un único leading process mientras se desplazan con una morfología bipolar a lo largo de las fibras gliares, las interneuronas que migran tangencialmente extienden varias ramificaciones de leading process, reflejando un comportamiento exploratorio (Metin et al. 2006; Nadarajah and Parnavelas 2002; Tabata and Nakajima 2003; Valiente and Marin 2010). Además, y aunque no requieran del contacto con las células de la glía radial, las interneuronas necesitan de interacciones directas con otros tipos celulares, incluidos otras interneuronas en migración, además de señales externas.

### **1.1.1.2.3.2.** Señales que dirigen la migración neuronal

Existen multitud de señales que regulan y dirigen la migración neuronal y pueden clasificarse atendiendo al mecanismo mediante el cual ejercen su función: control de la dinámica del *leading process*, del movimiento nuclear, señales célula-célula de modulación de la adhesión celular y la guía, factores motogénicos y señales de "fin de trayecto". Muchas de estas moléculas, neurotransmisores y señales, y su mecanismo de acción sobre las neuronas piramidales o las interneuronas, se encuentran recogidos y agrupados en el Esquema 11 (Manent et al. 2011; Polleux et al. 2002).

#### **1.1.1.2.3.3.** Participación de la vasculatura en la migración neuronal

Además de todos los factores ya señalados en el apartado anterior, existe un factor adicional que en los últimos años ha adquirido una gran importancia. Se trata de la vasculatura o los vasos sanguíneos presentes o próximos a las diferentes áreas de migración, de manera especial en la etapa adulta. El árbol vascular jugaría un doble papel: por una parte actuaría de andamiaje, compartiendo funciones con las células gliales (Le Magueresse et al. 2011a) y por otra parte, pudiendo secretar o facilitar la producción de sustancias y factores, como el VEGF, que induzcan o favorezcan la migración de las neuronas (Bozoyan et al. 2012; Scott et al. 2012).

El Esquema 11 resume los mecanismos de control de la migración neuronal.



# Esquema 11.- Mecanismos de control de la migración de las células piramidales e interneuronas en el córtex cerebral

Factores moleculares implicados en: (A) la migración radial (células piramidales a lo largo de la glía radial), y (B) la migración tangencial (interneuronas). En morado se indican los mecanismos autónomos celulares, mientras que en verde los mecanismos de señalización entre células. Modificado de Manent et al. 2011.

#### 1.1.1.3. Agregación neuronal

Al llegar a su localización definitiva, las neuronas tienden a agregarse formando diferentes capas de la corteza cerebral o bien grupos nucleares. Algunas moléculas de naturaleza glicoproteica y/o glicolipídica, 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 and Mangoura 1988). Además, la laminina, una glicoproteína presente en la matriz extracelular, parece ser una molécula que favorece este proceso (Luckenbill-Edds 1997).

#### 1.1.1.4. 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, finalmente, 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 Sistema Nervioso Central y a la adquisición de la propiedad de propagar potenciales de acción. Al igual que el proceso de proliferación neuronal, el proceso de diferenciación también difiere según la especie. Así, en la rata, el proceso de diferenciación neuronal comienza prenatalmente y se prolonga 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 (Herschkowitz 1988; Meisami E. 1982; Timiras et al. 1982).

En las neuronas existen unas zonas que fueron denominadas por Ramón y Cajal conos de crecimiento, donde se originan las dendritas y los axones (Caviness 1989; Herschkowitz 1988). Los conos de crecimiento actúan como guía axonal, convirtiendo las señales positivas y negativas en órdenes que determinan el trayecto y la rapidez de crecimiento del axón. La sensibilidad del cono de crecimiento depende en gran medida de sus filopodios. Los filopodios son estructuras del cono de crecimiento ricas en actina, muy móviles y que poseen receptores para moléculas que sirven de señal de dirección al axón (J. Sanes 2001). En este proceso son importantes varias proteínas, algunas de las cuales son utilizadas como marcadores moleculares de la diferenciación. Es el caso de la proteína asociada a microtúbulos, MAP2, implicada en la elaboración de las dendritas (Schoenfeld and Obar 1994) y la proteína asociada al crecimiento axonal, GAP43 (Skene 1989; Skene et al. 1986; Skene and Virag 1989)(Ver fotomicrografías del Esquema 12 y apartados siguientes).



Esquema 12.- Localización inmunocitoquímica de las proteínas GAP43 y MAP2 en neuronas en cultivo primario

La proteína GAP43, marcadora del crecimiento axonal, apararece marcada en rojo, mientras que MAP2, marcadora del crecimiento dendrítico, aparece en color verde. Escala 15 µm.

# 1.1.1.4.1. El "sustrato permisivo" y factores que favorecen la diferenciación

Los conos de crecimiento necesitan de un "sustrato permisivo" que permita el avance del axón. Estos conos reconocen diferencias entre los sustratos existentes en las regiones en las 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 interaccionar con las lamininas de la matriz extracelular y transmitir esta información al interior de la célula (Hopker et al. 1999).

No obstante, la unión con el *sustrato permisivo* no es suficiente para que se produzca el desarrollo de las neuronas inmaduras. Algunos neuropéptidos, como la somatostatina (Bulloch 1987; Grimm-Jorgensen 1987), la colecistoquinina, la sustancia P o el péptido intestinal vasoactivo (o VIP), parecen estar relacionados también, de una manera estrecha, con los fenómenos de elongación axónica y de interconexión celular (Hayashi 1992). Por otro lado, el NGF (factor de crecimiento nervioso) (Houlgatte et al. 1989; Levi-Montalcini 1982) y ciertos neurotransmisores, como la serotonina, la dopamina, el GABA o la acetilcolina (Barbin et al. 1993; Hamon 1989; Lipton and Kater 1989; Michler 1990; Spoerri 1988), así como las interacciones con células gliales, parecen estar implicados también en este proceso (Hatten et al. 1986; Ivins and Pittman 1989; Vernadakis 1988; Vernadakis and Mangoura 1988). La presencia de astrocitos favorece el crecimiento neuronal (Patel and Hunt 1989), puesto que trabajos previos de nuestro grupo muestran que los astrocitos pueden sintetizar ácido oleico, que actúa como factor axonogénico sobre las neuronas (Tabernero et al. 2001b).

Los axones de larga proyección tienden a crecer juntos en un fascículo común, cuya formación está favorecida por la presencia de la molécula de adhesión celular neuronal, N-CAM (Caviness 1989).

Además, el proceso de diferenciación neuronal parece estar favorecido por la insulina y el factor de crecimiento de la insulina, IGF. La insulina estimula la síntesis de proteínas y aumenta ciertas actividades enzimáticas, favoreciendo la producción de neuritas y la adquisición de la capacidad para la neurotransmisión (Baskin et al. 1987). Asimismo, se ha sugerido que el piruvato favorece el crecimiento de las neuronas en cultivo (Varon et al. 1987).

#### 1.1.1.4.2. GAP43, proteína asociada al crecimiento axonal

La proteína asociada al crecimiento axonal, GAP43, también denominada B-50, se localiza fundamentalmente en los axones y sobre todo, en los conos de crecimiento. Su expresión es máxima durante los procesos de crecimiento axonal, tanto durante el desarrollo

neuronal como en procesos de regeneración (Benowitz and Routtenberg 1997; Oestreicher et al. 1997; Skene 1989). No obstante, se ha demostrado recientemente que las vías que regulan la inducción de la GAP43 durante el desarrollo parecen ser diferentes de las que tienen lugar durante la regeneración axonal (Udvadia et al. 2001). 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 (LTP), un proceso que se supone asociado a la memoria (Benowitz and Routtenberg 1997).

La GAP43 se localiza fundamentalmente en los axones en crecimiento y, sobre todo, en los conos de crecimiento, en donde se une a la membrana mediante interacciones con la F-actina, junto a la cual constituye la estructura interna de los axones (Oestreicher et al. 1997; Skene and Virag 1989).

La expresión del gen de la GAP43 está muy restringida en las células neurales. El gen que codifica la GAP43 se encuentra localizado en el cromosoma 3 en humanos, y en el cromosoma 6 en ratones (Kosik et al. 1988). De los tres exones que contiene el gen, el primero contiene la región *5' no traducible* (UTR) y codifica los 10 primeros aminoácidos, que comprenden el dominio de unión de la proteína a la membrana y los dominios de activación de las proteínas G (G<sub>0</sub> y G<sub>i</sub>). La regulación de la actividad del promotor de la GAP43 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 del gen de la GAP43, y modulan positiva o negativamente la expresión de este gen. Hasta el momento, se han descrito seis factores de transcripción de esta familia, cuatro de ellos represores de la transcripción (ME1a, E12, MES-1 y MASH-1) y dos activadores (NeuroD y NDRF -o NeuroD2-) (Chiaramello et al. 1996; Ohtsuka et al. 1998).

La expresión de la GAP43 está regulada también a nivel del mRNA. El factor NGF puede aumentar hasta tres veces la vida media del mRNA de la GAP43. Además, se ha propuesto que el aumento de la estabilidad del mRNA de la GAP43, causado por NGF, está mediado por la activación de la proteína kinasa C (PKC) (Perrone-Bizzozero et al. 1993).

La expresión de la proteína GAP43, tanto en el Sistema Nervioso Central como en el Sistema Nervioso Periférico, comienza a ser detectable en las neuronas postmitóticas, una vez que se han dividido y migrado a su destino final. La síntesis se produce en el cuerpo celular (Kleiman et al. 1990; Kleiman et al. 1994) y después es dirigida al proceso de formación axonal, vía el complejo de Golgi (Palacios et al. 1994). En el ratón, la GAP43 alcanza su máxima expresión en las dos primeras semanas de vida postnatal en el Sistema Nervioso Central y en el día 4 de vida postnatal en el Sistema Nervioso Periferico. A partir de este momento su expresión decae, aunque es detectable en ciertas poblaciones neuronales en estadios posteriores (Benowitz and Routtenberg 1997; Oestreicher et al. 1997). En la rata se ha descrito que el momento de máxima expresión de la GAP43 sucede durante la primera semana postnatal (Dani et al. 1991; Velasco et al. 2003).

La GAP43 tiene como característica estructural más señalada su extrema hidrosolubilidad, hecho no habitual en una proteína asociada a membranas. Se sintetiza como proteína soluble y su asociación a la membrana probablemente está mediada por la unión covalente a ácidos grasos. La corta región hidrofóbica en el extremo amino terminal

contiene dos residuos de cisteína en las posiciones 3 y 4, que son, probablemente los sitios de acilación con ácidos grasos y, consecuentemente, de unión a membrana. Esta región contiene un dominio activador de la proteína G. En la parte intermedia existe el denominado dominio IQ, compuesto por 12-15 aminoácidos localizados antes de(Benowitz and Routtenberg 1997) la serina 41, 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 ya mencionada que, a su vez, regula dicha unión de la proteína a la calmodulina. En el extremo carboxilo terminal se localiza un motivo F, el cual interacciona con los componentes del citoesqueleto (Skene and Virag 1989).

#### 1.1.1.4.3. MAPs, proteínas asociadas a microtúbulos

El citoesqueleto es la base de la morfología celular y de la plasticidad en el tejido nervioso. Está constituido por tres tipos de elementos proteicos citoplasmáticos. que interaccionan entre ellos y con otras estructuras celulares. Estos elementos son los siguientes: los microfilamentos, los filamentos intermedios y los microtúbulos (Alberts B. 2004).

Los microtúbulos son cilindros largos y huecos, formados por heterodímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (Desai and Mitchison 1997; Mandelkow and Mandelkow 1995). No obstante, además de la tubulina, existe en los microtúbulos un grupo muy heterogéneo de proteínas asociadas a estos polímeros, que controlan el crecimiento y la organización de los microtúbulos (Wiche et al. 1991) Entre estas proteínas encontramos: proteínas motoras (kinesinas y dineínas), proteínas de ensamblaje de los microtúbulos y proteínas asociadas a los microtúbulos o MAPs.

Una de las MAPs más abundante en el cerebro de los mamíferos es, la proteína asociada a los microtúbulos 2, o MAP2. Esta proteína es termoestable y tiene varias isoformas (Maccioni and Cambiazo 1995). En efecto, la MAP2a y la MAP2b son MAPs de alto peso molecular, próximo a 300 kDa, y se localizan específicamente en las dendritas. Existen otras dos variedades de la MAP2, con un peso molecular inferior, denominadas MAP2c y MAP2d (Tucker 1990). Las MAP2 se asocian a los microtúbulos para estabilizarlos y promover su ensamblaje, aun manteniendo sus propiedades dinámicas (Olmsted 1986). De esta forma, ejerce un importante papel en el crecimiento de las dendritas (Woolf 1998). Otras funciones descritas para la MAP2 se resumen en su participación en la morfogénesis neuronal, en la dinámica del citoesqueleto, en el empaquetamiento de los microtúbulos y en el transporte de orgánulos en los axones y dendritas (Johnson and Jope 1992; Kuznetsov et al. 1980; Vallee et al. 1986).

Todas las isoformas de la MAP2 proceden de la transcripción de un único gen. Las múltiples isoformas expresadas en neuronas son resultado del corte y empalme alternativo ("alternative splicing") de un pre-mRNA transcrito del gen de la MAP2, que en la especie humana está localizado en el cromosoma 2 y contiene 20 exones (Kalcheva et al. 1998; Neve et al. 1986; Shafit-Zagardo and Kalcheva 1998). El sitio de inicio de la traducción se encuentra en el exón 5 y el codón de parada se localiza en el exón 19.

Los patrones de expresión diferencial de las isoformas de MAP2 y sus mRNAs durante el desarrollo del sistema nervioso pueden indicar una compleja regulación de su expresión, tanto a nivel transcripcional o postranscripcional como traduccional (Sanchez et al 2000). La mayor parte de la información existente se centra en la modificación postraduccional que sufren las distintas isoformas de MAP2, una vez han sido sintetizadas. La MAP2 es modificada postraduccionalmente en las neuronas en desarrollo, por mecanismos de fosforilación y desfosforilación inducidos por ciertas señales extracelulares (Avila et al. 1994a; Avila et al. 1994b). Estas modificaciones condicionan la capacidad de la MAP2 para unirse a los microtúbulos y estabilizarlos. Se ha sugerido que la asociación de las MAPs con kinasas y fosfatasas puede ser esencial para su anclado al citoesqueleto, así como para su direccionamiento hacia compartimentos específicos neuronales, donde pueden desempeñar funciones específicas (Tsunoda et al. 1998). Es necesario un equilibrio kinasas/fosfatasas para el adecuado recambio y dinámica de los microtúbulos y, en consecuencia, una función neural satisfactoria. Así, una hiperfosforilación de la MAP2 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 kinasas que pueden fosforilar MAP2 están la proteína kinasa A (PKA), la proteína kinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII), la proteína kinasa dependiente de calcio/fosfolípidos y diacilglicéridos (PKC), y las prolina-proteín kinasas. La desfosforilación de la MAP2 se lleva a cabo por diversas serina/treonina fosfatasas, 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 fosfatasas juegan un papel esencial en la regulación de la plasticidad neuronal y en la transmisión sináptica (Sanchez et al. 2000).

Todas las MAP2 tienen, cerca de a la región carboxilo terminal, un conjunto de secuencias repetidas de 18 aminoácidos. Estas secuencias repetidas, separadas entre sí por 13 o 14 aminoácidos, constituyen el dominio de unión a la tubulina. Todas las isoformas de la MAP2 tienen, además, una región rica en prolina, previa al dominio de unión amino-terminal. Se piensa que la región carboxilo-terminal de la molécula de MAP2, que incluye la región rica en prolina y los dominios de unión a tubulina, está fuertemente unida a los microtúbulos, mientras que el resto de la molécula, que comprende la región amino-terminal y el dominio central, se proyecta fuera de la superficie de los microtúbulos como un brazo, por lo que se denomina "dominio de proyección" (Sanchez et al. 2000).

Las MAP2 se expresan en el sistema nervioso, siendo unas de las más abundantes en el cerebro (Olmsted 1986; Schoenfeld and Obar 1994), y rara vez se expresan en los axones, por lo que las MAP2a y MAP2b se pueden considerar proteínas específicas de las dendritas neuronales. Estas isoformas difieren en su patrón de expresión durante el desarrollo cerebral. En fases embrionarias, y hasta el día 10 de la vida postnatal, en la rata, la principal MAP2 de alto peso molecular que se expresa en el cerebro es la MAP2b, que es la isoforma asociada a la diferenciación dendrítica. La MAP2a aparece, generalmente, en etapas más tardías del desarrollo, expresándose mayoritariamente en el cerebro adulto.

#### 1.1.1.5. Sinaptogénesis

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. Cuantitativamente hablando, la sinaptogénesis es un proceso tardío de la diferenciación neuronal, si bien algunas sinapsis aparecen durante fases más tempranas (Caviness 1989; de la Torre-Ubieta and Bonni 2011).

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 (Hamon 1989; Madtes and Redburn 1983; Reisert et al. 1989). Asimismo, conviene señalar que durante el establecimiento de sinapsis se produce un incremento en el metabolismo oxidativo cerebral y aumenta la síntesis de fosfolípidos y colesterol (Bayer 1985; Meisami E. 1982). Se cree que en la sinapsis existe una 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). El colesterol juega, aparentemente, un papel clave en la sinaptogénesis. Durante este proceso, en el que se requieren cantidades elevadas de colesterol, su síntesis disminuye en las neuronas (Poirier 1994). Sin embargo, las células gliales sintetizan y aportan a las neuronas el colesterol que éstas necesitan. La disponibilidad de colesterol parece ser el factor limitante para el desarrollo de las sinapsis maduras, lo cual explica el retraso del Sistema Nervioso Central en la producción de sinapsis, a la espera de que se produzca la diferenciación de la glía, conjuntamente con los efectos patológicos que se manifiestan por alteraciones en la homeostasis del colesterol o las lipoproteínas (Mauch et al. 2001).

#### 1.1.1.6. Muerte neuronal

Kerr y sus colaboradores (Kerr et al. 1972) describieron dos tipos, ahora clásicos, de muerte celular: necrosis y apoptosis. La 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 introducción de la maquinaria enzimática necesaria con el consiguiente gasto energético. Este proceso es frecuente durante el desarrollo. Cuando las células mueren por apoptosis se producen una serie de cambios en su morfología, como la disminución del tamaño de la célula, la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA y, por último, la fagocitosis de los restos celulares. Existen algunos marcadores moleculares que nos indican el avance en el proceso apoptótico y permiten su estudio molecular (desde la externalización de la fosfatidilserina en las etapas tempranas, a los acúmulos del material genético y extremos rotos del DNA en estadios más tardíos).

Durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central se genera un gran número de neuronas, de las que apenas la mitad llegará 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 explicación de este fenómeno la dieron Hamburger y Levi-Montalcini en su "hipótesis del factor neurotrófico" (Hamburger and Levi-Montalcini 1949). Esta hipótesis propone que la supervivencia de las neuronas en desarrollo depende de una serie factores neurotróficos secretados por las células diana a las que las neuronas van a inervar. Los factores neurotróficos, que se encuentran en cantidades limitadas, determinan que aquellas neuronas que sean capaces de captarlos serán las que van a sobrevivir, mientras que el resto morirá por apoptosis (Hamburger and Levi-Montalcini 1949). Esta hipótesis se vio reforzada por el descubrimiento, años más tarde, del NGF, factor regulador de la apoptosis (Cohen 1960), e indica un mecanismo de refinamiento de las vías de interconexión neuronal.

### 1.2. Ácidos grasos y Sistema Nervioso Central

En el cerebro, los ácidos grasos son un componente estructural mayoritario y pueden encontrarse niveles elevados de los mismos, tanto en la membrana neuronal, como en la vaina de mielina. Se estima que el 50 % de la membrana neuronal se compone de ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos (Bourre et al. 1992; Rapoport 2005; Zerouga et al. 1991). A pH fisiológico, el límite de solubilidad en solución acuosa de los ácidos grasos de cadena larga, palmítico y oleico, es sólo de 4-6 μM (Richieri and Kleinfeld 1995). Este hecho hace necesaria la interacción o unión con algunas proteínas que faciliten tanto su solución y su trasporte en el suero, como su translocación a través de las membranas celulares y su disponibilidad tanto a nivel extracelular como intracelular. De manera genérica, estas proteínas de unión, transferencia o intercambio de lípidos están presentes en fluidos intra- y extracelulares de todos los organismos. Juegan un papel importante en el transporte y direccionamiento de los lípidos en la célula o el plasma, pero también pueden interaccionar directa o indirectamente, por modulación de la concentración de ligando libre, en varios procesos celulares. Durante el desarrollo, las células deben migrar, extender sus neuritas y formar contactos sinápticos, etc. En concordancia con estos niveles de diferenciación, las membranas celulares deben convertirse en estructuras especializadas en la neurotransmisión, en el transporte de solutos y ser capaces de interaccionar con otros tipos celulares, entre ellos las células gliales. Esta especialización de las membranas se encuentra relacionada no sólo con la síntesis y transporte de proteínas, sino también con el desarrollo de una composición lipídica particular (Sellner et al. 1995).

Los mecanismos por los que los ácidos grasos atraviesan la membrana plasmática han sido un punto de controversia durante mucho tiempo. Hasta no hace mucho, se pensaba que los ácidos grasos atravesaban pasivamente las membranas de las células y por difusión simple llegaban a los orgánulos donde se almacenaban y/o metabolizaban. Hay dos mecanismos de translocación de ácidos grasos a través de las membranas: la simple difusión y la translocación mediada por proteínas. Los ácidos grasos unidos a la albúmina, la principal proteína transportadora en el plasma, pueden pasar hasta la célula por difusión simple a través de la membrana plasmática (Hamilton and Kamp 1999) o por mediación de proteínas específicas de membrana, tales como la proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática, una translocasa de 43 KDa (Schaffer 2002), el transportador de ácidos grasos (FAT) (Abumrad et al. 1999), o la albúmina y la megalina (Bento-Abreu et al. 2008; Zhai et al. 2000), entre otras (Ver Esquema 13).



# Esquema 13.- Transporte de lípidos e interacción con proteínas de unión, transporte o intercambio de lípidos.

Esquema general del transporte, captación, metabolismo y modulación génica de los ácidos grasos y la participación de las proteínas de translocación a través de membrana o las proteínas de unión a ácidos grasos, albúmina o FABPs. Modificado de Veerkamp & Maatman 1995.

Abreviaturas: FA, ácido graso; FABPs, proteínas de unión a ácidos grasos; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; QM, quilomicrones; TAG, triacilgliceroles; CAT, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, FAT translocador de ácidos grasos; FATP, transportador (putativo) de ácidos grasos; PPAR, receptor activado de proliferación de peroxisomas; RA, ácido retinoico; RXR, receptor X de retinoico; FEC, fluido extracelular; LPL, lipoproteína lipasa; ATP y ADP, adenosina tri- y difosfato

#### 1.2.1. Proteínas transportadoras de ácidos grasos

Las proteínas y moléculas que se unen a los lípidos pertenecen a varias familias de proteínas no relacionadas entre ellas. En algunos casos se habla de FABPs (nombre

referido a su función: "fatty acid binding proteíns") para referirse, de una manera general, tanto a proteínas que unen lípidos a nivel intracelular (FABP<sub>c</sub>), como a proteínas translocadoras asociadas a la membrana plasmática (FABP<sub>PM</sub>) (Chmurzynska 2006). Sin embargo, esta denominación no es totalmente correcta y el término FABPs suele utilizarse únicamente para una familia de proteínas citoplasmáticas de bajo peso molecular, encargadas de la unión y el transporte intracelular de lípidos (Cowen and Heydrick 1972; Ockner et al. 1972). Veerkamp y Maatman (Veerkamp and Maatman 1995a) establecieron una clasificación en tres grandes grupos, para referirse a las familias de proteínas de unión y transporte de lípidos no unidas a membranas (Ver Tabla 1.1), en la que se aprecia cómo las FABPs son, propiamente, un subgrupo dentro una de estas categorías.

En los apartados siguientes ampliaremos algunas de las características de dos de las proteínas o familias de proteínas: la albúmina (grupo I) y las FABPs (grupo III).

TABLA 1.1 Características de las tres grandes superfamilias de proteínas de unión a lípidos (Modificada de Veerkamp & Maatman, 1995).			
I	II (Lipocalinas)	III	
Albúmina	β-lactoglobulina, Prot. unión retinol sérico, Prot. unión a la bilina	FABPs (7 tipos)	
α-Fetoproteína	α-Microglobulina Apolipoproteína D	CRBPs (2 tipos)	
Proteína de unión a Vitamina D	$\alpha_{U2}$ -Globulina	CRABPs (2 tipos)	
50-70 kDa Doble Bucle ("loops") Extracelular	18-20 kDa Barril β de 8 láminas Extracelular	12-15 kDa Barril β - <i>β-clamp-</i> de 10 láminas Intracelular	

### 1.2.1.1. Albúmina

La albúmina es la proteína más abundante del suero y representa cerca del 60 % del total de las proteínas plasmáticas. Su vida media en circulación es de 20 días y su concentración se sitúa en torno a 0,6 mmol/L. Tiene un peso molecular de 65-67 kDa. Está formada por 585 aminoácidos, no posee restos glucídicos y tiene carga negativa neta en el plasma sanguíneo (a pH 7,4). La albúmina se produce en el hígado, sintetizada como preproalbúmina, sufriendo dos cortes consecutivos, en el retículo endoplasmático y en el Golgi, respectivamente, y se secreta directamente a circulación. La síntesis de la albúmina se encuentra regulada por su propia concentración plasmática y, además, por la ingesta de alimentos (Gekle 2005). Los papeles fisiológicos de la albúmina incluyen el mantenimiento de la presión oncótica (la albúmina proporciona el 80 % de la presión oncótica plasmática), y el transporte de pequeñas moléculas, tales como el calcio, la bilirrubina no conjugada, los ácidos grasos libres, el cortisol y la tiroxina.

### 1.2.1.1.1. Estructura y unión a ligandos

La estructura primaria de la albúmina, compuesta por 585 aminoácidos, presenta escasos residuos de triptófano y metionina, pero abundantes residuos polares, como la lisina, la arginina y los ácidos glutámico y aspártico.

La estructura terciaria de la proteína en circulación muestra una serie de  $\alpha$ -hélices, estabilizadas con 17 puentes disulfuro. Dicha disposición crea varios subdominios de tres  $\alpha$ -hélices continuas en paralelo, de forma que un par de subdominios enfrentados entre sí dan lugar a un dominio cilíndrico.



(A) Conformación espacial de la albúmina sérica humana en la que se aprecia su disposición en forma de corazón. (B) Representación en cintas, en las que se aprecian las estructuras de α-hélice (C) Esquema para representar los sitios de unión de la albúmina a ácidos grasos y otras moléculas (Modificado de Brown & Sockley 1982; Tonsgard et al. 1991).

La estructura tridimensional de la albúmina fue determinada cristalográficamente por He y Carter en 1993 (He and Carter 1992), quienes describieron tres dominios homólogos, que se unen para dar lugar al plegamiento con forma de corazón, aunque en solución, la conformación cambia ligeramente, tomando un patrón elipsoidal, que le confiere menor viscosidad (véase Esquema 14. A y B).

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 con facilidad. Al menos posee siete sitios de unión a ácidos grasos (véase Esquema 15. C), variando la afinidad de los mismos según se trate de ácidos grasos de cadena larga o de cadena corta o media. En condiciones fisiológicas normales, entre 0,1 y 2 moles de ácido graso se unen a la albúmina, pero la razón molar ácido graso/albúmina puede alcanzar proporciones de 6:1, o incluso superiores en la vasculatura periférica en condiciones de ejercicio intenso o en condiciones patológicas como la diabetes, o trastornos hepáticos o cardiovasculares (Brodersen et al. 1990; Spector 1986).

La albúmina humana posee siete sitios de unión a ácidos grasos de cadena larga, tres de los cuales presentan alta afinidad por el ácido oleico, y once sitios de unión a ácidos grasos de cadena media (Bhattacharya et al. 2000). De los siete sitios de unión comunes para la mayoría de ácidos grasos, cinco poseen cadenas laterales básicas que interaccionan con el grupo carboxilo del ácido unido, y son candidatos para ser sitios de alta afinidad. Las principales regiones de unión a ligandos de la albúmina se localizan en cavidades hidrofóbicas en los subdominios IIA y IIIA, que muestran gran similitud. Estudios recientes proponen la existencia de regiones en la molécula de albúmina totalmente inaccesibles al agua (Grdadolnik and Marechal 2005).

Dos sitios de alta afinidad por ácidos grasos se localizan en el dominio II y un tercero reside en un fragmento que abarca regiones de los subdominios IA-IB-IIA (Brown et al. 1982; Tonsgard and Meredith 1991). La unión ácido graso-albúmina se produce a través del anión del ácido graso (Fletcher and Spector 1977). La unión depende de dos factores: es directamente proporcional a la relación molar ácido graso/albúmina, y depende de la estructura de la cadena hidrocarbonada del ácido graso. Esto quiere decir que para una misma razón molar ácido graso/albúmina, la fuerza de unión aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada, y para una misma longitud, la inserción de un único doble enlace en disposición *cis* aumenta la fuerza de unión. No obstante, la inserción de un segundo doble enlace reduce la fuerza de unión con respecto a su equivalente saturado. Por este motivo, el ácido graso fisiológico con mayor afinidad por la albúmina parece ser el ácido oleico (Curry et al. 1999).

La mayoría de los ácidos grasos captados por las células, que forman complejos 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. Las alteraciones en esta relación producen cambios en la fluidez de la membrana, lo cual altera su funcionalidad (Gurr M.I. 2002).

#### 1.2.1.1.2. La albúmina en el Sistema Nervioso Central

La albúmina no está presente en el cerebro en condiciones normales, a pesar de su importante presencia en el plasma sanguíneo. No obstante, durante el desarrollo, en condiciones de hipoxia, o tras la ruptura de la barrera hematoencefálica, la albúmina se acumula en el cerebro (Dobbing and Sands 1979; Tabernero et al. 1999).



#### Esquema 15.- Presencia de la albúmina en el Sistema Nervioso Central

La presencia de la albúmina en el CNS se correlaciona con el desarrollo del cerebro. El máximo crecimiento del cerebro (línea continua) en las ovejas tiene lugar antes del nacimiento (especie "precoz"), mientras que en las ratas tiene lugar justo después del nacimiento (especie "no -precoz") (Modificado de Dobbing 1979; Medina & Tabernero 2002). La presencia de albúmina en el líquido cefalorraquídeo (CSF) (líneas discontinuas), coincide con la etapa de máximo crecimiento del cerebro y no con el momento del parto (Modificado de Saunders 1981).

El cerebro del neonato, al contrario que el del adulto, capta específicamente albúmina sérica durante el período postnatal, coincidiendo con la etapa de máximo desarrollo (en especies "no-precoces"). Se ha descrito la presencia de altas concentraciones de albúmina en el cerebro y líquido cefalorraquídeo (CSF) durante los primeros días de vida postnatal (Dziegielewska et al. 1981b; Mollgard et al. 1984; Trojan and Uriel 1979). Tanto las neuronas (Fishman et al. 1990; Granda et al. 2003) como los astrocitos en cultivo (Juurlink and Devon 1990; Tabernero et al. 1999) son capaces de captar albúmina de forma activa.

La presencia de albúmina en el cerebro se debe a la existencia de un mecanismo según el cual la albúmina es transferida de la sangre al cerebro y al líquido cefalorraquídeo (CSF), indicando la existencia de un receptor específico para la albúmina en los capilares sanguíneos, que se expresa sólo durante el desarrollo cerebral.

En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio se observó que la albúmina era internalizada mediante estructuras vesiculares mediadas por un receptor glicoproteico (Tabernero et al. 2002a; Tabernero et al. 2002c). Posteriormente se describió que el receptor glicoproteico del que se trataba era la megalina (Bento-Abreu et al. 2008) y que la internalización de la albúmina en los astrocitos se producía mediante un proceso de endocitosis mediada por caveolas (Bento-Abreu et al. 2009).

La albúmina tiene un papel regulador de la proliferación en astrocitos y controla 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. 2002a). Además, parece regular el metabolismo de las células cerebrales (Tildon et al. 1993; Vicario and Medina 1992).

### **1.2.1.2.** Proteínas de unión a ácidos grasos, FABPs

Las FABPs (de "fatty acid binding proteins"), son una superfamilia de proteínas pequeñas (14-15 kDa), citosólicas, de carácter no enzimático, emparentadas con las proteínas de unión al retinol celular (CRBPs) y de unión al ácido retionoico (CRABPs) (Hohoff et al. 1999; Simpson et al. 1999; Veerkamp and Maatman 1995a).

Se han identificado nueve tipos de FABPs, nombradas de acuerdo al primer tejido donde fueron identificadas o aisladas por primera vez, aunque también se les ha otorgado un número, que es la nomenclatura que utilizaremos en este trabajo. Algunas formas son bastante generales, casi ubicuas en su distribución tisular, como por ejemplo las FABP3 y FABP5; otras son más específicas de un tipo de tejido (mielina, adipocito y testículo) y, en otros casos, un mismo tejido contiene más de un tipo de FABPs, distribuidas según el tipo celular, en los tejidos de riñón, cerebro o estómago y pueden coincidir varios tipos en una misma célula (Veerkamp 1995; Veerkamp and Maatman 1995a) (Véase la Tabla 1.2, donde se encuentra un resumen de la distribución general de los tipos de FABPs).

Los análisis filogenéticos sugieren la existencia de un gen ancestral común para la superfamilia de genes de las proteínas de unión a lípidos intracelulares, habiéndose generado todos los genes de cada una de ellas por duplicaciones durante la evolución (Schaap et al. 2002). La estructura génica básica de todas las FABPs se ha conservado entre todos los miembros de la familia, aunque cada una procede de un gen diferente y los genes que codifican las FABPs se encuentran dispersos en el genoma. La estructura de los mismos consiste en cuatro exones separados por tres intrones (Bernlohr et al. 1997; Hayasaka et al. 1993; Hertzel and Bernlohr 2000; Hohoff et al. 1996; Treuner et al. 1994;

Veerkamp and Maatman 1995a). Los exones son relativamente cortos; el más corto, el cuarto, codifica 16-17 aminoácidos, mientras que el más largo, el segundo, codifica casi 60 aminoácidos (Zimmerman and Veerkamp 2002). La longitud no es similar entre homólogos. Los genes de las FABPs contienen la caja TATA canónica, localizada alrededor de 23-30 nucleótidos hacia el extremo 5' desde la región codificadora –"upstream"- (Hunt et al. 1986; Kurtz et al. 1994; Sweetser et al. 1987). Mediante estudios por deleción, en la región 5' del promotor se han encontrado dos elementos reguladores, uno positivo y otro negativo, con diferente margen de lectura. El elemento regulador positivo contiene una secuencia consenso de unión a la proteína activadora (AP-1), la cual es activada por *transactivación* de las proteínas *fos y jun* (Veerkamp and Maatman 1995a).

# TABLA 1.2.- Distribución de las formas de las FABPs en los diferentes tejidos (Modificada de Veerkamp & Maatman, 1995).

<b>Tipo de FABP</b> (nomenclatura _Z- proteína)	Número	Tejido	
Hepática	FABP1	Hígado, intestino, estómago, riñones, páncreas	
Intestinal	FABP2	Intestino, estómago	
Corazón, muscular	FABP3	Corazón, riñón, músculo esquelético, aorta, pulmón, glándulas mamarias, placenta, cerebro, testículo, ovario, glándulas adrenales, estómago	
Adipocito (Adipocite)- aP2	FABP4	Tejido adiposo	
Epidérmica (Epidermal)- keratinocyte	FABP5	Piel, endotelio capilar, cerebro, testículo, retina, adipocito, riñón	
Íleon (Illeal)-ILBP, gastrotopina	FABP6	Íleon, ovario, glándulas adrenales, estómago	
Cerebral (Brain)-BLBP	FABP7	Cerebro y bulbo olfatorio, retina	
Mielina (Myelin)- myelin-P2	FABP8	Sistema Nervioso Periférico	
Testicular (Testicular)- PERF15	FABP9	Testículo	

La presencia de un tipo de FABP en un tejido no significa o indica que su distribución sea extensiva a todos los tipos celulares en ese tejido.

El tipo de FABP puede estar limitado específicamente a un tipo celular o puede estar presente sólo en determinadas etapas del desarrollo o del tiempo.

En morado se indican las tres formas que están presentes en el Sistema Nervioso Central.

La estructura proteica de las FABPs se ha estudiado mediante difracción de rayos X. Los miembros de la familia poseen una semejanza moderada con respecto a la estructura primaria, aunque son muy semejantes en lo que respecta a su estructura terciaria, siendo el barril  $\beta$  un motivo estructural básico común a todas ellas (Banaszak et al. 1994; Reese-Wagoner et al. 1999; Thompson et al. 1999).

Estas proteínas contienen entre 126 y 137 aminoácidos, aproximadamente, y difieren marcadamente en su composición aminoacídica (identidad 20-70%) (Veerkamp and Maatman 1995b; Veerkamp et al. 1999). Las CRBPs y CRABPs muestran una similitud de entre 20 y 45 % con el resto de las FABPs. La comparación de las secuencias de diferentes FABPs muestra una amplia variación en la estructura primaria. En relación a ella, las FABPs pueden dividirse en tres grupos: (i) el primero, que agrupa a las FABP1 y FABP6, son proteínas capaces de unir ácidos grasos y otros ligandos de mayor tamaño, como sales biliares, colesterol y derivados del grupo hemo; (ii) el segundo, compuesto por las FABP3, FABP5 y FABP7, que además son las tres formas presentes en el cerebro, son capaces de unir ácidos grasos y adicionalmente retinoides y eicosanoides (Schaap et al. 2002); y (iii) compuesto únicamente por la FABP2, que únicamente une ácidos grasos, pero en una conformación diferente al resto de las FABPs (conformación doblada, en lugar de forma de U) (Sacchettini et al. 1988).

Todas las FABPs unen una única molécula de ácido graso, con la excepción de la forma FABP1, que puede unir dos, y la FABP6, la cual tiene baja afinidad por los ácidos grasos y une preferentemente ácidos biliares.

La estructura terciaria, como ya se ha indicado, está bastante conservada. Está formada por diez cadenas  $\beta$  antiparalelas, con una longitud de 4-10 aminoácidos, que forman entre ellos una red de puentes de hidrógeno. Además, posee dos  $\alpha$ -hélices cortas, localizadas entre la primera y la segunda cadena  $\beta$ . Las cadenas  $\beta$  forman dos planos de cinco cadenas cada uno, o láminas  $\beta$ , organizadas en forma de barril llamado barril  $\beta$  ( $\beta$ -*clamp*). Un motivo hélice-giro-hélice de alrededor de 20 aminoácidos, formado entre las cadenas  $\beta$  A y B, actúa cerrando la estructura (Banaszak et al. 1994; Bleck et al. 1998; Cistola et al. 1989; Hodsdon and Cistola 1997; Hodsdon et al. 1995). La estructura de barril  $\beta$  les confiere una gran estabilidad, de forma que pequeñas modificaciones químicas o la mutagénesis puntual no cambian el plegamiento de la proteína (Ver Esquema 16).

En relación a la unión a los ligandos, la arquitectura del barril  $\beta$  permite la creación de una cavidad central capaz de acoger al ligando o ácido graso, la cual puede cerrarse con las dos  $\alpha$ -hélices. El ácido graso queda unido mediante una interacción iónica entre su grupo carboxilo y alguno de los restos, bien una tirosina o una arginina, de la proteína, que se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno (Jakoby et al. 1993; Xu et al. 1993). En la unión al ligando también importa la carga superficial de cada una de las proteínas, y ésta varía con cada forma de las FABPs; así, el punto isoeléctrico de la FABP3 está alrededor de 5,0, el de las FABP1 y FABP5 de 6,0, y el de las FABP4 y FABP9, básicas, entre 7,6-9,0.



1.2.1.2.1. Tipos de FABPs presentes en el Sistema Nervioso Central

Se han descrito, hasta la fecha, cuatro tipos de FABPs en el Sistema Nervioso: FABP8, la forma mielínica, también llamada P2, en el Sistema Nervioso Periférico, que tiene un papel activo en la elongación y transporte de ácidos grasos durante el proceso de mielinación, y FABP3, FABP5 y FABP7 en el Sistema Nervioso Central (Eylar et al. 1980a; Eylar et al. 1980b; Narayanan et al. 1991; Owada et al. 1996a; Owada et al. 1996b; Trapp et al. 1984).

La presencia en el cerebro fue descubierta por primera vez por Bass y sus colaboradores (Bass et al. 1984), que observaron la estimulación de dichas proteínas en la captación sinaptosómica de aminoácidos dependiente de Na<sup>+</sup>. Posteriormente, fue aislada una FABP citosólica en el cerebro de rata (Senjo et al. 1985) y se demostró la presencia de varias FABPs homólogas en cerebro bovino, muy relacionadas con la FABP3 (Schoentgen et al. 1989). La clonación génica sirvió para la identificación de FABP7, más conocida como BLBP (Bennett et al. 1994; De Leon et al. 1996; Feng et al. 1994; Liu et al. 1997; Schoentgen et al. 1989). La forma epidérmica, FABP5 (también llamada E-FABP, o FABP de

kerationocitos, de la piel, o incluso asociada a psoriasis humana), fue encontrada originalmente en el ganglio de la raíz dorsal de rata, después de daño periférico, denominándose DA11 (De Leon et al. 1996; Liu et al. 1997) y, posteriormente, se observó también en células endoteliales de la microvasculatura (Masouye et al. 1997)(Masouye et al. 1997). Los genes de las tres FABPs presentes en el cerebro muestran una expresión espacio temporal diferenciada durante el desarrollo y el cerebro adulto (Liu et al. 2000; Owada et al. 1996b).

Su estructura primaria tiene dos triptófanos equivalentes, un número diferente de cisteínas y, en los cuatro tipos, la unión del ácido graso en la cavidad es a través del grupo carboxilo con una tríada de aminoácidos: dos restos de arginina y una tirosina. La cadena del ácido graso se aplana contra la pared de la cavidad y se une en forma de U (Bernlohr et al. 1997; Hohoff et al. 1999; Zanotti 1999) (Ver en la página anterior Esquema 16).

### 1.2.1.2.1.1. FABP3 (H-FABP)

La expresión de FABP3 se hace evidente en el cerebro de rata después del nacimiento, con un incremento gradual y confinado a la sustancia gris, sugiriendo que su mRNA es específico de neuronas diferenciadas (Owada 2008; Owada et al. 1996a). Por el contrario, estudios de *hibridación in situ* no detectaron niveles significativos del mRNA en el cerebro de embriones de roedores (Owada et al. 1996b). Los niveles de la proteína en roedores son detectables a partir del día E19, después del cual se incrementan hasta, al menos, el día P14 postnatal, disminuyendo en el cerebro adulto (Sellner et al. 1995). En la etapa adulta, la expresión de FABP3 se detecta en la capa mitral del bulbo olfatorio, en el neocórtex cerebral (capas II-VI), y en las capas neuronales del hipocampo. En el cerebelo, la expresión del mRNA de FABP3 se hace evidente en las células de Purkinje, al igual que en las células granulares. No se ha detectado ni en la materia blanca, ni en las células 2008; Owada et al. 2004)). Estos datos sugieren la participación en la formación de las neuritas y la maduración de las sinapsis.

# **1.2.1.2.1.2.** FABP5 (E-FABP)

La FABP5 predomina en el cerebro de rata y ratón en estadios prenatales y perinatales. La expresión de mRNA y proteína de FABP5 alcanza niveles altos durante la neurogénesis, la migración neuronal y la diferenciación terminal de las neuronas (Liu et al. 2000; Liu et al. 1997). La expresión es evidente, tanto en la zona germinal ventricular, como en la capa celular granular externa del cerebelo, lo que sugiere que esta proteína está ligada al linaje neuronal. No se distingue en la materia blanca, a diferencia de la FABP7, hasta las etapas postnatales tempranas (Owada et al. 1996a). La expresión disminuye, manteniéndose en unos niveles bajos en el cerebro adulto (Liu et al. 1997). Parece ser que gran parte de la materia gris del cerebro en etapas postnatales mantiene niveles moderados o débiles de mRNA de FABP5, siendo evidente su expresión en el córtex cerebral y en el hipocampo

(Liu et al. 2000; Owada et al. 2006; Owada et al. 1996b). Su expresión está confinada en determinados nichos con células en estadios tempranos del desarrollo, similares a los de los progenitores neuronales, aún cuando sea en cerebros en adulto. El ratón *knock-out* mostró un fenotipo normal en adulto y una compensación por FABP3 (Owada et al. 2002).

#### 1.2.1.2.1.3. FABP7 (B-FABP)

La expresión de los mRNA de FABP7, al igual que en el caso de los de FABP5, es predominante en las etapas prenatal y perinatal en el cerebro de rata y ratón (Liu et al. 2000; Liu et al. 1997; Owada et al 1996a). Esta proteína se expresa primero en los precursores de las células neuroepiteliales del cerebro en desarrollo y después se localiza, de una manera restringida, en células gliales radiales y en astrocitos inmaduros (Feng et al. 1994; Kurtz et al 1994). La expresión en las células gliales persiste, únicamente, en la fibra del nervio olfatorio. Así mismo, también se expresa en la retina fetal humana y en los gliomas malignos (Godbout et al. 1998). El mRNA de FABP7, como se ha indicado, está presente de una forma muy abundante en la glía radial, células progenitoras neurales, en la zona ventricular y en la zona subventricular, donde la neurogénesis es prominente. En los estadios neonatales, la expresión en zonas germinales permanece de manera intensa y hay células positivas tanto en la materia gris como la blanca. El descenso en la presencia de mRNA se registra por igual en todo el cerebro, pero permanece aún en las células de Schwann del nervio olfatorio, la glía radial del giro dentado y las células gliales de Bergmann (Owada 2008). En la etapa postnatal se ha detectado FABP7 en astrocitos de la materia blanca y glía radial (Owada 2008)(Owada 2008). Es utilizado habitualmente como marcador de glía radial o progenitores en estadios tempranos.

#### 1.2.2. El ácido oleico en el sistema nervioso

#### **1.2.2.1.** Características generales

El ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_{2)}$ , o ácido cis-9-octadecenoico según la IUPAC, es un ácido graso formado por 18 átomos de carbono y un doble enlace en disposición *cis* en el carbono 9 (18:1, c $\Delta$ 9). Es soluble en metanol y disolventes orgánicos pero no lo es en agua ni disoluciones acuosas por sí solo. Es uno de los ácidos grasos monoinsaturados con una mayor presencia en la naturaleza. El doble enlace en esta disposición es suficiente para incrementar la fluidez de las membranas biológicas de forma considerable.

#### **1.2.2.2.** Biosíntesis, localización

La síntesis de ácido oleico es inducida en los astrocitos por la albúmina, una proteína sérica de la que ya se ha hablado en apartados anteriores, y que está presente en el

cerebro en condiciones fisiológicas, exclusivamente durante el desarrollo (Tabernero et al. 2002b). Se ha demostrado que, en astrocitos, la albúmina aumenta la síntesis de ácido oleico, a partir de lactato, glucosa y 3-hidroxibutirato, de una forma dosis-dependiente (Tabernero et al. 2001b).



ocurriendo la transcitosis con el paso por el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático. En el retículo, la albúmina capta el ácido oleico, induciendo de esta forma la activación del factor SREBP-1, que promueve la síntesis de la estearil-CoA desaturasea-1 (SCD-1), la enzima limitante de la síntesis de ácido oleico. Por último, el complejo albúmina-ácido oleico es liberado al espacio extracelular por exocitosis activa

La primera reacción de la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el citosol, es dependiente de ATP y está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2), enzima con una alta actividad durante el periodo neonatal temprano, con un máximo en el sexto día postnatal (P6) y cuya expresión disminuye desde el día 20 postnatal (P20) en rata (Carey E.M. 1982). 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 (palmitoil-CoA) a partir de una molécula de acetil-CoA y siete de malonil-CoA con gasto de 14 NADPH(H<sup>+</sup>). El complejo AGS es un complejo multienzimático cuyas reacciones son comunes en todos los organismos, y presenta una organización variable. La actividad de esta enzima es elevada en la corteza cerebral durante la última etapa de gestación en la rata y disminuye a partir del día P5 de vida postnatal. En el retículo endoplasmático se cataliza la elongación del ácido palmítico para formar estearil-CoA, de 18 atomos de carbono. Palmitil-CoA y estearil-CoA sirven como precursores de los dos ácidos grasos monoinsaturados más comunes: ácido oleico (18:1, c∆9) y ácido palmitoleico (16:1,  $c\Delta 9$ ). El doble enlace en disposición *cis* se introduce por la estearil-CoA desaturasa (SCD o  $\Delta$ 9-desaturasa) (EC. 1.14.99.5) y es la enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos mono-insaturados (Tabernero et al. 1993).

El ácido oleico sintetizado en los astrocitos depende de la actividad de la SCD1, enzima limitante de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, cuya expresión está regulada por el factor de transcripción SREBP-1 (*stearol regulatory element-binding protein-1*), y cuya activación se produce cuando la albúmina capta el propio ácido oleico recién sintetizado (Tabernero et al. 1993; Tabernero et al. 2002b; Velasco et al. 2003)(Ver Esquema 17).

El ácido oleico forma parte de los fosfolípidos de la membrana neuronal, en forma de fosfatidilcolina y fosfatidilserina. Se incorpora preferentemente en las bases de las prolongaciones somáticas neuronales denominadas neuritas, lo que sugiere que éstas requieren un incremento en la fluidez de la membrana en los sitios donde emergen nuevos axones y/o dendritas.

El ácido retinoico y los ácidos grasos de cadena larga (LCFA), así como algunos de sus metabolitos, pueden actuar regulando la expresión de determinados genes, vía varias clases de receptores nucleares, de los que los mejor caracterizados son los PPARs ("receptores activados por proliferadores de peroxisomas") (Muoio et al. 2002; Tan et al. 2002). Estos receptores tienen como ligandos endógenos los ácidos grasos, con una mayor afinidad por los de cadena larga no saturados que por los saturados (Gottlicher et al. 1992; Hostetler et al. 2005; Kliewer et al. 1997). Nuestro grupo de investigación demostró que el ácido oleico requiere del PPARa para ejercer su efecto neurotrófico y que el ácido oleico induce la translocación al núcleo del PPARa (Bento-Abreu et al. 2007).

# **1.2.2.3.** Efecto axonogénico durante la diferenciación neuronal

El ácido oleico es capaz de promover *in vitro* patrones similares a los observados *in vivo* en la diferenciación neuronal. En este sentido, se ha observado la agrupación de los somas neuronales, formando estructuras que se asemejan a la materia gris y promoviendo una distribución radial de las proyecciones dendríticas y los axones para contactar con grupos de neuronas adyacentes y dejando un espacio equivalente a la materia blanca del Sistema Nervioso Central –agrupaciones de materia gris/materia blanca- (Bento-Abreu et al. 2007; Medina and Tabernero 2002; Tabernero et al. 2001b).



albúmina-ácido oleico generado por los astrocitos. Los astrocitos, en respuesta a la albúmina, son capaces de sintetizar ácido oleico que, unido a la propia albúmina, puede ser captado por las neuronas, en las que induce diferenciación neuronal, caracterizada por el aumento de los marcadores moleculares GAP43 y MAP2. Abreviaturas: DCX,

doblecortina, marcadora de migración neuronal; GAP43, proteína marcadora de crecimiento axonal; MAP2, proteína marcadora de diferenciación dendrítica; PKC, proteína kinasa C; PPARα, receptor activado por la proliferación de peroxisomas α; RE, retículo endoplasmático; SCD1, estearil-CoA desaturasa; SREBP1, "Stearol regulatory element-binding protein-1", factor de transcripción.

La presencia de ácido oleico formando un complejo con albúmina produce un incremento de las proteínas marcadoras de diferenciación neuronal, MAP2 y GAP43, ya descritas en apartados anteriores, que se ve acompañado, también, de un aumento en la expresión de sus mRNAs (Bento-Abreu et al. 2007; Rodriguez-Rodriguez et al. 2004; Tabernero et al. 2001b) (Ver Esquema 18).

Recientemente se ha descrito que la albúmina se encuentra presente en la zona subventricular y en el parénquima cerebral circundante, durante el primer día de vida postnatal, disminuyendo a partir del día tercero. Conjuntamente con este hecho, la albúmina induce la axonogénesis en el estriado, produciendo un aumento significativo de la expresión de GAP43, así como del grosor de los fascículos axonales. Este fenómeno depende de la actividad de SCD1 y todo ello, en su conjunto, parece indicar que es el ácido oleico sintetizado en la SVZ, en respuesta a la presencia de albúmina, el que controla la maduración neuronal en el estriado durante la etapa perinatal del desarrollo cerebral (Polo-Hernandez et al. 2010).

#### 1.2.3. Proteína kinasa C

Las proteínas kinasas C (PKC) (EC 2.7.11.13) son una familia de serina/treonina kinasas, compuestas por 10-11 isoenzimas distintas, que se suelen subdividir en tres grupos basados en la homología de su secuencia, junto con las necesidades de activadores y cofactores o segundos mensajeros (Purkayastha et al. 2009). Estos grupos incluyen las isoformas denominadas convencionales o clásicas (cPKC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ); las *noveles* (nPKC  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\theta$ ,  $\mu$  y  $\eta$ ), y las atípicas (aPKc  $\zeta$  y  $\lambda$ ) (Mellor and Parker 1998; Viveiros et al. 2003). Los isotipos convencionales (cPKCs) son activados por fosfatidilserina, Ca<sup>2+</sup> y diacilglicerol. Las nPKCs son activadas por diacilglicerol y fosfatidilserina, pero no son dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Las aPKCs son lípido-dependientes, pero no son sensibles a Ca<sup>2+</sup>, ni responden al diacilglicerol (Mellor and Parker 1998; Newton 2001; Ventura and Maioli 2001) (Ver esquema con las regiones estructurales en el Esquema 19).

Las formas dependientes de Ca<sup>2+</sup> tienen diferente especificidad de substrato y dependencia de fosfolípidos cuando se comparan con las formas independientes de Ca<sup>2+</sup> y el hecho de su independencia de Ca<sup>2+</sup> sugiere una función celular diferente (Konno et al. 1989).

En el cerebro, las PKC están altamente concentradas y están implicadas en un amplio espectro de funciones neuronales, tales como la modulación de los canales iónicos (Cogram et al. 2004), de receptores (Ducibella et al. 1993) y liberación de neurotransmisores (Emoto et al. 1995). Su activación también está implicada en el inicio y el mantenimiento de procesos de potenciación a largo plazo (LTP) y procesos de depresión a largo plazo (LTD) (Gallagher et al. 2001; Gallicano et al. 1995; Gallicano et al. 1997).

La contribución de estas proteínas al proceso de diferenciación neuronal se ha estudiado en líneas celulares como PC12 (Lai et al. 2011), NG108-15 (Battaini et al. 1994a; Battaini et

al. 1994b) y líneas de glioma C6 (Hu et al. 2010; Soma et al. 1994) y en cultivos primarios de neuronas de hipocampo (Tejero-Diez et al. 1995). Varios autores han señalado su importancia en los procesos de supervivencia, creación y crecimiento neurítico, promovidos por varios factores de crecimiento y otros tratamientos llevados a cabo en estos cultivos (Schmitt and Meves 1993; Thompson and Levin 2010).



Existen dos patrones distintos de expresión: las isoformas cPKC tienen niveles de expresión bajos inicialmente y después de 2-3 días en cultivo su contenido se incrementa de manera continuada, mientras que las isoformas nPKCs, que tienen una expresión más temprana, alcanzan un máximo de expresión con solo 2-3 días en cultivo.

La PKC está implicada en la diferenciación neuronal inducida por el ácido oleico, dado que su inhibición previene los efectos neurotróficos del ácido oleico (Granda et al. 2003; Rodriguez-Rodriguez et al. 2004; Tabernero et al. 2001b). 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).

#### **1.2.3.1.** Proteína kinasa C alfa (PKCα)

Proteína kinasa perteneciente a la familia clásica dependiente de Ca<sup>2+</sup>, se encuentra ampliamente distribuída en el cerebro de la rata, en el neuropilo de las capas plexiforme externa y granular interna del bulbo olfatorio, determinados núcleos de la amígdala, neuronas colinérgicas del caudado putamen, neuronas piramidales de la capa I del neocórtex y todas las regiones del hipocampo, interneuronas del hipocampo y neuronas no piramidales de las capas IV-VI del neocórtex, además de neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra*, los colículos y la oliva inferior (Tanaka and Saito 1992).

Está descrito que algunos ácidos grasos, como el ácido araquidónico (AA, 20:4) y el ácido oleico (19:1 *cis*), son capaces de estimular la activación de diferentes enzimas, incluyendo la de la PKC. Además se ha demostrado que tanto el ácido araquidónico como el ácido oleico, a diferencia de otros ácidos grasos como el ácido elaídico (18:1 *trans*) o el ácido araquídico (20:0), son capaces de inducir la fosforilación de GAP43 mediante la acción de PKC en un mecanismo dependiente de Ca<sup>2+</sup> y DAG (Schaechter and Benowitz 1993). En el apartado A del Esquema 20, se muestra la región de GAP43 fosforilada por PKC. Recientemente se ha descrito que el ácido araquidónico es activador directo de la PKC $\alpha$ , necesitando de Ca<sup>2+</sup> para ejercer su función, y que la region de C2, aunque no la región rica en lisinas, es necesaria para su localización y para que ejerza su función. Además, los subdominios C1A y C1B son necesarios para la localización en la membrana y la activación a través de DAG (Corbalan-Garcia and Gomez-Fernandez 2006; Lopez-Nicolas et al. 2006) (Véase el apartado B del Esquema 20).



(B) Modelo estructural del dominio C2 de PKCα. Abreviatura: Lys, lisina. Modificado de Corbalán-García et al. 2006.

Además, la PKC $\alpha$  juega un papel principal en la inducción de la depresión a largo plazo (LTD) en las células cerebelares de Purkinje. El modelo clásico indica una activación secuencial de los estados de PKC $\alpha$ , que se transloca del citosol a la membrana plasmática por unión con Ca<sup>2+</sup> en su región C2 y después se vuelve completamente activa por unión a diacilglicerol (DAG), o compuestos similares, en su región C1 (Crepel and Jaillard 1991; Ido et al. 1987; Ito et al. 2001; Itoh et al. 2001; Katoh et al. 1990; Oancea and Meyer 1998)

# 1.2.3.2. Proteína kinasa C épsilon (PKC ε)

La PKC épsilon se expresa ubicuamente por todo el organismo pero se encuentra predominantemente en el cerebro. Se han realizado análisis bioquímicos que han demostrado que sus formas, tanto citosólica, como asociada a membrana, de diferentes pesos moleculares, están presentes en extractos neuronales. Se ha localizado ampliamente en el hipocampo, las células granulares de las "islas de calleja"- grupo de células granulosas localizadas en el interior del cuerpo estriado ventral, presente en el cerebro de la mayoría de los mamíferos-, y muestra una moderada expresión en la corteza cerebral, el núcleo septal lateral, núcleo *accumbens*, la corteza frontal, el estriado y el *caudado putamen* (Jacob et al. 2005; Minami et al. 2000; Saito et al. 1993; Uhlen and Ponten 2005).

La PKC épsilon fue la primera de las isoformas de las serina/treonina-kinasas, nodependiente de Ca<sup>2+</sup> sino sensible a ésteres de forbol /diacilglicerol (Chen and Tian 2011). Comparte muchas características comunes con otros miembros de la subfamilia de las nPKC, tales como tres regiones conservadas, C1, C3 y C4, y cinco regiones variables, V1-V5. La zona C1 puede actuar como un sitio de unión a la membrana, debido a su contenido en motivos ricos en cisteínas que unen ésteres de forbol y diacilgliceroles. La C1 también se conoce como área reguladora. C3 y C4 son los dominios catalíticos que contienen un sitio de unión a ATP, un dominio tipo giro que actúa como sitio de activación y el área C4 tiene el sitio de reconocimiento de substrato. Como característica distintiva o única, la PKC épsilon tiene un motivo de seis aminoácidos de unión a la actina, entre los subdominios C1a y C1b, que es importante para los cambios morfológicos de las neuronas (Shirai et al. 2008; Zeidman et al. 2002).

INTRODUCCIÓN PLAN DE TRABAJO MATERIAL Y MÉTODOS DISCUSIÓN Discusión CONCLUSIONES BIBLIOGRAFÍA

# > 2.- PLAN DE TRABAJO

INTRODUCCIÓN
PLAN DE TRABAJO
MATERIAL Y MÉTODOS
RESULTADOS
Discusión
CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA
Con objeto de profundizar en el conocimiento del transporte intracelular del ácido oleico en las neuronas y de su mecanismo de acción, y de acuerdo con las consideraciones descritas en la Introducción, el Plan de trabajo quedó establecido como sigue:

- I. Estudio de la posible participación de las proteínas de unión y transporte de ácidos grasos (FABPs) en el efecto neurotrófico promovido por el ácido oleico en neuronas.
- PLAN DE TRABAJO
- II. Estudio de la posible participación de las isoformas de la proteína kinasa C (PKC) en el mecanismo neurotrófico del ácido oleico.

PLAN DE TRABAJO

## > 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

53

INTRODUCCIÓN	
PLAN DE TRABAJO	
MATERIAL Y MÉTODOS	
RESULTADOS	
Discusión	
CONCLUSIONES	
BIBLIOGRAFÍA	

#### 3.1. Material

#### 3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario.

Se emplearon ratas albinas Wistar, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Los animales se criaron en jaulas –no en RACKs ventilados-, manteniendo el número de ejemplares adecuado a las dimensiones de las mismas. Se emplearon ciclos de luzoscuridad de 12h. La humedad osciló entre el 45 y el 65 %. La temperatura se controló entre los 20 y los 25 °C.

Los animales fueron alimentados con una dieta sólida estándar (17 % proteínas; 3 % lípidos; 58,7 % glúcidos; 4,3 % celulosa; 5 % sales minerales y 12 % humedad). Los animales tuvieron en todo momento acceso libre al agua de bebida y a la comida.

Se emplearon fetos de 17,5 días de gestación (E17,5) para la realización de los cultivos primarios de neuronas y los co-cultivos de neuronas y astrocitos; fetos a término (PO), para los cultivos organotípicos; neonatos de un día de vida (P1), para la obtención de cultivos de astrocitos; y neonatos de 1 y 3 días de vida postnatal (P1 y P3) para los estudios con cortes histológicos in vivo.

Los fetos E17,5 fueron obtenidos tras dislocación cervical de la madre. En todos los casos, los sacrificios de los animales fueron realizados siguiendo las normativas vigentes para la experimentación y el sacrificio de animales, según las directrices europeas (Convenio 123, Decisión 1999/575/CE y Directiva 2003/65/CE), la legislación española (Ley 32/2007 y Real Decreto 1201/2005), y de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Decreto 266/1998), y los protocolos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

#### 3.1.2. Medios instrumentales

El agua se purificó mediante un equipo "Milli-Q<sup>R</sup> Integral 3 System" (MilliPore, Madrid, España), con dispensadores y filtros de agua Ellix (agua purificada tipo II) y agua Milli-Q (agua ultrapura tipo I).

Las pesadas se realizaron en balanzas, granatarias (Sartorius, modelo 1216MP, GMBH, Göttingern, Alemania) o analíticas (Acculab, modelo Atilon ATL-224-I; Sartorius modelo 1207 MP, GMBH, Alemania).

Según el requerimiento del protocolo para las centrifugaciones se utilizaron los modelos de centrífugas siguientes: centrífuga de mesa Beckman, modelo TJ-6 (Beckman Instruments, USA); centrífugas eppendorf, modelos 5430, modelo 5702; modelo 5415R, y modelo 5417R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

El pH se determinó con un electrodo medidor de protones, micro-pH 2000, marca Crison (Selecta, Barcelona, España).

El material de vidrio fue esterilizado mediante calor seco, durante un mínimo de 12 horas, en una estufa-horno de esterilización, termostatizada a 170 °C, Selecta, modelo S-20, o Memmert.

El agua, el material de disección y el resto de utensilios y material, para los que eran requeridas condiciones de asepsia, se esterilizaron por medio de calor húmedo, en autoclaves, Selecta modelo 437 o modelo Autester ST.

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

El cultivo primario se realizó empleando material estéril y fabricado específicamente a tal fin. Las células fueron sembradas en placas Petri de 35 mm de diámetro, de la casa comercial Falcon, modelo 353001 -Easy Grip Tissue Culture Dish- (Becton & Dickinson Labware Europe, Le Pont D Claix, Francia), en el caso de los cultivos de neuronas, y placas de la casa comercial Nunc (Nuclon, Roskilde, Dinamarca), en el caso de los astrocitos.

En los cultivos organotípicos se emplearon placas multipocillo de 6 pocillos Nunc, de 35 mm de diámetro de pocillo (Nuclon, Roskilde, Dinamarca) e insertos estériles con 0,4 µm de diámetro de poro y 30 mm de diámetro total (Millicell, Millipore Ibérica, Thermo Fischer).

Los medios de cultivo y soluciones tamponantes empleadas fueron filtradas a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore Ibérica, Thermo Fischer). Para volúmenes pequeños de soluciones estériles se utlizaron filtros de jeringa de 0,2 µm de diámetro de poro (Pall Corporation, Michigan, USA).

Los medios y disoluciones de cultivos fueron calentadas en un baño termostatizado a 37 °C, modelo Precisterm, Selecta.

El contaje de células previo a la siembra en placas se realizó en una cámara cuentaglóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania), mediante un dispositivo automático Countess (Invitrogen, LifeTecnologies), en el que se ha adaptado un protocolo para el diámetro y forma celular de las neuronas (Circularidad 55%; tamaño máximo 20 μm; tamaño mínimo 5 μm).

Las células se mantuvieron a 37 °C y con flujo constante de  $CO_2$  al 5,0 % en incubadores automáticos de  $CO_2$ , modelos Galaxy S y Galaxy 170 (RS Biotech, Northants, Reino Unido). Para la realización de las agitaciones mecánicas violentas, se emplearon dispositivos tipo vórtex, modelos MS-1 minishaker (IKA-Works Inc, USA).

La observación periódica de las células se realizó mediante un microscopio de contraste de fases modelo Nikon TS100 (Nikon, China).

Así mismo se empleó un microscopio de fluorescencia invertido modelo Nikon Eclipse TS2000 (Nikon, China), captándose las imágenes con un programa informático TCS-SP (Leica Microscopy Systems) y una cámara de video digital modelo Leica DC 350F (Leica Microsystems).

Se empleó un espectrofotómetro, modelo UV-120-02 (Schimadzu Co., Kyoto, Japón) y cubetas de plástico, de 1 mL de capacidad y 1 cm de paso de luz, adecuadas para el aparato de medida (Elkay, Boston, USA). Alternativamente, se hizo uso de un espectrofluorímetro, modelo Appliskan tipo 2001 (Thermo Fischer. Finlandia). En dicho

espectrofluorímetro se utilizaron placas multipocillo de 6, 12 ó 96 pocillos, de la casa comercial Nunc (Nuclon, Roskilde, Dinamarca).

Se empleó un "Nanophotometer" de la casa comercial IMPLEM (BioNova, Munich, Alemania), para medidas en pequeños volúmenes. También se utilizó un fluorímetro modelo Qbit Fluorometer (Invitrogen, LifeTecnologies) para la cuantificación de proteínas. En este caso, se utilizaron tubos eppendorf de 0,5 mL, específicos para este dispositivo ("Qbit assay tubes"), proporcionados por la misma casa comercial (Invitrogen).

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 "Power Pac 300" de Bio-Rad (BioRad, Hercules, USA). Cuando se utilizaron geles "pre-cast" se empleó una sistema similar al anterior pero adaptado al tamaño de los geles, modelo "X-Cell4 Surelock Midi-Cell" (Invitrogen, LifeTecnologies).

Las membranas utilizadas fueron de nitrocelulosa (BioRad) o PVDF (Millipore Iberica, Thermo Fischer). La transferencia de geles pudo ser realizada en determinados casos con un dispositivo iBlot (Invitrogen, LifeTecnologies), en cuyo caso se emplearon "iBlot Gel Transfer Stacks" con membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, LifeTechnologies).

Las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con anticuerpos primarios o secundarios se realizaron en un "Navigator" (BioComp Instruments, Canadá).

El revelado de las películas de autorradiografía (Fujifilm) se llevó a cabo manualmente, con líquidos de la marca Fujifilm, "X-Fix-Fixer & Replenisher, y Anatomix Developer Replenisher" (FujiHunt-Fujifilm, Europe WV, Bélgica); o empleando una máquina de revelado Kodak Medical X-Ray processor 102 (Rochester, NY, USA).

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" (BioRad). Los viales de plástico de 0,2 mL para PCR se adquirieron en Biotools (Biotools-B&M Labs SA, Madrid, España). El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue un modelo Gel 2000 asociado a una cabina "Universal Hood II" (BioRad).

La fijación de los tejidos mediante perfusión se llevó a cabo con una bomba de perfusión modelo "Miniplus-3 M312" (Gilson, Villiers-le-Bel, Francia). Los cortes de microsección de los cerebros se realizaron con criostatos modelo CM3050S (Leica, Wetzlar, Alemania) y "Microm HM50" (Thermo Fischer).

Los cortes coronales para el cultivo de organotípicos se consiguieron gracias a un "tissuechopper" modelo "McIlwain Tissue Chopper" (Mickle Laboratory Enginering Co.Ltd., Surrey, UK). El microscopio empleado como ayuda para la obtención y separación del tejido en el cultivo organotípico es un modelo MSZ800 de Nikon (Barcelona, España).

Para los análisis de microscopía confocal se utilizaron el microscopio confocal modelo LSM510 (Zeiss), del Centro de Investigación del Cáncer (CIC/Universidad de Salamanca, España) y el microscopio confocal Leica DM-IRE2 (Leica), del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL/Universidad de Salamanca). Los resultados se analizaron empleando los programas correspondientes a cada uno de los dos equipos, es decir, el programa de análisis Zeiss LSM Image y el programa LCS Lite Leica.

El análisis de imágenes se llevó a cabo mediante el programa ImageJ (NIH Image), desarrollado por el Área de Servicios a la Investigación del "National Institutes of Health" (Bethesda, USA). Así mismo, se utilizó el programa MatLAB (MathWorks, 2008) en el análisis de colocalización de imágenes de fluorescencia.

#### 3.1.1. Productos

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

#### 3.1.1.1. Productos utilizados en la preparación de los medios de crecimiento para los cultivos celulares primarios

El medio de cultivo para el crecimiento de las neuronas fue un medio definido, empleando un medio mínimo modificado, que tenía como base el medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco), con la mezcla de nutrientes F12 HAM (Sigma, D6421), al que se añadieron transferrina (Sigma), insulina (Sigma), piruvato (Sigma), y L-glutamina (Sigma), a las concentraciones indicadas en el posterior apartado de Métodos (véase los apartados 3.2.1 correspondientes a los cultivos primarios).

El suero fetal de ternera (FCS) procede de la casa comercial Boehringer Ingelheim (Heidelberg, Alemania) y el suero bovino de la casa comercial Gibco (LifeTecnologies).

La DNAsa I, la tripsina y la albúmina bovina (Fracción V), que se utilizaron en la realización de los cultivos celulares, fueron suministrados por Roche Diagnostics SL (Barcelona, España).

La poli-L-lisina, utilizada para recubrir el fondo de las placas de cultivo, con objeto de facilitar la fijación de las células, proviene de la casa Sigma.

La citosina- $\beta$ -arabinofuranósido, empleada en los cultivos de astrocitos o en cultivos de neuronas con suero fetal, es de la casa comercial Sigma.

#### 3.1.1.2. Productos utilizados para la preparación de cultivos tisulares

El medio utilizado para la preparación y obtención de cultivos organotípicos, L-15, fue suministrado por Invitrogen.

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

# MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.1.3. Productos utilizados para la preparación de la albúmina libre de ácidos grasos

La membrana utilizada para dializar la albúmina fue adquirida en Sigma. De igual forma, el sulfuro sódico y el ácido sulfúrico 96 % (v/v), empleados para el tratamiento previo y activación de dicha membrana, corresponden a las casas comerciales Sigma y Merck, respectivamente.

Las sales empleadas para la preparación del medio Elliot + calcio, empleado en la diálisis, fueron adquiridas a Sigma o Merck.

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

La albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos fue suministrada por Sigma.

#### 3.1.1.4. Productos utilizados 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 ditiotreitol (DTT), y la Transcriptasa Inversa ("SuperScriptII Reverse Transcriptase") utilizados en la RT, procedían de Invitrogen.

El inhibidor de RNAsas pertenecía a Ambion (Cambridgeshire, UK), mientras que el dietilpirocarbonato (DEPC) utilizado para inactivar las RNAsas pertenecía a Sigma.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la PCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Sigma-Genosys LTd., UK).

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

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

La agarosa utilizada para preparar los geles en las electroforesis era de la casa Pronadisa (Madrid, España).

#### 3.1.1.5. Productos empleados para el silenciamiento génico

Los RNAs de interferencia de cadena corta ("small interfering RNA", o siRNA), fueron adquiridos en Ambion, en el caso de *Gapdh* (Cambridgeshire, UK), o GeneLink-Bionova (Madrid, España), en el resto de los casos.

El reactivo de transfección fue Lipofectamina 2000 y el medio de transfección Opti-MEM, ambos suministrados por Invitrogen y empleados según sus indicaciones.

#### 3.1.1.6. Productos utilizados para el análisis de las proteínas

La inhibición de proteasas durante la recogida de las proteínas se consiguió con un cóctel de inhibidores sin EDTA, de la casa Calbiochem (Calbiochem-Merck, USA), al que se adicionó PMSF procedente de la casa Sigma.

La cuantificación de proteínas se realizó por diferentes métodos, según la procedencia de las muestras a analizar. Se utilizó el método de Bradford o bien se hizo uso del "Qubit fluorimeter", específicamente cuando se analizaron las proteínas procedentes de los cultivos organotípicos o secciones de tejido, mientras que se utilizó un nanoespectofotómetro en algunas situaciones con cultivos primarios, al estar recomendado para proteínas purificadas. En el método de Bradford se empleó el reactivo de Bradford de la casa comercial Bio-Rad (BioRad Laboratories) y cuando se utilizó el fluorímetro Qubit se emplearon los kits comerciales aconsejados por la casa comercial del dispositivo, Invitrogen (LifeTecnologies).

Cuando se prepararon geles de acrilamida para la electroforesis con proteínas, se utilizó una solución 30% acrilamida/N,N'-metilbisacrilamida (29:1) de la casa comercial Bio-Rad (BioRad Laboratories) y, como agentes coayudantes para la gelificación, tanto N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) como persulfato amónico (AMPS), procedentes de la casa comercial Sigma. El marcador de peso molecular de proteínas era de la casa Bio-Rad.

La electrotransferencia de las proteínas a un soporte sólido se realizó con membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (BioRad Laboratories).

Así mismo se utilizaron geles comerciales preparados, NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Midi-Gel de la casa comercial Invitrogen (Invitrogen, LifeTecnologies). En estos casos se utilizaron los productos del kit NuPAGE de dicha casa comercial para la preparación de las muestras y soluciones de electroforesis y transferencia.

El metanol utilizado en la preparación de la solución de transferencia tipo Western-blot era de la casa comercial Panreac Química SA (Barcelona, España).

Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla 3.3 incluida en la página siguiente.

En el bloqueo de los anticuerpos se empleó suero de cabra de la casa comercial Sigma.

Los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón y conejo conjugados con peroxidasa y el sustrato quimioluminiscente Luminol, provinieron de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA).

Para las inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas se emplearon anticuerpos primarios, cuyas características se encuentran recogidas en la Tabla 3.1. Los anticuerpos secundarios conjugados con cianina 3 (Cy3) contra inmunglobulina de conejo fueron suministrados por Jackson (Jackson Laboratories, USA). Los anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor488, AlexaFluor594 o AlexaFluor647, contra inmunoglobulinas de ratón, conejo u oveja fueron suministrados por Invitrogen (Invitrogen, LifeTecnologies).

MATERIAL Y MÉTODO

El marcador fluorescente de DNA, el 4'-6-damindino-2-fenilindol (DAPI), procede de la casa comercial Invitrogen (Invitrogen, LifeTecnologies). Alternativamente se utilizó el marcador de ácidos nucleicos TO-PRO3, perteneciente a la misma casa comercial. El marcador mitocondrial fluorescente, Mitotracker, pertenecía a la casa Sigma.

TABLA 3.1 Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia y "Wostorn-blot"				
Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Concentración /Dilución	Тіро	Suero de procedencia
anti-α-Actinina	Chemicon.MilliPore	1:2000	Monoclonal	α-Ratón
anti-FABP3	Abcam	1:500	Policlonal	α-Conejo
anti-FABP5	Abcam	1:500	Policlonal	α-Conejo
anti-FABP7	Abcam	1:1000	Policlonal	α-Conejo
anti-GAPDH	Ambion	1:4000	Monoclonal	α-Ratón
anti-GAP43	MilliPore	1:500		α-Conejo
anti-GAP43	Sigma	1:500	Monoclonal	α-Ratón
anti-GFAP	Sigma	1:400	Monoclonal	α-Ratón
anti-MAP2 (2a+2b) Clone AP-20	Sigma	1:500	Monoclonal	α-Ratón
anti-PKC-α	Sigma	1:10000 /1:40000	Policlonal	α-Conejo
anti-PKC-ε	Abcam	1:2000	Policlonal	α-Conejo
anti-PPARα	Thermo	1:200	Monoclonal	α-Ratón
anti-α-Tubulina	Sigma	1:1000	Monoclonal	α-Ratón
anti-βIII-Tubulina (TUJ-1)	Covance /Affinity BioReagents	1:1000	Monoclonal	α-Ratón
anti-βIII-Tubulina (TUJ-1)	Abcam	1:500 1:1000	Monoclonal	α-Conejo

El medio de montaje, y conservador de la fluorescencia, para las observaciones al microscopio fue, en el caso de los cultivos primarios, "SlowFade Gold antifade reagent" (Invitrogen, LifeTecnologies), o bien Mowiol, preparado manualmente a partir de reactivos de la casa comercial Sigma, tal y como se recoge en el apartado posterior 3.2.9.1, en el caso de la muestras de tejido del cultivo organotípico.

#### 3.1.1.7. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad celular

En la determinación de la viabilidad celular medida por el método de MTT se empleó el reactivo de MTT, la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de la casa comercial Sigma y dimetilsulfóxido de la casa comercial Fluka (Fluka-Sigma).

#### 3.1.1.8. Productos utilizados en la determinación de la muerte celular

La determinación de la muerte temprana por apoptosis se realizó empleando un kit de "Anexina V - FITC /PI", de la casa comercial Inmunostep SL (CIC, Salamanca, España). La determinación de la apoptosis tardía por el método de TUNEL se realizó empleando en las incubaciones la Transferasa Terminal (DNA deoxinucleotidilexotransferasa, EC2.37.7.31) y los nucleótidos dUTP-biotinilados de la marca Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), en ambos casos. El yoduro de propidio pertenecía a la casa comercial Sigma.

#### 3.1.1.9. Productos utilizados en los tratamientos celulares

La albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos se obtuvo de la casa comercial Sigma.

Los siguientes ácidos grasos: ácido oleico, así como el activador selectivo para la fosfokinasa C épsilon (DCP-LA), el inhibidor de la fosfokinasa C (PKCβII Peptide inhibitor), son de la casa comercial Sigma. El inhibidor específico de la fosfokinasa C épsilon (PKC-ε) y su control negativo se obtuvieron de Calbiochem (Calbiochem-Merck, USA).

#### **3.1.1.10. Otros productos**

Durante el revelado de las proteínas transferidas a las membranas de nitrocelulosa por el método Western-blot se hizo uso, en los bloqueos de los anticuerpos primarios, bien de leche en polvo desnatada calcio (Sveltesse, Nestle, Barcelona, España), o bien de caseína procedente de leche bovina (Sigma).

El Triton-X-100 para la permeabilización de los tejidos provino de la casa Sigma.

El complejo conjugado de estreptavidina con cianina 2 (Cy2) para la unión con los nucleótidos biotinilados en el método TÚNEL era de la casa comercial Jackson (Jackson ImmunoResearch Laboratories, UK).

El reactivo bromuro de tiazol azul de tetrazolio (MTT), utilizado en la cuantificación de la viabilidad neuronal, se adquirió en la casa comercial Sigma.

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. (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.

Se limpiaron los animales 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, estaba compuesta por NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, rojo fenol 10 mg/L, y D-glucosa 14 mM, ajustada a un pH de 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 DEMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v). Finalizada la tripsinización se centrifugó el tejido durante 5 minutos a 500 x q, 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. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM suplementado con suero fetal bovino -FBS- al 10 % (v/v), penicilina G 50 U/mL, estreptomicina 37,5 U/mL, pH 7,2). Una pequeña alícuota de esta suspensión celular, previa homogeneizada, se mezcló con azul de tripano al 0,2 % (v/v) y se utilizó para la determinación de la viabilidad celular y del número de células.

A continuación, se sembraron las células en medio de cultivo, en placas Petri recubiertas con poli-L-lisina (1µg/cm<sup>2</sup>), a una densidad de 1,0 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> y se colocaron en el incubador a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Al segundo día se añadió citosina  $\beta$ -arabinofuranósido 10 µM, que se mantuvo durante 48 horas con el fin de evitar la proliferación de microglía y de células de linaje tipo O-2A (Tabernero et al. 1996). Se realizaron cambios de medio dos veces por semana con el mismo medio de cultivo, previamente atemperado. En estas condiciones se obtienen cultivos de astrocitos de tipo 1, con una pureza aproximada del 95 %, según los datos de su reacción con el anticuerpo específico anti-GFAP (Bento-Abreu et al. 2011). En todos los experimentos se utilizaron astrocitos cultivados entre 14 y 28 días *in vitro* (14-28 DIV).

#### 3.2.1.2. Preparación de 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 Wistar, de 17,5 días de edad gestacional (E17,5). 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, colocándose en una placa Petri con solución salina 4 °C. 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 70 %, se decapitaron y se les extrajo el cerebro, del que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles, para posteriormente excluir cerebelo y bulbo olfatorio, depositando únicamente los hemisferios cerebrales en una placa Petri que contenía solución A (composición indicada anteriormente en la sección 3.2.1.1). Este tejido se disgregó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 4 minutos a 500 x g. El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos, a 37 °C, en la solución B, la cual contenía tripsina (composición indicada también en la sección 3.2.1.1). Posteriormente, se detuvo la tripsinización, añadiéndose al tejido en la solución B, un volumen equivalente de medio de cultivo con FBS 10 % (v/v). Finalizada la tripsinización, el tejido fue centrifugado durante 5 minutos a 500 x g. Tras retirar el sobrenadante, el tejido fue resuspendido en la solución A y, tras hacerlo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada, se dejó decantar durante 4 minutos. Se recogió el sobrenadante y el tejido fue sometido dos veces más al tratamiento anterior. Se reunieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. Las células obtenidas se resuspendieron en un medio de cultivo de neuronas, designado medio definido. Una alícuota de esta suspensión celular fue mezclada con azul de tripano 0,2 % (p/v) para la determinación tanto de la viabilidad celular como del número de células en la suspensión. A continuación, las células se sembraron en placas Petri recubiertas con poli-L-lisina (1 µg/cm<sup>2</sup>), en medio definido (DMEM-F12 suplementado con piruvato sódico 1 mM, apotransferrina 100 µg/mL, L-glutamina 2,5 mM, insulina 5 µg/mL, penicilina G 50 U/mL y estreptomicina 37,5 U/mL, pH 7,2), a una densidad de 1,0  $\times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> o, ligeramente menor, de  $0.8 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> para experimentos de inmunocitoquímica.

#### 3.2.2. Preparación de los cultivos tisulares

#### 3.2.2.1. Preparación de los cultivos organotípicos de rodajas de cerebro

Para los cultivos organotípicos se emplearon fetos de rata a término (PO). Para la extracción de los fetos se procedió, inicialmente, a la dislocación cervical de la rata gestante y, posteriormente, a la decapitación de los fetos extraídos por rápida

histerectomía, colocándolos en una solución salina a 4 °C. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad.

Los cerebros fueron extraídos de la cavidad craneal y se colocaron en una solución de PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,8 mM, y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, pH 7,4), suplementado con glucosa al 5 % (p/v), a 4 °C. A continuación, se retiraron las meninges con la ayuda de una lupa y los cerebros fueron colocados en una placa Petri con medio L-15, a 4 °C. Posteriormente los cerebros, sin meninges, se cortaron en rodajas coronales de un grosor de 250  $\mu$ m, empleando un "tissue-chopper" descrito en el apartado de Material. Se separaron las rodajas y se transfirieron a unos insertos estériles, los cuales están compuestos por una membrana microporosa de 0,4  $\mu$ m de diámetro de poro, que queda en contacto con una cara del tejido y en flotación sobre el medio de cultivo.

Se seleccionaron las rodajas coronales desde el comienzo de la unión de los dos hemisferios cerebrales, en su parte más rostral, hasta el engrosamiento del cuerpo calloso y la aparición del hipocampo, en su parte más caudal (Aproximadamente 3 rodajas por cerebro). Cada inserto es depositado sobre cada uno de los pocillos de una placa con 6 pocillos, o bien sobre placas de 56 cm<sup>2</sup>, con medio de cultivo. Se cultivaron entre 48 y 72 horas (2-3 DIV), a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.3. 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, testada para cultivos celulares y previamente dializada en solución Elliot (Elliot 1969) (NaCl 122 mM, KCl 4,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, y CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, en tampón fosfato sódico 10,8 mM, pH 7,6). Para el tratamiento de la membrana de diálisis se siguieron las instrucciones del fabricante, tratando con bases y ácidos, 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 la solución de Elliot con calcio, se ajustó el pH a 7,37 y se dializó durante 24h con tres cambios de la solución. Después de la diálisis se filtró la albúmina y se almacenó en alícuotas a -20 °C.

#### 3.2.4. Preparación de los tratamientos empleados en los cultivos

#### 3.2.4.1. Tratamientos en astrocitos

Los astrocitos fueron cultivados en DMEM con FBS al 10 % (v/v) durante 14 días para, posteriormente, retirárseles el suero del medio, añadiéndose únicamente DMEM. Previamente a la extracción de proteínas, las placas fueron lavadas con PBS al menos dos veces, durante 10 minutos.

#### 3.2.4.2. Tratamientos en neuronas

Las neuronas fueron cultivadas en medio definido (DMEM-F12 suplementado con piruvato sódico 1mM, apo-transferrina 20  $\mu$ g/mL, L-glutamina 2,5 mM, insulina 5  $\mu$ g/mL, penicilina G 50 U/mL, y estreptomicina 37,5 U/mL, pH 7,2), suplementado o no, con albúmina libre de ácidos grasos y dializada (tratada como se indica en el apartado 3.2.3) al 2 % (p/v), y en presencia o en ausencia de ácido oleico 50  $\mu$ M. Las incubaciones se llevaron a cabo con una duración de entre 24 y 96 horas (1-4 DIV).

El ácido oleico fue disuelto inicialmente en albúmina al 10 %, para preparar una solución stock de oleico que luego era diluida en cada placa.

En situaciones puntuales se cultivaron las neuronas en DMEM con FBS 10 % (v/v), añadiéndose citosina  $\beta$ -arabinofuranósido 10  $\mu$ M.

Cuando se analizaron los efectos de los agonistas e inhibidores de las distintas formas de la fosfokinasa C, se prepararon disoluciones stock en medio definido de DCP-LA 25 mM, del inhibidor de PKC- $\epsilon$  y su control negativo 25 mM, y del péptido inhibidor PKC- $\beta$ II 7 mM, usándose, en todos los casos, en una concentración final en el medio celular de 50  $\mu$ M. 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, posponiendo la adición del complejo albúmina-ácido oleico al menos dos horas desde que se añadían los agonistas o inhibidores. En todos los casos los tratamientos se mantuvieron sin realizarse ningún cambio de medio durante el resto del experimento.

En los casos en los que realizaron experimentos de pérdida de función de manera aguda, haciendo uso de la tecnología del RNA de interferencia, como en el caso de los estudios para cada una de las "proteínas de unión a ácidos grasos" (FABPs), y de las isoformas de la proteína kinasa C, las neuronas fueron silenciadas con siRNA específicos para cada una de las proteínas en el momento de la siembra celular -tal y como se describirá con detalle en el apartado 3.2.6-, y se pospuso 6 horas el añadir otros tratamientos, como la adición de la albúmina o del complejo albúmina-ácido oleico, de tal forma que los siRNA hubiesen actuado a nivel de mRNA.

#### 3.2.4.3. Tratamientos en cultivos organotípicos

De forma similar al caso del cultivo primario de neuronas, se utilizaron tres medios de siembra: un medio definido (similar al descrito en el apartado anterior); un medio definido suplementado con albúmina libre de ácidos grasos y dializada al 2 % (p/v); y un medio definido suplementado con albúmina al 2 % (p/v), al que se ha añadido ácido oleico 50  $\mu$ M.

MATERIAL Y MÉTODOS

En los casos en los que se trató de determinar la participación de las "proteínas de unión a ácidos grasos", o FABPs, en la diferenciación neuronal, los insertos con la rodaja de tejido fueron colocados en un medio definido y en la media hora siguiente se les cambió el medio. En su lugar se cultivaron en un medio con los siRNA añadidos. La albúmina y el complejo albúmina-ácido oleico se adicionaron a este medio 6 horas después.

## **3.2.4.4.** Medida de la viabilidad celular por el método de reducción del bromuro de tiazol azul de tetrazolio MTT

Se empleó el método espectrofotométrico de reducción del bromuro de tiazol azul de tetrazolio (MTT), para cuantificar la viabilidad neuronal en base, fundamentalmente, a la actividad mitocondrial (Deniot & Lang 1986). El fundamento bioquímico está recogido en el Esquema 21. Neuronas en cultivo primario, tras recibir el tratamiento correspondiente, fueron sometidas al método de MTT cada 24 horas durante el intervalo de desarrollo del experimento, hasta alcanzarse las 96 horas de cultivo.

Se aspiró el medio de cultivo y las células se incubaron con una solución 0,5 mg/mL de MTT en medio definido de cultivo, durante 1 hora y 15 minutos a 37 °C, en oscuridad y  $CO_2$  al 5 %. A continuación se aspiró este medio y se adicionó dimetil sulfóxido (DMSO) y se mantuvo 10 minutos en oscuridad y agitación muy suave hasta disolución homogénea de los cristales de formazan formados en el paso anterior. Volúmenes de 200 µL de cada condición se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió su absorbancia a 570 nm en un espectrofluorímetro de placas.



Se realizó una calibración simultánea frente a placas con neuronas sembradas en medio definido y densidad creciente de 0,5, 0,75, 1 y 1,5  $\times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, sometidas al mismo procedimiento y controles positivos de células cultivadas en DMEM suplementado con FCS 10 % (v/v), así como controles negativos de células cultivadas en medio definido al que se han adicionado 50 µL de DMSO inmediatamente después de la siembra.

## 3.2.4.5. Medida temprana mediante el método de la *AnexinaV* de la muerte producida por apoptosis

La fosfatidilserina es un fosfolípido de membrana que se localiza en las células sanas en la cara citoplasmática de la membrana. Sin embargo, en las células apoptóticas la fosfatidilserina se transloca desde el interior hasta el exterior de la membrana, quedando así expuesta al medio extracelular. La *AnexinaV* es una molécula capaz de unirse a la fosfatidilserina cuando ésta se ha visto desplazada hasta la cara externa de la membrana, por lo que si se encuentra conjugada con algún tipo de fluoróforo, permite, en el caso de cultivos celulares, identificar las células que se encuentran en una fase temprana de apoptosis, antes de la fragmentación nuclear. Además, la adición de yoduro de propidio (IP) al medio con las células sin fijar, nos permite identificar aquellas células que van a morir por un proceso de necrosis y que presentan rupturas en su membrana, ya que estas células incorporan el yoduro de propidio, que puede ser detectado por fluorescencia en la región roja del espectro (Ver Esquema 22).



En nuestros cultivos primarios de neuronas empleamos *AnexinaV*, marcada con el fluoróforo FITC, que emite en verde, y yoduro de propidio que emite en rojo.

El protocolo empleado consiste en lavar las células con PBS a 37 °C una vez, e incubar con un tampón específico para favorecer la unión de la *Anexina V* - fosfatidilserina y que contiene Ca<sup>2+</sup>, durante 10 minutos ("Binding Buffer" incluido en el kit comercial, Inmunostep). Posteriormente, se incubaron con el mismo tampón en el que se ha diluido *Anexina V* – FITC (5:100) y yoduro de propidio (5:100), durante 15 minutos con agitación muy suave. Pasado el tiempo de incubación se lavaron con PBS (3 x 10 minutos) con mucho cuidado y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (p/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se volvieron a lavar con PBS (2 x 10 minutos) y se añadió el colorante para teñir núcleos DAPI (1,25 µg/mL) durante 2 minutos, se lavaron con PBS y se montaron utilizando como medio de montaje *SlowFade Gold* ("SlowFade Gold antifading reagent", Invitrogen). Las células se observaron por microscopía de fluorescencia y se tomaron fotos de 10 campos por placa de 35 mm de diámetro con el objetivo de 20x.

Se contó el número de células *Anexina V* positivas (*Anexina V* +), yoduro de propidio positivas (IP+) y dobles positivas, analizándose la relación entre su número y el número total de células contadas por campo, con ayuda del programa de análisis de imagen *Image J* y otros programas para el análisis estadístico.

#### 3.2.4.6. Medida mediante el método de TUNEL de la muerte por apoptosis

La técnica de TUNEL permite la identificación de cuerpos apoptóticos. En general, es un método que indica apoptosis en estadíos tardíos de células que, claramente, van a morir por apoptosis de manera irreversible.

Consiste en marcar los extremos mellados de DNA con desoxiuridintrifosfato nucleótidos (dUTP) biotinilados, mediante la acción enzimática de la desoxinucleotidil transferasa terminal.

La detección de cuerpos apoptóticos en cultivos primarios de neuronas se realizó en células fijadas con paraformaldehido 4 % (p/v) durante 15 minutos. Después, se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4, tres veces durante 10 minutos. A continuación se permeabilizaron con etanol frío (-20 °C), durante 5 minutos. Entonces, se lavaron de nuevo con PBS (3 x 10 minutos) y se procedió a realizar la técnica de TUNEL propiamente, tal y como se decribe en la literatura (Gascon et al. 2005). Las células se sumergieron en el tampón TUNEL (Tris-HCl 30 mM, pH 7,2; cacodilato sódico 0,14 M; CoCl<sub>2</sub> 1 mM y Triton X-100 al 0,3 % (p/v)). Transcurridos los 30 minutos, las células fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con el tampón TUNEL, que contiene 800 U/mL de la enzima transferasa terminal y biotina-16-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato 1  $\mu$ M. La reacción se finalizó con la adición del tampón SCC (cloruro sódico 0,15 M, y citrato sódico 15 mM, pH 7,0). Tras volver a lavar las células con PBS (3 x 10 minutos), se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente, con estreptavidina conjugada con cianina 2 (Cy2), a una concentración 1:500 (Jackson) y se contratiñeron con yoduro de propidio (IP) 1:2000.

Después de volver a lavar con PBS se procedió a montar con medio de montaje "SlowFade Gold".

Además de con células de cultivo primario, también se utilizó este método con rodajas de cultivos organotípicos. En este caso, las secciones fueron post-fijadas con paraformaldehido 4 % (p/v) durante 20 minutos. Después de lavar las secciones con PBS (3 x 10 minutos), se trataron con etanol/ácido acético (2:1) a -20 °C durante 5 minutos. Tras este tratamiento y los posteriores lavados con PBS, las rodajas se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, con Triton X-100 al 0,2 % (p/v), diluido en citrato sódico al 0,1 % (p/v) en agua destilada. La parte posterior del protocolo es similar a la seguida en las muestras del cultivo primario, es decir, incubando con el tampón TUNEL durante 30 minutos y, posteriormente, con la mezcla del tampón TUNEL al que se han añadido la enzima transferasa terminal y los dUTP biotinilados. La finalización de la reacción, también se llevó a cabo con tampón SSC y se reveló con estreptavidina fluorescente, contratiñendo con IP. Las rodajas, debido a su grosor, tras ser extendidas cuidadosamente sobre un porta, se montaron con el medio gelificante Mowiol –véase el apartado 3.2.9.1, correspondiente a inmunofluorescencia-.

#### 3.2.5. RT-PCR

#### 3.2.5.1. Extracción del RNA total de los cultivos

La extracción del RNA total de las células en cultivo, de las rodajas o de los cerebros, se llevó a cabo con Trizol, siguiendo las indicaciones dispuestas por la casa comercial. Posteriormente, se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de Trizol, se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 segundos y, después de una incubación de 3 minutos en reposo, todas las muestras se centrifugaron a 12 000 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 12 000 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 H<sub>2</sub>O-DEPC, agua estéril a la que se había añadido dietil-pirocarbonato (DEPC), un agente para evitar la acción de las RNAsas, y se incubó durante 10 minutos a 55 °C. Por último, se añadieron 0,05 volúmenes del inhibidor de RNAsas por cada volumen resuspendido.

#### 3.2.5.2. Cuantificación del RNA

La calidad del RNA se verificó tras una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v), comprobándose la presencia de las bandas de RNA ribosómico (18S y 28S). 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.

#### 3.2.5.3. Transcripción inversa (Retrotranscripción, RT)

La realización de la transcripción del RNA total a DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando la transcriptasa "SuperScript II", siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total se mezcló con 200 ng de cebadores hexaméricos aleatorios ("random hexamer primers") en un volumen total de 11 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC. La mezcla fue incubada durante 10 minutos a 70 °C y seguidamente enfriada en un 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 transcriptasa "SuperScript II", 1 µL de la mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1 µL del inhibidor de RNAsas.

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 6 °C. Finalizada la reacción, el volumen se completó hasta 50  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O-DEPC.

#### 3.2.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación por PCR del cDNA del gen de interés, se utilizó la polimerasa de DNA *Taq*. La mezcla de reacción estaba formada por 2  $\mu$ L de cDNA molde, 0,4 mM de una pareja de cebadores específicos, 0,2 mM de una mezcla con desoxirribonucleótidos (dNTPs), 1 U de la "Polimerasa DNA Taq", 5  $\mu$ L del tampón de la polimerasa y 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, en un volumen final de 50  $\mu$ L.

El programa de PCR consistió en una etapa de desnaturalización (5 minutos con ciclos de desnaturalización de 45 segundos a 94 °C), una etapa de anillamiento (30 segundos) y extensión (90 segundos a 72 °C) y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El número de ciclos, la temperatura de anillamiento y la secuencia de los cebadores utilizados, depende de cada gen de interés y se especifica en la Tabla 3.2.

TABLA 3.2 Condiciones de la PCR y secuencia de nucleótidos de los cebadores					
Gen diana (ref.)	Nombre	Cebadores	Tamaño amplicón	Temperatura anillamiento	Ciclos
в-actina	b-actin-f	5'-gagcaccctgtgctgctcaccgagg	210 ph	en °c	20
(NM_031144)	b-actin-r	5'-gtggtggtgaagctgtagccacgct	210 hn	00 C	50
fabp5	FABP5-f	5'-cgtctggtggaaagccacggg	255 nh	75 °C	40
(NM_145878)	FABP5-r	5'-ctggaccagggcaccgtctgt	233 pu	73 C	40

#### 3.2.5.5. Electroforesis de DNA

Los productos de PCR fueron analizados mediante una electroforesis de DNA en un gel de agarosa del 1 ò 2 % (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). Los productos de PCR fueron fotografiados con un transiluminador de luz ultravioleta que tiene acoplada una cámara y una video-impresora. Se utilizó como control de referencia la electroforesis simultánea de los productos de cada muestra para el gen de  $\beta$ -actina, como un control de carga.

#### 3.2.6. Transfección con RNAs de interferencia específicos de cadena corta (siRNA)

La inhibición de la expresión de las proteínas de interés, además de usando inhibidores químicos en alguno de los casos, se consiguió transfectando las células con RNAs de interferencia de cadena corta (siRNAs), con secuencias específicas para cada una de las proteínas de interés. En las neuronas se silenció la expresión de las distintas FABPs presentes en el Sistema Nervioso Central, FABP-3, FABP-5 y FABP-7; así como las isoformas de la PKC, alpha y épsilon, mientras que en los cultivos organotípicos se silenciaron exclusivamente las formas de las FABPs.

Los siRNAs, en forma de doble cadena, se resuspendieron en agua libre de nucleasas, a una concentración inicial de 30  $\mu$ M y se utilizaron a una concentración final de 75 nM en el caso de las neuronas, o de 50 nM en el caso de las rodajas organotípicas. Las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina 2000, siguiendo las indicaciones de la casa comercial, utilizándose, en todos los casos, 2,5  $\mu$ L del reactivo de transfección por 1 mL de volumen final.

TABLA 3.3a Secuencia de nucleótidos de los siRNA					
Proteína	Nombre	siRNA (5'>3')	Cadena sentido (5'->3')	Cadena antisentido (5'->3')	
FABP3	Fabp31- [199]	CACAGTACCTTCAAGAACA	CACAGUACCUUCAAGAACAtt	UGUUCUUGAAGGUACUGUGtt	
	Fabp32- [310]	CTGGTCCATGTGCAGAAGT	CUGGUCCAUGUGCAGAAGUtt	ACUUCUGCACAUGGACCAGtt	
	Fabp33- [357]	GGAACTAAGTGATGGGAAA	GAGAACUAAGUGAUGGGAAtt	UUUCCCAUCACUUAGUUCCtt	
FABP5	Fabp51- [291]	GAGACGGTCTGCACCTTCA	GAGACGGUCUGCACCUUCAtt	UGAAGGUGCAGACCGUCUCtt	
	Fabp52- [348]	AAAGAAAGCACGATAACGA	AAAGAAAGCACGATAACGAtt	UCGUUAUCGUGCUUUCUUUtt	
	Fabp53- [394]	TGGAGTGCGTCATGAACAA	UGGAGUGCGUCAUGAACAAtt	UUGUUCAUGACGCACUCCAtt	
FABP7	Fabp71- [324]	GTAAGTCTGTGATTCGGTT	GUAAGUCUGUGAUUCGGUUtt	AACCGAAUCACAGACUUACtt	
	Fabp72- [348]	GAGACAAGCTCATTCATGT	GAGACAAGCUCAUUCAUGUtt	ACAUGAAUGAGCUUGUCUCtt	
	Fabp73- [390]	CAAATTGTGTCAGAGAAAT	CAAAUUGUGUCAGAGAAAUtt	AUUUCUCUGACACAAUUUGtt	

TABLA 3.3b Secuencia de nucleótidos de los siRNA				
Proteí na	Nombre	siRNA (5'>3')	Cadena sentido (5'>3')	Cadena antisentido (5'>3')
GAPDH	Gapdh	GGTCATCCATGACAACTTT	GGUCAUCCAUGACAACUUUtt	AAAGUUGUCAUGGAUGACCtt
ΡΚC-α	PKCalpha	AAACACAAGTTCAAAATCCAC	AACACAAGUUCAAAAUCCACtt	GUGGAUUUUGACUUGUGCUUtt
ΡΚϹ-ε	PKcepsilon	GCCCCTAAAGACAATGAAG	GCCCCUAAAGACAAUGAAGtt	CUUCAUUGUCUUUAGGGGCtt



**MATERIAL Y MÉTODOS** 

En los cultivos primarios de neuronas y en los cultivos organotípicos, las transfecciones con siRNA se realizaron inmediatamente después de la siembra, incubándose, pasadas las 6 horas con albúmina o el complejo albúmina-ácido oleico, hasta cumplirse los tiempos de cada experimento. El medio con el agente de transfección se mantuvo hasta el final del experimento.

En todos los casos se utilizó un control de la transfección, empleándose una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana y designada NT-RNA ("non-target RNA"). Las secuencias de los siRNA (cadena sentido 5'  $\rightarrow$  3') se resumen en la Tablas 3.3.a y 3.3.b. En el análisis de cada una de las FABPs se probaron tres secuencias. En las tablas se resaltan con un color morado cada una de las secuencias que mejores resultados produjeron en el silenciamiento de cada una de las proteínas estudiadas.

Para la optimización de las condiciones de transfección de siRNA se partió del protocolo descrito por Bento-Abreu y colaboradores (Bento-Abreu, A et al. 2007), y las células se transfectaron con distintas concentraciones (concentración final en el medio: 50 ó 75 nM) de un siRNA validado contra GAPDH y variando también las cantidades del agente de transfección (1, 2 ó 3  $\mu$ L Lipofectamina 2000/mL medio de cultivo).

#### 3.2.7. Obtención y preparación de los cortes histológicos

#### 3.2.7.1. Fijación del tejido

Los animales fueron anestesiados con una solución compuesta por ketamina (120  $\mu$ g/g de peso corporal) y xilacina (10  $\mu$ g/g de peso corporal) en solución salina 0,9 %. El efecto de la anestesia se comprobó por la ausencia de reflejo parpebral. Los animales se perfundieron a través de la aorta ascendente, mediante una bomba peristáltica con un flujo de 2-3 mL /min dependiendo de la edad de los animales. Inicialmente se lavó el árbol vascular con solución salina (o PBS) durante 1 minuto, previa inyección intracardíaca de 3 U de heparina sódica. La perfusión se continuó con solución fijadora (paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS) durante 15 minutos.

Posteriormente se procedió a la extracción de los cerebros, que se lavaron en PBS para eliminar el exceso de fijador, y se sumergieron secuencialmente en soluciones crioprotectoras de sacarosa en concentraciones crecientes hasta el 30 % (p/v) en PBS y agitación, a 4 °C, hasta el definitivo hundimiento del cerebro en la solución.

Posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido, encastrados previamente en un compuesto específico para bloquear y rodear al tejido, así como mantener el tejido congelado en óptimas condiciones para su posterior corte (denominado comercialmente OCT, con base de un alcohol polivinílico y *carbowax*), y fueron etiquetados y almacenados a -80 °C hasta su procesamiento posterior.

#### 3.2.7.2. Obtención de los cortes histológicos

Los bloques de cerebro encastrados en OCT se cortaron en un criostato a una temperatura aproximada de -22 °C, en secciones de 40 µm de grosor, en planos coronales. Las secciones fueron recogidas sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

Las secciones se distribuyeron de manera consecutiva en el portaobjetos y fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento o tinción posterior.

## 3.2.8. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western-blot

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

#### 3.2.8.1. Extracción de proteínas de neuronas

Las neuronas se lavaron dos veces, durante 5 minutos con una solución de PBS, y se lisaron con una solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 5 mM (pH 6,8), SDS al 2 % (p/v), EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Cocktail III, Calbiochem) 1:100 (v/v), NaF 1 mM y ortovanadato 0,1 mM. Los lisados se centrifugaron a 14 000 x g durante 15 minutos, a 4 °C y se almacenaron a -80 °C.

#### 3.2.8.2. 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, y cocktail inhibidor de proteasas III 1:100 (v/v). Los lisados se centrifugaron a 14 000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se almacenaron a -80 °C.

#### 3.2.8.3. Extracción de proteínas de las rodajas del cultivo organotípico

Cada rodaja colocada en el inserto fue recogida de forma individual y pasada a un eppendorf y estéril en un volumen de 70  $\mu$ L de una solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 5 mM (pH 6,8), SDS al 2 % (p/v), EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, cocktail inhibidor de proteasas III 1:100 (v/v), NaF 1 mM y ortovanadato 0,1 mM. La

rodaja fue homogenada tratando de evitar la producción de espuma y calentando a 60 °C durante 5 minutos. A continuación, los lisados fueron centrifugados a 15 000 x g durante 15 minutos a 4 °C y, posteriormente, se almacenaron a -80 °C.

#### 3.2.8.4. Cuantificación de proteínas

#### 3.2.8.4.1. Método Bradford

Se siguió el protocolo general del método Bradford (Bradford 1976). Una alícuota de la muestra de proteínas se diluyó mil veces en agua ultrapura. De esa dilución se tomó un volumen de 800 µL y se le añadieron 200 µL del reactivo de Bradford. Se agitó la mezcla en un vórtex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se procedió a medir la absorbancia a 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.

#### 3.2.8.4.2. Análisis en el fluorímetro Qubit con el kit de análisis de proteínas

Este método se basa en la unión selectiva a proteínas, en este caso, de un reactivo fluorescente proporcionado por el kit de determinación, sin que interfieran en la medición ácidos nucleicos o sustancias tales como el DTT o el mercaptoetanol. La cuantificación se realiza en un espectrofluorímetro, modelo Qubit (Invitrogen), el cual ya está adaptado para el reactivo del kit correspondiente a DNA, RNA o proteínas de su misma casa comercial –longitudes de onda utilizadas no indicadas en los manuales de uso-.

El protocolo de uso consiste en la dilución 1:200 del reactivo fluorescente Qubit en el tampón de medida proporcionado por la casa comercial, para preparar la mezcla de trabajo. A continuación, se realiza una curva patrón con estándares de albúmina sérica bovina también proporcionados por la casa comercial, en los que se prepara un volumen final de 200  $\mu$ L diluyendo 10  $\mu$ L de los estándares en 190  $\mu$ L de la mezcla de trabajo en un eppendorf de 0,5 mL adecuado para la longitud de onda empleada en la medición ("assays tubes", Invitrogen). Se agita en un vortex durante un par de segundos, se deja incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mide en el fluorímetro, modelo Qubit, con la opción de análisis para proteínas (Ver esquema adjunto en el Esquema 24).

Las muestras son analizadas de forma similar, diluyendo 1-20  $\mu$ L de muestra en un volumen final de 200  $\mu$ L de mezcla de reacción, agitando y dejando reposar durante 15 minutos.

La cuantificación se realiza, igual que en el caso del método Bradford, por extrapolación de los resultados de las muestras con la curva patrón -de los estándares-.

## Esquema 24.- Esquema del protocolo de preparación de muestras con el método Qubit



#### 3.2.8.4.3. Análisis en un nanofotómetro

Este método se basa en la medida con ayuda de un nanofotómetro (IMPLEN) de absorbancia en la región del ultravioleta (A 260nm) de proteínas purificadas.

El método es de fácil uso al consistir en la medida directa de una gota de 2 µL de muestra en la misma superficie del nanofotómetro y cálculo directo de la cantidad de proteína. Tiene el inconveniente de tener cierta imprecisión, debida a la no completa discriminación de ácidos nucleicos de muestras no purificadas. En ningún caso fue utilizada con muestras de tejido.

#### 3.2.8.5. Preparación de los geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en geles de grosor de 1,5 mm, compuestos por un gel de separación dividido en dos partes (7,5 % de poliacrilamida en la parte superior y 15 % en la parte inferior, a fin de separar las proteínas de 15 kDa) y por un gel de concentración (4 % de poliacrilamida) que se dispone en el último paso de la preparación de los geles, sobre el gel de separación.

El gel de separación estaba compuesto por Tris-HCl 0,375 M(pH 8,8), acrilamida/Bis al 7,5 ò 15 % (p/v), 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).

Asimismo, se utilizaron geles comerciales preparados NuPAGE 4-12 % que solamente requirieron de un lavado previo con agua ultrapura y un equilibrado posterior en el tampón de electroforesis.

#### 3.2.8.6. Preparación de las muestras para la electroforesis

En las electroforesis SDS-PAGE se utilizaron 30 µg de proteínas, resuspendidas en un tampón Laemmbli 4x (Tris-HCl 0,18 M y pH 6,8; glicerol 5 M; SDS 3,7 % (p/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 0,6 M ó DTT 9 mM y azul de bromofenol (BB) 0,04 % (v/v)). La mezcla se hirvió durante 5 minutos y, tras realizar una rápida centrifugación, se mantuvo en hielo a 4 °C.

En el caso de los geles pre-hechos NuPAGE, se prepararon las muestras en un volumen final de 20  $\mu$ L, añadiéndose 5  $\mu$ L de un tampón de carga comercial NuPAGE ("LDS Sample buffer 4x", Invitrogen), 2  $\mu$ L de un agente reductor NuPAGE (DTT 500 mM), y agua y cantidad de proteína suficiente hasta completar el volumen indicado. En este caso las muestras fueron calentadas en los geles hasta 70 °C durante 10 minutos para su desnaturalización, cargándolas inmediatamente después.

#### 3.2.8.7. Electroforesis de las muestras para la electroforesis

En todas las electroforesis *SDS-PAGE* se utilizó un tampón para sumergir los electrodos y los geles, compuesto por 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 comercial (BioRad, con bandas: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 200 kDa).

En el caso de las electroforesis con geles NuPAGE, las condiciones también eran desnaturalizantes, pero se utilizó un tampón de separación recomendado por la propia casa comercial ("NuPAGE MOPS SDS Running Buffer", Invitrogen) con un antioxidante añadido en la mezcla que cubre los pocillos del gel.

Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, a voltaje constante (entre 70 y 110 V, dependiendo de las proteínas a separar y el tipo de gel empleado) y durante el tiempo necesario para lograr una buena separación de las proteínas, según la posición de las bandas del marcador de masa molecular.

#### 3.2.8.8. Electrotransferencia

Las proteínas separadas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro.

La transferencia habitual fue de tipo "húmedo", empleando como tampón de transferencia una solución con la siguiente composición: Tris 25 mM y glicina 0,19 M (pH 8,6), con SDS al 0,1 % (p/v) y metanol al 10 % (v/v). Para la electrotransferencia se aplicó un voltaje de 90 V, durante 120 minutos a 4 °C, de manera que las proteínas se transfiriesen hasta la membrana al verse atraídas por la carga eléctrica positiva de la misma, quedando inmovilizadas en la misma posición que ocupaban en el gel.

La transferencia también se realizó de forma semiseca, haciendo uso de un dispositivo iBlot (Invitrogen), preferentemente en los casos de transferencia de proteínas de medio y bajo peso molecular y con los geles pre-hechos. En este caso el gel con las proteínas era incubado durante 10-15 minutos con un tampón de equilibrado, para optimizar la transferencia de proteínas de medio y alto peso molecular, compuesto por la solución de transferencia NuPAGE, a la que se ha añadido antioxidante 1:1000 NuPAGE y metanol al 10 % (v/v). A continuación, se coloca el gel en contacto con la membrana de nitrocelulosa en el dispositivo iBlot y se transfieren las proteínas durante 12 minutos, en el programa de voltaje fijo a 25 V.

#### 3.2.8.9. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana

La transferencia de las proteínas a la membrana se controló mediante tinción con Rojo Ponceau al 5 % (v/v). A continuación la membrana se lavó con TBS-T (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM y pH 7,5, con Tween 20PS (Panreac) 0,1 % (v/v)), hasta la completa desaparición de la tinción del colorante.

Posteriormente, la membrana se bloqueó, durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche desnatada en polvo al 7 % (p/v) en TBS-T.

#### 3.2.8.10. Inmunodetección

Para detectar las proteínas en la membrana, se incubó ésta con el anticuerpo primario contra la proteína de interés, 1-2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados, cuyas características están recogidas en el apartado de material, se emplearon con las siguientes diluciones: anti-GAP43 (1:500), anti-MAP2 (1:500), anti-GAPDH (1:4000), anti- $\alpha$ -tubulina (1:2000), anti-TUJ-1 (1:1000), anti-FABP3 (1:500), anti-FABP5 (1:1000), anti-FABP7 (1:500), anti-PKC- $\alpha$  (1:40000), anti-PKC- $\epsilon$  (1:2000).

Los anticuerpos primarios se prepararon generalmente 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 policional de conejo anti-PKC- $\varepsilon$ , preparado en leche 5 % en TBS-T.

A continuación y tras una serie de lavados con TBS-T, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón (1:5000) o conejo (1:10000), conjugados con peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se utilizaron en solución TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM y pH 7,5). En este momento se forma un complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario conjugado.

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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el Luminol excitado decae a su estado fundamental, emitiendo radiación luminiscente. La luz emitida es detectada por exposición a una película de autorradiografía, siendo la señal producida por la luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, en condiciones de exposición por debajo de la saturación. El revelado de las bandas detectadas por la película se realizó manualmente, con líquidos de revelado fotográfico detallados en el apartados de material y productos.

Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía, mediante su escaneado en un escáner de doble haz y un programa informático de análisis de imagen.

#### 3.2.9. Inmunofluorescencia

La localización celular de determinadas proteínas en los cultivos primarios, así como la identificación de células positivas para el marcaje con el anticuerpo para esas proteínas en determinadas regiones histológicas, se realizó por inmunomarcaje.

Tanto en el caso de los cultivos primarios como, especialmente, en las muestras de tejido cultivado o secciones coronales de cerebro, se realizaron determinados controles para minimizar o reducir las inespecificidades de la señal obtenida. Los controles de la técnica

realizados en todos los casos fueron: (i) La omisión del anticuerpo primario en la primera incubación, para detectar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario al tejido; (ii) la eliminación del anticuerpo secundario fluorescente para detectar posible autofluorescencia del tejido.

#### 3.2.9.1. Preparación del medio gelificante y preservador de la fluorescencia, Mowiol

Primero se prepara el medio gelificante, para lo cual se disolvieron 2,4 g de Mowiol 4-88 en 6 g de glicerol con agua destilada, durante 12 horas a temperatura ambiente. A la mezcla ya disuelta se añade tampón Tris-HCl 0,2 M y pH 6,8 y se calienta 10 minutos a 50 °C, agitando hasta disolver el Mowiol. Después se centrifuga 15 minutos a 5000 rpm y se congelan alicuotas a -20 °C.

Previamente a su uso, se añadió el preservador de la fluorescencia n-propilgalato al 10 % (p/v), para evitar su oxidación, y se centrifugó 4 minutos a 4000 rpm.

#### 3.2.9.2. Inmunocitoquímica

En los casos en los que se quiso analizar la actividad mitocondrial de las células, éstas fueron incubadas, previamente a la fijación, con un colorante fluorescente específico "MitoTracker" (Invitrogen) 3  $\mu$ M, durante 30 minutos a 37 °C.

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM y pH 7,4), neutralizando ligeramente con NaOH 5 M, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Entonces se permeabilizaron con metanol a -20 °C, durante 10 minutos. A continuación, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche (16 horas) a 4 °C. Los anticuerpos primarios empleados, cuyas especificaciones se recogen en la tabla del apartado de Material, se utilizaron a las siguientes diluciones: anti-GAP43 (1:500), anti-FABP7 (1:500), anti-FABP3 (1:500), anti-FABP5 (1:500), anti-FABP7 (1:1000), anti-PKC- $\alpha$  (1:10000), anti-PKC- $\alpha$  (1:2000).

Los anticuerpos primarios se prepararon, generalmente, 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, a la que se añadió Triton X-100 al 0,1 %.

Después se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, durante 1 hora y 30 minutos, a temperatura ambiente en oscuridad y sin agitación, colocando las placas sobre una superficie lisa. Los anticuerpos secundarios procedían de suero de cabra y se describen a continuación: anticuerpo secundario conjugado con cianina 3 (Cy3) contra inmunoglobulina de conejo; anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 488, o AlexaFluor 594 o AlexaFluor 647, contra inmunoglobulina de ratón; anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 594 contra inmunoglobulina de conejo.

Finalmente, el DNA nuclear se tiñó con 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 2,5  $\mu$ g/mL, un colorante fluorescente que se une fuertemente con el DNA y emite en la región del UV, durante 2 minutos a temperatura ambiente. Entre paso y paso, se hicieron tres lavados con PBS, de 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente.

Las preparaciones se montaron utilizando un agente preservador de la fluorescencia, denominado "SlowFade Gold" (Invitrogen).

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio de fluorescencia invertido, conectado con una videocámara digital, o con un microscopio confocal, obteniéndose imágenes de fluorescencia o con confocalidad en el plano.

#### 3.2.9.3. Inmunohistoquimica

En este caso, las rodajas del cultivo organotípico fueron fijadas con paraformaldehído, preparado justo antes de fijar el tejido, al 4 % (p/v) en PBS durante un periodo de 20 minutos a temperatura ambiente.

En el caso de los cortes coronales se permeabilizaron con una solución de PBS y Triton X-100 al 2 % (v/v), durante 30 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con una solución de PBS y albúmina sérica bovina al 3 % (v/v).

A continuación, tanto el tejido en cultivo, como los cortes coronales de cerebro, se incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C, durante 12 horas.

En este caso, los anticuerpos primarios utilizados, cuyas especificaciones técnicas están recogidas en la tabla anteriormente mencionada del apartado de materiales, fueron los siguientes: anti-GAP43 (1:500); anti-MAP2 (1:500); anti-GFAP (1:400); anti-FABP3 (1:500), anti-FABP5 (1:500), anti-FABP7 (1:1000).

La preparación de los anticuerpos primarios para las muestras de tejidos en cultivo se realizó en PBS, con suero de cabra al 1 % (v/v) y Triton X-100 al 1% (v/v), mientras que los anticuerpos primarios para la tinción de los cortes coronales se diluyeron en una solución de PBS con albúmina sérica bovina al 3 % (v/v).

Posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario, conjugado con un fluorocromo, durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y sin agitación, colocando las placas sobre una superficie lisa. Los anticuerpos secundarios procedían de suero de cabra y se describen a continuación: anticuerpo secundario conjugado con cianina 3 (Cy3) contra inmunoglobulina de conejo; anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 488, o AlexaFluor 594 o AlexaFluor 647, contra inmunoglobulina de ratón; anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 488 o AlexaFluor 594 contra inmunoglobulina de conejo.

Cuando se quiso tener un marcaje del núcleo se utilizó DAPI (2  $\mu$ g/mL), o bien el colorante nuclear "TO-PRO 3 lodide" (1  $\mu$ M en PBS) que, en lugar de observarse en la región del UV, se detecta en la región de 647 nm.

Entre los pasos de incubación con los anticuerpos o colorantes se hicieron tres lavados con PBS, de 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente.

Las preparaciones se montaron con el agente gelificante y preservador de la fluorescencia Mowiol.

#### 3.2.10. Análisis de la colocalización inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

Para el análisis de la colocalización en las tinciones simultáneas de dos, o más, antisueros, se emplearon dos programas de análisis informático. En primer lugar se hizo uso de una herramienta desarrollada por los doctores, Dr. J.C. Arévalo Martín y Dr. E.A. López Poveda, en el soporte informático MatLAB (MathWorks, 2008) y cedida para su uso. Esta aplicación establece las áreas de localización de cada uno de los dos antisueros comparados y su intensidad por zonas con una graduación por colores, así como la imagen suma de los dos canales en estudio. En segundo lugar, y para definir con mayor precisión los puntos de colocalización, se empleó el programa Image J (Bethesda, 2008). Este programa tiene a su vez una herramienta que establece un gráfico bidimensional con cada canal de fluorescencia en un eje, para la determinación del umbral de colocalización, y después muestra los puntos de colocalización entre las dos variables, o antisueros comparados, según el umbral fijado en la gráfica anterior.

#### **3.2.11.** Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de, como mínimo, tres experimentos independientes (n  $\ge$  3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student, cuando se comparaban dos variables entre sí (\* p < 0,5; \*\* p <0,05; \*\*\* p < 0,01), o mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de test de Tukey, cuando se comparaban más de dos variables. En este caso, los valores se consideraron significativos cuando p < 0,05. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS PLAN DE TRABAJO INTRODUCCIÓN

RESULTADOS

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

### > 4.- RESULTADOS

85

INTRODUCCIÓN	
PLAN DE TRABAJO	
MATERIAL Y MÉTODOS	
RESULTADOS	
Disci	
JSIÓN	
### 4. Resultados

## 4.1. Expresión de las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) en neuronas y astrocitos en cultivo primario

Dado que el objetivo inicial que planteamos en el plan de trabajo era el estudio de la posible participación de las proteínas de unión y transporte de lípidos (FABPs), en la vía de señalización del complejo albúmina + ácido oleico, comenzamos por la determinación de la expresión y localización de las tres FABPs presentes en el Sistema Nervioso Central en neuronas y astrocitos en cultivo primario en nuestras condiciones experimentales. Tal y como se ha comentado en la introducción, las tres proteínas FABP3, FABP5 y FABP7, se hallan presentes durante el período perinatal del cerebro, no obstante, aunque su expresión está regulada durante el desarrollo y depende del tipo y nicho celular. La bibliografía referida a estas proteínas muestra el uso de antisueros no comerciales para la determinación de la localización de estas proteínas y, por consiguiente, nuestro objetivo fue determinar la bondad de los antisueros comerciales para la discriminación de las tres proteínas en los cultivos primarios.

### 4.1.1. Localización de las FABPs en neuronas y astrocitos en cultivo primario mediante técnicas inmunocitoquímicas

En primer lugar se determinó la localización de las FABPs en astrocitos en cultivo primario. Para ello, se emplearon fetos a término extraídos por histerectomía (PO), sembrándo las células a baja densidad (100 células/mm<sup>2</sup>). Los astrocitos se mantuvieron al menos 21 días en cultivo en un medio DMEM suplementado con suero bovino al 10 % (v/v).

Las células se fijaron con paraformaldehido y se bloquearon, previamente a su tinción inmunocitoquímica con los anticuerpos específicos para cada una de las FABPs (véase Fig. 1. B, E y H, respectivamente). Seguidamente, se realizó una doble tinción inmunocitoquímica con el marcador glial de astrocitos, GAFP (véase Fig. 1. A, D y F).

Nuestros resultados muestran que, tal y como se aprecia en la Fig.1. B, la FABP3, no está presente en los astrocitos en nuestras condiciones de cultivo. La FABP5 se expresa en astrocitos maduros, y lo hace con una intensidad débil, extendiéndose por todo el citoplasma, como recoge la Fig. 1. E. La FABP7, sin embargo, es propia de las células gliales y, por consiguiente, presenta un marcaje intenso en los astrocitos (Fig. 1. H), pero no en todas las células, pudiéndose distinguir células GFAP+/FABP7+ y células GFAP+/FABP7- y también, GFAP-/FABP7+ (tal y como puede verse en la fusión con GFAP, en la Fig. 1. I), prueba de la gran heterogeneidad celular presente en estos cultivos. El marcaje de la FABP7, aún siendo siempre citosólico, parece concentrarse en determinadas regiones celulares cercanas al núcleo y los comienzos de las proyecciones o prolongaciones de sus pies, como se indica con flechas en las Fig. 1. H e I.

Una vez determinada la presencia de las FABPs en astrocitos en cultivo, se estudió la localización de dichas proteínas en neuronas en cultivo primario bajo nuestras condiciones de diferenciación. Estas neuronas se obtuvieron de los hemisferios cerebrales de fetos de rata Wistar (E17,5), se mantuvieron en cultivo en un medio mínimo suplementado con insulina, apotransferrina, L-glutamina y piruvato, tal y como está descrito con más detalle en el apartado de Material y Métodos.

Para determinar inmunocitoquímicamente la presencia de las FABPs se fijaron las células después de 3 días *in vitro* (DIV), con paraformaldehído, se bloquearon, y se tiñeron con anticuerpos específicos para cada una de las FABPs (véase la Fig. 2. B, E y H, respectivamente), realizándose un doble marcaje inmunocitoquímico frente a un marcador neuronal temprano como es TUJ-1 ( $\beta$ -III tubulina) (véase la Fig. 2. A, D y G). La fusión de ambos marcadores se recoge en la Fig. 2. C, F e I.

La FABP3, como se muestra en la Fig. 2. B, marcó las neuronas de forma intensa, extendiéndose en el cuerpo celular y las neuritas de todas las neuronas. La FABP5 (Fig. 2. E), también mostró un marcaje por todo el citoplasma celular, bastante intenso y difuso. La FABP7 (Fig. 2. H), por el contrario, mostró marcaje en el cuerpo celular, restringido a la región próxima al núcleo, como se aprecia en la comparativa con TUJ1 que se recoge en la Fig. 2. I. Dado que FABP7 es un marcador de glía radial, relacionado con los progenitores neuronales, se puede sugerir que las células en nuestras condiciones de cultivo, todavía expresan marcadores propios de progenitores.

Además -tal y como se indica con flechas en la Fig. 2. B, C, E, y F-, en el caso de la FABP3 y la FABP5 la localización de estas proteínas en la base de crecimiento de las neuritas se corresponde con una zona de gran actividad y consumo energético. Sin embargo, en lo que respecta a la FABP7, se observa como el marcaje no corresponde con las zonas antes mencionadas, de la base de las neuritas, sino que ésta se acumulada en torno al núcleo y no vinculada a las proyecciones neuríticas (véase flechas en la Fig.2. H e I).

Se aprecia también, en el caso de las FABP3 y FABP5 un marcaje próximo a la membrana celular (Fig. 2. B y F).

### 4.1.2. Determinación de la expresión de las FABPs mediante transferencia tipo Western-blot en neuronas en cultivo primario

Una vez analizada la localización de las FABPs en neuronas y astrocitos en cultivo, analizamos los niveles de expresión de estas proteínas en las diferentes condiciones de cultivo de neuronas mediante Wester-Blot. Además se analizó de forma paralela la expresión de los marcadores moleculares de diferenciación dendrítica y axonal, MAP2 y GAP43, respectivamente, de tal forma que pudiese compararse temporalmente el efecto neurotrófico del ácido oleico con cambios en la expresión temporal de las FABPs.

Para ello se cultivaron las células tal y como se describió en el apartado correspondiente del Material y Métodos. Al medio definido (condición Control) se añadió albúmina bovina al 2 % (p/v) (+BSA), o el complejo formado por albúmina bovina al 2 % + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico). Las proteínas se extrajeron a diferentes tiempos de cultivo. Los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación axonal (GAP43) y dendrítica (MAP2) se analizaron mediante Western blot (véase Fig. 3. A), y de forma simultánea con se hizo lo propio con las tres FABPs (véase Fig. 4. A, C y E). En todos los casos, de ambas figuras, los niveles de cada proteína se refirieron a los de la proteína GAPDH, utilizada como control de carga. La cuantificación de los resultados obtenidos por la técnica de Western-blot, se recogen, en el caso de los marcadores de diferenciación, MAP2 y GAP43, en la Fig. 3. B y C, respectivamente; y el caso de cada una de las FABPs en la Fig. 4. B, D y F, respectivamente. Se tomó como referencia en cada caso el valor en la condición control después de 1 hora de cultivo.

Nuestros resultados muestran que la MAP2 aumenta de forma significativa sólo en presencia del complejo albúmina + oleico, a partir de las 48 horas de cultivo (Fig. 3. B), mientras que GAP43 lo hace a partir de las 72 horas.

En el caso de las FABPs, los niveles de la FABP3 (Fig. 4. B), aumentan con el tiempo de cultivo, distinguiéndose un aumento más acusado en presencia del complejo albúmina + oleico, que sigue en el tiempo al incremento registrado por GAP43. Por su parte, la FABP5 muestra unos niveles altos en todo el rango temporal y, en presencia del ácido oleico, los niveles aumentan ligera, pero significativamente, transcurridas 72 horas (Fig. 4. D). La FABP7, muestra un perfil inverso a las otras dos FABPs, pues disminuye a medida que progresa el tiempo de cultivo, siendo más rápida su desaparición en presencia del complejo albúmina + oleico (Fig. 4. F).

### 4.2. Efecto del silenciamiento de las FABPs sobre el efecto neurotrófico promovido por complejo albúmina + ácido oleico en neuronas en cultivo

Con objeto de determinar la participación de las FABPs en el efecto neurotrófico promovido por el complejo albúmina + ácido oleico se realizaron experimentos de pérdida de función, mediante el silenciamiento de la expresión de las FABPs en las neuronas en cultivo.

## 4.2.1. Optimización de las condiciones de transfección de los siRNA en neuronas en cultivo primario

Para silenciar la expresión de las FABPs, en primer lugar, se puso a punto el método de trasfección con tecnología de siRNA en neuronas en cultivo primario. Se empleó una secuencia validada de siRNA para la proteína GAPDH, y se transfectaron las neuronas con distintas cantidades de siRNA (50 y 75 nM), y distintas cantidades del agente de

transfección (1, 2 ò 3 µL de *Lipofectamina 2000* por cada mililitro de medio de cultivo) comparándolas con muestras sin transfectar (Control).

Los resultados muestran la existencia de una fuerte reducción de los niveles de GAPDH cuando se transfecta con 75 nM de siRNA y  $3\mu$ L de *lipofectamina* por cada 2000  $\mu$ L de medio de cultivo (Fig. 5).

Estas condiciones se utilizaron en los experimentos posteriores de silenciamiento con siRNA en neuronas en cultivo, probándose tres secuencias de siRNA diferentes para cada proteína en estudio. En todos los casos se empleó como control de la transfección un siRNA validado sin diana (NT-siRNA), cuya presencia no afecta a los valores de expresión normal de las proteínas en estudio, ni al control de carga, tal y como se ha descrito previamente (Bento-Abreu, 2010).

### 4.2.2. Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre la morfología neuronal

### 4.2.2.1. Efecto del silenciamiento de FABP5 en la morfología neuronal

Una vez puesto a punto el método de silenciamiento, se comenzaron los estudios de silenciamiento por el silenciamiento de la FABP5, analizando los niveles de mRNA de FABP5 con respecto al tiempo, en las diferentes condiciones de cultivo.

Para ello, las neuronas se transfectaron con NT-siRNA ó FABP5-siRNA, y fueron cultivadas en un medio definido (Control) suplementado o no, con albúmina bovina al 2 % (+BSA) o el complejo albúmina al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Se extrajo el RNA total de las neuronas a las 24 horas y a las 48 horas de cultivo y se realizó una RT-PCR con oligos específicos para el mRNA de FABP5. Como control, se realizó en paralelo el análisis simultáneo para la  $\beta$ -actina, y se cuantificaron directamente las imágenes de la señal obtenida en los geles de agarosa en los que se corrieron las muestras.

A las 24 horas, tal y como se observa en la Fig.6, los niveles de mRNA de FABP5 sugieren que no se ha producido el silenciamiento de esta proteína. Sin embargo, a las 48 horas (Fig.7), los niveles de FABP5-mRNA están considerablemente reducidos en presencia de FABP5-siRNA.

Por otra parte, se aprecia en presencia del complejo albúmina + ácido oleico un nivel de expresión superior del FABP5-mRNA, que es apreciable desde las 24 horas y se mantiene a las 48 horas (Fig. 6 y 7).

Una vez determinado el silenciamiento de FABP5 en las diferentes condiciones experimentales, se analizó el efecto de este silenciamiento sobre la morfología neuronal.

En este sentido se emplearon neuronas transfectadas con NT-siRNA ó FABP5-siRNA y mantenidas en cultivo durante 72 horas, un tiempo al cual los resultados previos indicaban que FABP5 se encontraba silenciada. Las neuronas se cultivaron en un medio definido (Control), suplementado o no, con albúmina bovina al 2 % (+BSA), o el complejo de albúmina al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico).

En las neuronas, en la condición NT-siRNA en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 8. E), se observa un aumento del número y el grosor de las ramificaciones de

las neuronas en comparación con las condiciones control y con albúmina (Fig. 8. A y C). Así mismo, se produce la agregación celular, característica del efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas en cultivo. Sin embargo, en todas las condiciones en las que se silenció la FABP5 (FABP5-siRNA, Fig. 8. B, D y F), el número de células por campo es menor, y además las ramificaciones de las mismas son limitadas. En las fotomicrografías no se aprecia la diferenciación neuronal en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (comparativa entre los Apartados E y F de la Fig. 8), sino que su morfología está bastante afectada y se aprecian muchas células muertas.

### 4.2.2.2. Efecto del silenciamiento de FABP5 en la viabilidad neuronal

A la vista de los cambios observados en la morfología neuronal, y de la presencia de un número considerable de células muertas decidimos estudiar el efecto del silenciamiento de FABP5 en la viabilidad neuronal por el método de MTT.

Para ello, se sembraron el mismo número de células por condición, se transfectaron con NT-siRNA ó FABP5-siRNA, y se incubaron en medios definidos (Control), suplementados o no, con albúmina bovina al 2 % (p/v) (+BSA) o el complejo albúmina al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Las células se analizaron a las 72 horas de incubación por el método de MTT, tal y como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

Nuestros resultados muestran una reducción en la viabilidad neuronal causado por el silenciamiento de la FABP5, tal y como se recoge en la Fig. 9. A. Así, en ausencia de silenciamiento (condiciones NT-siRNA), el complejo albúmina + ácido oleico aumenta los valores de MTT en un 80 %, respecto a las condiciones, control o con albúmina (+BSA). Sin embargo, al silenciarse FABP5, los valores de MTT en presencia del complejo albúmina + oleico, caen en más de un 50 % (tal y como muestra la Fig. 9. A).

Este hecho nos indujo a examinar la evolución de la viabilidad neuronal con el tiempo, repitiendo los ensayos de MTT a distintos tiempos pero en las mismas condiciones de cultivo que en los experimentos anteriores. Los resultados se recogen en la gráfica de la Fig. 9. B. En las tres condiciones se observa una disminución de alrededor del 60 % en los valores de absorbancia de MTT a las 96 horas de cultivo respecto de los valores registrados a las 24 horas de cultivo. El silenciamiento de la FABP5 produjo una disminución en la viabilidad de tan solo del 20 %, aproximadamente, en las primeras 48 horas de cultivo en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, aunque la disminución fue del 50 % en las 24 horas siguientes.

A la vista del aumento que habíamos observado en los valores de absorbancia de MTT a las 72 horas, en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, en las condiciones NT-siRNA de la Fig. 9. A, decidimos analizar el efecto del complejo albúmina + ácido oleico en los valores de absorbancia de MTT con el tiempo.

En este caso, las células sin transfectar, se incubaron con los diferentes tratamientos y se analizaron a los distintos tiempos (véase Fig. 10. A).

Los resultados muestran que la albúmina (condición +BSA), no modifica significativamente, respecto a la condición control, los valores registrados por el MTT durante las primeras 72 horas de cultivo. Sin embargo, llama la atención el aumento en la absorbancia registrada por MTT en las neuronas en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (+BSA +Oleico). De hecho, este efecto ya es observable a las 48 horas, estando cercano a un incremento del 60 %, llegando al 80 % a las 72 horas y siendo casi dos veces y media superiores (incremento del 140 % en términos de absorbancia relativa) respecto a la condición control, a las 96 horas.

Dado que el método del MTT está basado en la medida de la actividad mitocondrial, pensamos que las diferencias provocadas por el ácido oleico podrían estar inducidas por el aumento en la actividad mitocondrial durante la diferenciación neuronal. En efecto, la Fig. 10, en su Apartado B, muestra la tinción de actividad mitocondrial, con ayuda de un colorante, conocido como Mitotracker. A las 72 horas de cultivo en las tres condiciones en estudio se aprecia un aumento en la cantidad e intensidad de señal en la condición en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, lo que sugiere que el ácido oleico aumenta la absorbancia de MTT por inducción de la diferenciación mitocondrial.

### 4.2.2.3. Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre la apoptosis y necrosis neuronal

Quisimos estudiar la muerte neuronal inducida por el silenciamiento de FABP5 en nuestras condiciones experimentales. Para ello, decidimos emplear dos métodos: la tinción con Anexina V/IP, y el método de TUNEL.

El método de tinción de Anexina V/IP, tal y como está descrito en el apartado de Material y Métodos, permite discriminar la muerte por apoptosis o por necrosis: al incubarse la célula viva, con Anexina V y yoduro de propidio (IP), si la célula está muriendo por necrosis el IP puede penetrar en la célula, que no está fijada, por los poros que se han ido formando en la desintegración de su membrana. Sin embargo, no lo hará en aquellas que estén vivas o en las que su muerte se produzca por apoptosis. En estas últimas, sin embargo, la externalización de la fosfatidilserina de la membrana permitirá la unión de Anexina V conjugada con un fluorocromo fluorescente.

Se emplearon neuronas transfectadas con NT-siRNA ó FABP5-siRNA, incubadas en los tres medios habituales (Control, +BSA, +BSA +Oleico), durante 36h. A continuación, se incubaron con Anexina V – FITC, y IP durante 15 minutos. Finalmente se fijaron con paraformaldehido y se tiñeron los núcleos con DAPI.

Los resultados obtenidos se recogen en las Fig. 11 y 12. El número de células muertas por necrosis durante la transfección fue muy bajo en todos los casos, nunca superior al 5 %; mientras que el porcentaje de células apoptóticas (Anexina V+) era superior al 30 %, independientemente del medio de cultivo empleado.

Una vez determinado el efecto apoptótico del silenciamiento de FABP5 en las neuronas en cultivo primario, nos servimos de la técnica TUNEL para corroborar la muerte por apoptosis.

En este caso, las células fueron fijadas después de 48h y entonces se realizó la tinción inmunocitoquímica correspondiente a la técnica TUNEL, empleándose yoduro de propidio (IP) para teñir los núcleos celulares de manera similar a como se había realizado con el DAPI en el caso de la AnexinaV.

Las imágenes, así como la cuantificación de los resultados obtenidos, se recogen en las Fig.13 y 14, respectivamente. Tal y como ocurría en el caso de la Anexina V, el número de células TUNEL+ en todas las condiciones NT-siRNA fue mínimo, inferior al 20 %, mientras que fue superior al 50 %, en todas aquellas en las que se silenció FABP5 (FABP5-siRNA), independientemente de que el medio llevase albúmina (+BSA), o el complejo albúmina + ácido oleico (+BSA +Oleico).

### 4.2.2.4. Efecto del silenciamiento de la FABP5 sobre la diferenciación neuronal

Los cambios en la morfología neuronal, sugieren que el silenciamiento de la FABP5 además de inducir la muerte neuronal, las neuronas que sobreviven apenas se diferencian. El complejo albúmina + ácido oleico, como se comentó en la introducción, promueve un efecto neurotrófico caracterizado por el incremento de los niveles de expresión de los marcadores moleculares de diferenciación dendrítica y axonal, MAP2 y GAP43, respectivamente, así como cambios en la morfología celular. Por ello decidimos analizar el efecto del complejo albúmina + ácido oleico sobre GAP43 y MAP2, tras el silenciamiento de la FABP5.

Las neuronas transfectadas con NT-siRNA o FABP5-siRNA se mantuvieron durante 72 horas en un medio definido (Control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA) o el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Se extraían las proteínas a las 72 horas y se analizaron por Western-blot: FABP5; MAP2 y GAP43, los marcadores de diferenciación; TUJ1, marcador neuronal; y GAPDH, control de carga. Los resultados se recogen en la Fig. 15.

Así, se observa un aumento promovido por el complejo albúmina + ácido oleico, del 50 % y del 60 % en los niveles de expresión de MAP2 y GAP43, respectivamente, cuando se transfectaron las neuronas con NT-siRNA (véase las condiciones correspondientes de los apartados C y D de la Fig.15). El silenciamiento de la FABP5 fue del 60 % (véase FABP5-siRNA, en la Fig. 15. B), y dicho silenciamiento disminuyó considerablemente los niveles de MAP2 y GAP43. En el caso de MAP2, sus niveles disminuyeron en un 50 % (Fig. 15. C); y los valores de GAP43 se mantuvieron en torno al 30 %, preferentemente en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (+BSA +Oleico) (Fig.15. D).

Sin embargo, en las condiciones NT-siRNA, la expresión de TUJ1 no se ve modificada por la presencia de la albúmina, o del complejo albúmina + ácido oleico, y permanece constante al silenciar FABP5 (FABP5-siRNA), tal y como se puede comprobar en la Fig. 15. E.

### 4.2.3. Efecto del silenciamiento de FABP3 en la morfología y diferenciación neuronal

Tras los resultados obtenidos para la FABP5, se decidió continuar el trabajo con el estudio del efecto del silenciamiento de la FABP3.

Inicialmente se estudió la morfología de neuronas transfectadas con NT-siRNA ó FABP3siRNA e incubadas durante 72 horas en un medio definido (Control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA) o el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50 μM.

Los resultados muestran que las neuronas en las condiciones en las que se ha silenciado FABP3 (FABP3-siRNA) (véase Fig. 16), presentan un aspecto indiferenciado, con escasas proyecciones dendríticas. En estas condiciones no se observa el efecto del complejo albúmina + ácido oleico sobre la morfología y agregación neuronal. Tampoco se aprecia muerte neuronal como en el caso del silenciamiento de la FABP5.

A continuación, se analizó por Western-blot, el efecto causado por la presencia del complejo albúmina + ácido oleico, en los niveles de expresión de los marcadores moleculares GAP43 y MAP2 cuando se silencia la FABP3.

De forma similar al estudio de la morfología, las neuronas se transfectaron e incubaron en las distintas condiciones durante 72 horas y se extrajeron las proteínas que fueron analizados por la técnica de Western-blot.

Los resultados indican que cuando el silenciamiento de FABP3 es cercano al 50 % (véase el apartado B de la Fig. 17), la expresión de MAP2 se reduce un 50 % en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 17. C). En el caso de GAP43, su expresión disminuye en algo menos del 30% en las condiciones control y con albúmina, y en casi un 50 % en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 17. D).

## 4.2.4. Efecto del silenciamiento de FABP7 sobre la morfología y la diferenciación neuronal

Siguiendo con los experimentos de pérdida de función, se silenció la última de las tres FABPs en estudio, la FABP7. Nuestra intención era analizar si la FABP7, presente en los progenitores neurales, podía mediar en la acción neurotrófica del ácido oleico.

Para ello, se repitieron las condiciones experimentales, empleadas para las otras dos FABPs, transfectando las neuronas con NT-siRNA ó, en este caso, FABP7-siRNA, y se incubaron durante 72 horas en las tres condiciones habituales: Control, +BSA, y +BSA +Oleico.

Tras el silenciamiento de la FABP7, las neuronas no consiguen diferenciarse, mostrando una, o a lo sumo dos, proyecciones dendríticas (Fig. 18). Además, en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, no se observa el aumento en el número de dendritas o presencia de agregación. No obstante, la única proyección mostrada por estas células es más gruesa que en las otras condiciones silenciadas ensayadas.

En el caso de la diferenciación neuronal, se analizaron por Western-blot los niveles de los marcadores de diferenciación, MAP2 y GAP43, tras el silenciamiento de la FABP7.

La cuantificación de los resultados muestra, la presencia de un silenciamiento elevado, superior al 40 % en la condición control, y significativamente mayor en presencia de albúmina (Fig. 19. B). En esta situación, cuando FABP7 estaba silenciada, la MAP2 se redujo en más de un 60 % en presencia de albúmina, y no se observa efecto del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 19. C). Por su parte, GAP43 disminuye en un 50 % aproximadamente, no mostrando diferencias entre la condición con el complejo albúmina + ácido oleico y el resto de condiciones (Fig. 19. D).

### 4.3. Interacción de la albúmina con la FABP5 en neuronas en cultivo primario

Dado que el ácido oleico ejerce su efecto neurotrófico sólo cuando es transportado por la albúmina (Polo-Hernandez et al. 2010), se decidió investigar si existía alguna interacción entre las FABPs y la albúmina que pudiese indicar un intercambio de ácido oleico entre estos transportadores.

Se eligió la FABP5, de entre las tres FABPs, por estar presente en las neuronas inmaduras desde el momento en el que el ácido oleico ejerce su efecto y por estar localizada próxima a la membrana celular (véase Fig. 4. C).

Las neuronas se sembraron en un medio definido (control negativo) y se añadió albúmina al 2 % (p/v) (+BSA), o el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M y se estudió la colocalización de la albúmina con FABP5 mediante inmunocitoquímica. La doble tinción inmunocitoquímica realizada siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos fue estudiada mediante microscopía confocal.

Los resultados mostraron una importante colocalización de ambas proteínas en zonas del citoplasma (Fig. 20. F), y que es muy intensa en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (+BSA +Oleico; Fig. 20. I).

## 4.4.Estudio de la posible interacción de FABP7 y PPARα en neuronas en cultivo primario

En trabajos previos de nuestro grupo, se ha descrito la participación del receptor activador de proliferación de peroxisomas, PPARα, en la cascada de señalización inducida por el complejo albúmina + ácido oleico (Bento-Abreu et al. 2007). El PPARα tiene como ligando al ácido oleico, y puedeinteraccionar con las FABPs (Adida and Spener 2006). Por ello, decidimos investigar la posible interacción entre el PPARα y las FABPs. Elegimos la FABP7, la proteína marcadora de progenitores, para tratar de relacionar la interacción con el cambio de fenotipo de la célula neuronal.

Con este fin, se incubaron las neuronas en un medio definido (Control) y se añadió albúmina al 2 % (+BSA), o el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Al cabo de 15 minutos, las células se fijaron con paraformaldehído y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica para FABP7 y PPAR $\alpha$ .

Los resultados muestran la existencia de colocalización de la FABP7 con el PPAR $\alpha$ , en todas las condiciones, aunque notable en presencia de albúmina (Fig. 21. C, F e I).

### 4.5. Estudio de la localización de la FABP3 y GAP43 en neuronas en cultivo primario

Debido a que la FABP3 se localiza en las neuritas (Fig. 2. B) decidimos investigar su posible relación con el marcador de diferenciación axonal, GAP43, con el que comparte una similitud en cuanto al tiempo, en el aumento de sus niveles de expresión en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 3. B y Fig. 4. B). Para ello decidimos estudiar la localización de ambas proteínas mediante una tinción inmunocitoquímica para FABP3 y GAP43.

La localización de la FABP3 es muy intensa en la base de las neuritas, donde comienza la extensión de los microtúbulos y donde se produce una incorporación de ácidos grasos a la membrana celular, una zona con una elevada demanda energética. Este hecho nos hizo plantearnos la posible relación de esta proteína transportadora de ácidos grasos, FABP3, con la localización de las mitocondrias activas. Para ello decididmos estudiar también la relación de FABP3 con un marcador mitocondrial, Mitotracker, mediante tinción inmunocitoquímica. Así, y dado que la técnica nos lo permitía, decidimos analizar de forma simultánea la localización de FABP3, GAP43 y Mitotracker mediante una triple tinción inmunocitoquímica.

Las neuronas se cultivaron en un medio definido (control) suplementado o no con albúmina al 2 % (p/v) o con el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico) durante 72 horas. A continuación, se incubaron durante 15 minutos con el colorante Mitotracker y, a continuación, se fijaron con paraformaldehído. Se realizó una tinción inmunocitoquímica frente a FABP3 y el marcador nuclear, DAPI, o una triple tinción FABP3, GAP43 y DAPI, además del colorante Mitotracker, añadido antes de la fijación.

En presencia únicamente de albúmina, GAP43 muestra una distribución concentrada en algunos axones (Fig. 22. A, y con más detalle E), mientras que la FABP3 se distribuye por todas las neuritas de todas las neuronas (Fig. 22. B, y con más detalle F). La distribución de Mitotracker muestra una acumulación en la región próxima al núcleo y el comienzo de la base de las neuritas, además de zonas a lo largo de las neuritas (Fig. 22. C, y con más detalle G). Se aprecia una colocalización discreta de FABP3 y GAP43 en el axón de algunas neuronas (puntos en amarillo e indicadas con punta de flecha en Fig. 22 D y H). Se observa, por otra parte, colocalización de FABP3 y Mitotracker en la zona alrededor del núcleo (puntos blanco azulados e indicados con flechas blancas en las Fig. 22. D y H).

En presencia del complejo albúmina + ácido oleico, el marcaje con FABP3 mantiene una distribución bastante general por todas las neuritas, acumulándose en la base de las mismas (Fig. 23. B). Sin embargo, el marcaje de GAP43 es más intenso, con zonas con gran número de axones (Fig. 23. C). El colorante Mitotracker también se acumula con mayor

intensidad en el comienzo de las neuritas (Fig. 23. D). No obstante, en esta condición la colocalización de FABP3 y GAP43 es más clara (puntos en amarillo en la Fig.23. B y mostrados en la Fig. 23. H). Lo mismo ocurre con la colocalización entre FABP3 y Mitotracker en las bases de las neuritas y en menor medida a lo largo de todas ellas (puntos morados en Fig. 23. F e indicados en la Fig. 23. I). Por último hay que señalar la existencia de puntos de colocalización en los que coinciden FABP3, GAP43 y Mitotracker (puntos en blanco en imagen central de la Fig. 23. A).

La Fig. 24 muestra la localización de FABP3 y Mitotracker en presencia del complejo albúmina + ácido oleico. La colocalización de FABP3 con Mitotracker es más intensa al inicio de la extensión de las neuritas (indicada por flechas rosas en la Fig. 24. A). El estudio mediante una aplicación del programa MatLAB (MathWorks, 2008), nos indica las regiones con más acúmulo de los marcadores con una graduación de colores (FABP3 en la Fig. 24. E y Mitotracker en la Fig. 24. F) y las regiones suma de ambos canales (Fig. 24 G), conjuntamente con el análisis realizado con el programa ImageJ (NIH Image), que nos permite determinar los puntos de colocalización (Fig. 24. I), nos muestra con claridad la distribución de numerosos puntos (indicados en blanco en Fig. 24. I), a lo largo de las neuritas y de un mayor acúmulo de los mismos en las neuritas en su región más próxima al soma.

Igual que en el caso anterior, decidimos analizar con un mayor detalle la colocalización de FABP3 y GAP43 en neuronas en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 25).

Se aprecian zonas de colocalización donde el cuerpo celular de la neurona da comienzo a la extensión de la neurita (Fig. 25 A y D), como ocurría con el Mitotracker. Aunque el marcaje de ambas proteínas sea diferente –el anticuerpo de FABP3 marca de forma punteada pero continua todas las neuritas (Fig. 25. B), mientras que el de GAP43 presenta un marcaje en forma de vesículas en determinados axones (Fig. 25. C)-, ambos marcadores colocalizan ampliamente a lo largo de todo el axón. Además, los puntos de colocalización para la pareja FABP3-GAP43, (Fig. 23. I) a lo largo de los axones, son más abundantes que los obtenidos para la pareja FABP3-Mitotracker.

#### 4.6. Estudio de la localización de las FABPs en cortes de cerebro de rata postnatal.

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado la existencia de dos picos en la síntesis de ácido oleico durante el desarrollo del cerebro, siendo el segundo de ellos, coincidente con el momento del parto y con un aumento en los niveles de albúmina, tanto en cerebro, como en líquido cefalorraquídeo (Velasco et al. 2003). Por lo tanto, decidimos estudiar la localización de las FABPs en el cerebro en este momento del desarrollo. Para ello, se tomaron secciones coronales en las que es posible observar el ventrículo lateral y las zonas ventricular y subventricular (VZ y SVZ), así como el estriado y caudado *putamen*. Hay que recordar que en el estriado se observó un aumento de la fasciculación axonal promovida por el complejo albúmina + ácido oleico en cultivos organotípicos de rodajas coronales (Polo-Hernandez et al. 2010).

Se tomaron cerebros de neonatos de uno y tres días de vida postnatal (P1 y P3, respectivamente, y una vez fijados, y se realizó un estudio inmunohistoquímico en secciones coronales de 15  $\mu$ m de la región mencionada.

Los resultados obtenidos mostraron un patrón diferencial y característico para cada una de las tres FABPs estudiadas (Fig. 26). Así, a P1, el marcaje de la FABP3 (Fig. 26. A), es débil, destacando en algunos grupos de células maduras del estriado. Además se observan algunas células en la región próxima a las zonas ventriculares o en las áreas del estriado desde la comisura de la cabecera de la corriente migratoria lateral que expresan FABP3. A P3 (Fig. 26. B), se observan más células positivas en todas las regiones siendo más intenso el marcaje en el estriado y regiones mediales de la VZ, y alguna célula en la corriente migratoria lateral. Sin embargo sigue manteniéndose una zona con menor marcación entre la VZ y el estriado.

El marcaje de la FABP5 es ligeramente más débil, pero más extenso que el de la FABP3 a P1. La FABP5 está presente en la SVZ en grupos de células, así como en el estriado y en las regiones de núcleo *accumbens* (Fig. 26. C). A P3 (Fig. 26. D), el marcaje es muy similar al de la FABP3, pero quizá más extenso. Es importante el aumento de intensidad del marcaje en la mayor parte del estriado y en ciertas células que van desde la VZ hacia la corriente migratoria lateral.

El marcaje de la FABP7 a P1, se encuentra predominantemente en la SVZ y la VZ (Fig. 26. E), observándose también algunas células marcadas en el estriado. A P3 (Fig. 26. F) el marcaje de la FABP7 avanza radialmente hacia la corriente migratoria lateral y el estriado, donde también se expresa de manera más difusa.

Para determinar la posible relación de las FABPs en la diferenciación neuronal, estudiamos la distribución de las FABPs, conjuntamente con los marcadores de diferenciación axonal y dendrítica, GAP43, y MAP2, respectivamente, en la VZ, la SVZ y el estriado.

Para ello, las secciones obtenidas tal y como ya se ha indicado en este mismo apartado, fueron sometidas a una doble tinción inmunohistoquímica según el protocolo habitual descrito en la sección de Material y Métodos.

Tanto la FABP3 como la FABP5 muestran colocalización con GAP43 a P1 en el estriado (Fig. 27 C y F). En el caso de la FABP5, la colocalización también se produce en la zona próxima al ventrículo (Fig. 27. D-F). Sin embargo, no ha coincidencia en la localización de FABP7 y GAP43 (Fig. 27. G-I). De hecho, las células FABP7+ permanecen en una zona próxima al ventrículo en la que no hay marcaje de GAP43.

El análisis a P3 (Fig.28), muestra que GAP43 presenta un patrón muy característico en acúmulos en la región del estriado, reduciéndose la zona oscura observable a P1 (Fig. 27) que separa esta región, el estriado, de las zonas VZ y SVZ (véase Fig. 28. B, E o H). Se aprecia una gran coincidencia de GAP43 con FABP3 en las neuronas del estriado (Fig. 28. C). Comparativamente con la pareja FABP3-GAP43, la colocalización de la pareja FABP5-GAP43 es menor (Fig. 28. F). Las células que se marcan para FABP7 se localizan entre los agregados de GAP43 (Fig. 28. G-I).

Cuando estudiamos la localización de FABP3 y MAP2 (Fig. 29), se repiten los resultados observados para GAP43. Así, a P1 (Fig. 29. A) se observa la presencia de células FABP3+ en la SVZ, la cual no aparece marcada con MAP2 (Fotomicrografías de fluorescencia enmarcadas en rojo). Sin embargo, la FABP3 se expresa más en el estriado a la misma edad gestacional (P1), (Fotografías de fluorescencia enmarcadas en azul), aunque sigue siendo un marcaje débil y en este caso coincide con MAP2. A P3 (Fig. 29. B), FABP3 se expresa en algunas células de la zona medial de la VZ donde no coincide con MAP2 (Fotomicrografías de fluorescencia enmarcadas en rojo) y el marcaje se hace más intenso en el estriado donde sí parece coincidir con los agregados de neuronas marcadas con MAP2 (Fotomicrografías de fluorescencia enmarcadas en azul).

Así mismo, se realizó un doble marcaje de FABP5 con MAP2 a P1, en el que se observan células FABP5+ en las zonas limítrofes del ventrículo de forma intensa (Fig. 30. A), y más débilmente en el estriado, donde sí se marca con mayor intensidad en los acúmulos neuronales y coincide con el marcador MAP2 (Fig. 30. C). Más clara parece la colocalización en la región ventral del ventrículo hacia el núcleo *accumbens*.

## 4.7. Estudio del papel de las FABPs en el efecto neurotrófico del ácido oleico en cultivos organotípicos de cerebro de rata.

Con objeto de estudiar la participación de las FABPs en el efecto del ácido oleico en un modelo que incluyera la interacción de los distintos grupos celulares, se decidió estudiar el efecto del complejo albúmina + ácido oleico en un modelo *ex vivo*, de rodajas en cultivo.

## 4.7.1. Estudio del papel de la FABP3 en el efecto del ácido oleico sobre la diferenciación neuronal en cultivos organotípicos.

En trabajos previos, nuestro grupo de investigación describió el efecto del complejo albúmina + ácido oleico sobre el marcador de diferenciación axonal, GAP43, en rodajas de cultivo organotípico, describiendo el aumento del número de axones y de su grosor, en el estriado en el momento del nacimiento. Este efecto, se observa también en presencia de la albúmina, al inducir ésta la síntesis del ácido oleico, a través de la enzima SCD1, en las células gliales de la SVZ (Polo-Hernandez et al. 2010). En el presente trabajo se quiso caracterizar el efecto del complejo albúmina + ácido oleico sobre la diferenciación neuronal en los cultivos organotípicos, analizando su relación con la expresión de FABP3. Por tanto, se estudió la localización de las proteínas marcadoras de diferenciación axonal y dendrítica, GAP43 y MAP2, y de FABP3.

Para dicho objetivo, se obtuvieron rodajas coronales de cerebro de fetos a término (PO), de 250  $\mu$ m, que fueron colocadas sobre un inserto y crecidas en un medio definido (control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (p/v) (+BSA), o con el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M. Las rodajas se mantuvieron en cultivo durante 72 horas (3 DIV) y a continuación, fueron separadas del inserto y fijadas con

paraformaldehído al 4 % (p/v). Por último se sometieron a una tinción sencilla, o doble, con los antisueros correspondientes a GAP43, MAP2 y FABP3.

Para certificar el efecto axonogénico del complejo albúmina + ácido oleico se analizó la expresión de GAP43. En la Fig. 31. A, D y G, en la condición control, se observa la formación de fascículos axonales en la región del estriado. Además, se pueden apreciar con claridad numerosas células marcadas con GAP43 en la SVZ, a lo largo de toda la región limítrofe con el ventrículo y que continúan por la corriente migratoria lateral (véanse las flechas de la Fig. 31. A). Sin embargo, en presencia de albúmina, se observa la aparición de gruesos fascículos axonales, en la región del estriado, que abarcan desde la región adyacente a la SVZ, hasta la cabecera de la corriente migratoria lateral y el cuerpo calloso (Fig. 31 B, E y F). Mayoritariamente la formación de los fascículos se produce en la parte superior del estriado (véanse las flechas de la Fig. 31. B), pero también se aprecian fascículos más delgados discurriendo en paralelo con la SVZ y en su unión con la corriente migratoria lateral. Los fascículos axonales son más apreciables en presencia del complejo albúmina + ácido oleico en la región del estriado (Fig. 31. C y F), y en este caso muestran una distribución no ordenada, en forma de ovillos (Fig. 31. F). Así mismo, los haces que discurren en la SVZ (véanse las flechas de la Fig. 31. C), se marcan más intensamente.

De forma similar, pero realizando una doble tinción, se estudiaron conjuntamente FABP3 y GAP43, para ver la localización de las células FABP3+ en relación a las células y regiones en las que se observaba el efecto del complejo albúmina + ácido oleico sobre GAP43. En este sentido, la FABP3 en la condición control, marca células que se distribuyen por la SVZ y la corriente migratoria lateral, que son neuronas también marcadas con GAP43 (véanse las flechas de la Fig. 32. A, D y la colocalización en G). Además, existe también colocalización en algunos de los acúmulos de células del estriado (Algunas de ellas indicadas con flechas blancas en la Fig. 32. A). En presencia de albúmina, la FABP3 deja de marcarse sólo en la SVZ y aparece marcando regiones adyacentes a la misma y extendiéndose hacia el estriado (Fig. 32. B. Flechas blancas), coincidiendo en algunos de los fascículos axonales (Fig. 32. H). En presencia del complejo albúmina + ácido oleico, la FABP3 se hace más intensa en el estriado y forma haces radiales que parten de la región medial y superior de la pared del ventrículo y, en el estriado desde la corriente migratoria lateral (Fig. 32. C. Flechas). En este caso se aprecia mejor la colocalización existente en todas las condiciones de GAP43 y FABP3 (Fig. 32. G, H e I).

Para completar el análisis de la diferenciación neuronal se analizó la localización del marcador de diferenciación dendrítica, MAP2, conjuntamente con FABP3, mediante una doble tinción inmunohistoquímica.

En el caso de MAP2, el efecto del complejo albúmina + ácido oleico, no es tan evidente como en el caso de GAP43, al no verse los fascículos axonales. En la situación control MAP2 muestra un marcaje en la SVZ y en acúmulos en el estriado (Fig. 33. A). En presencia de albúmina (Fig. 33. B), se aprecia claramente una zona con un marcaje más intenso en comparación con la situación control (Fig. 33. A), en paralelo a la SVZ pero más separada del ventrículo, radialmente hacia el comienzo del estriado. En el caso de la adición del complejo albúmina + ácido oleico, se observan las zonas con fascículos, en zonas más

internas del estriado, donde se ven acúmulos y gran abundancia de neuritas en diferenciación (Fig. 33. C).

Comparando el marcaje de MAP2 con el de FABP3 se observa la colocalización de ambos marcadores en la SVZ y el estriado en todas las condiciones. En la condición control, el marcaje de FABP3 es difuso en el estriado (Fig. 33. D). En presencia de albúmina, aparecen acúmulos en disposición radial a la SVZ en las mismas zonas en las que MAP2 es más intensa (Fig. 33. E. Véanse las flechas blancas), con los cuales colocaliza (Fig. 33. H). Y, cuando se añade el complejo de albúmina + ácido oleico, aparecen zonas de células teñidas con FABP3, muy intensas, en el estriado (Fig. 33. F. Indicados con flechas) y positivos también para MAP2 con la que vuelve a colocalizar de forma muy intensa (Fig. 33. I).

### 4.7.1.1. Estudio del efecto del silenciamiento de FABP3 en el efecto promovido por el complejo albúmina + oleico en cultivos organotípicos.

Una vez determinada la localización de FABP3 en el cultivo organotípico, quisimos analizar el efecto del silenciamiento de FABP3 en la diferenciación promovida por el complejo albúmina + oleico.

Para ello, rodajas coronales de fetos a término (P0) de 250 µm se incubaron con NTsiRNA ó FABP5-siRNA, en presencia de *Lipofectamina 2000* como agente de transfección, durante 3 DIV en un medio definido (Control), suplementado con albúmina al 2 % (+BSA), o con el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico). Entonces cada rodaja fue recogida y disgregada con ayuda de una solución para la extracción de proteínas. Las muestras fueron separadas y analizadas por la técnica de Western-blot. Se emplearon anticuerpos para la detección de FABP3, y de los marcadores de diferenciación dendrítica y axonal, MAP2 y GAP43. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas con ayuda de programas de imagen (ImageJ) y analizadas estadísticamente.

Los resultados muestran que en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, la FABP3 aumenta significativamente (Fig. 34. A y B). El silenciamiento de la FABP3 redujo en un 35 % su expresión respecto al control (Fig. 34. A y B). En los cultivos organotípicos, en la condición NT-siRNA, la presencia de albúmina o del complejo albúmina + ácido oleico aumenta de manera altamente significativa los niveles de los dos marcadores de diferenciación neuronal, MAP2 (Fig. 34. C) y GAP43 (Fig. 34. D). Cuando se silencia la FABP3, se reducen significativamente los valores de MAP2 en un 50 % (Fig.34. C), y se impide el efecto de la albúmina, o del complejo albúmina + ácido oleico, sobre GAP43 (Fig. 34. D).

## 4.7.2. Estudio del posible papel de la FABP7 en el efecto del complejo albúmina + ácido oleico sobre la migración neuronal en cultivos organotípicos.

Una vez estudiada la diferenciación, decidimos estudiar el posible papel de FABP7 en la migración neuronal promovida por el efecto del complejo albúmina + ácido oleico en cultivos organotípicos. En este sentido, el complejo albúmina + ácido oleico promueve un efecto pro-migratorio, tanto en neuronas en cultivo, como en explantes de células de la SVZ (Polo-Hernández, E. Tesis. 2010).

Para ello se realizaron los cultivos organotípicos, tal y como se ha descrito en Material y Métodos y, una vez fijadas las rodajas, se hicieron tinciones inmunohistoquímicas dobles del marcador de migración neuronal, DCX, y GAP43, así como de DCX con FABP7.

En la condición control, la mayor parte de las células en migración (DCX+) se localizan a lo largo de la SVZ y la corriente migratoria lateral (Fig. 35. A. Flechas blancas). En presencia de albúmina el marcaje de DCX se extiende desde la SVZ y la corriente migratoria rostral hasta el estriado (Fig. 35. B. Flechas). Este fenómeno se agudiza en presencia del complejo albúmina + ácido oleico y se aprecia una zona intensamente marcada en el estriado (Fig. 35. C. Flechas blancas). En presencia de la albúmina, se aprecia una colocalización entre GAP43 y DCX en el extremo de la región de migración y el inicio de las zonas de formación de los fascículos axonales en el estriado (Fig. 35 H e I). Este hecho no se produce en ausencia de albúmina, en donde las células DCX+/GAP43+ se mantienen en la SVZ (Fig. 35. G).

La glía radial juega un papel importante en la migración neuronal y éstas células expresan FABP7 (también conocida como BLBP). Por este motivo, decidimos continuar el estudio de la migración neuronal promovida por el complejo albúmina + ácido oleico en los cultivos organotípicos, a través del análisis de la localización de las células que expresaban el marcador FABP7.

Observamos que la DCX y la FABP7 muestran una localización muy similar en las mismas áreas en todas las condiciones (Fig. 36 G, H e I). En la condición control (Fig. 36. A), la FABP7 se localiza en células de la SVZ (indicadas con flechas blancas), observándose una colocalización con DCX en dichas células (Fig. 36. G), lo cual sugiere su carácter de células progenitoras. En presencia de albúmina (Fig. 36. B), la FABP7 se extiende radialmente hacia el estriado desde las paredes del ventrículo (Fig. 36. E). En presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 36. F), el marcaje de FABP7 (indicado con flechas en la Fig. 36. C) y de DCX (Fig. 36. E) se extienden radialmente desde las paredes de la SVZ hasta el estriado (Fig. 36. H). En presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 36. C), el marcaje de FABP7 aparece muy intenso en la zona adyacente a la SVZ, con algunas proyecciones a lo largo del estriado, el cual aumenta considerablemente en paralelo a la corriente migratoria lateral (Fig. 36. C. Flechas). Por su parte, la DCX, marca la zona intermedia entre la SVZ y el estriado (Fig. 36. F). En este caso, en presencia de álbumina + ácido oleico no se observa colocalización entre ambos marcadores (Fig. 36. I).

## 4.7.2.1. Estudio del silenciamiento de FABP7 en el efecto promovido por el ácido oleico en cultivos organotípicos.

Con objeto de investigar la participación de FABP7 en el efecto neurotrófico del complejo albúmina + ácido oleico, decidimos silenciar FABP7 en rodajas en cultivo.

Para ello, las rodajas coronales de fetos a término (P0) de 250 µm se incubaron con NTsiRNA ó FABP5-siRNA en presencia de *Lipofectamina 2000* como agente de transfección, durante 3 DIV en un medio definido (Control), suplementado con albúmina al 2 % (+BSA), o con el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico). Entonces cada rodaja fue recogida y disgregada con ayuda de una solución para la extracción de proteínas. Las muestras fueron separadas y analizadas por la técnica de Western-blot. Se emplearon anticuerpos para la detección de FABP7 y de los marcadores de diferenciación dendrítica y axonal, MAP2 y GAP43. Las bandas obtenidas se cuantificaron con ayuda de programas de imagen (ImageJ) y se analizaron estadísticamente los resultados de los experimentos.

Los resultados muestran que los niveles de FABP7 en rodajas aumentan significativamente en presencia de albúmina y del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 37. A y B). La transfección con FABP7-siRNA en la condición control sólo redujo los niveles de expresión en un 25 %, mientras que en presencia de albúmina, o de albúmina + ácido oleico se redujeron en un 50 % respecto a la condición NT-siRNA.

El silenciamiento de FABP7 disminuyó considerablemente los niveles de MAP2, incluso en la condición control, alcanzando en todos los casos valores inferiores al 40 % (Fig. 37. C). En el caso de la GAP43, el silenciamiento de FABP7 redujo a la GAP43 en un porcentaje similar a como disminuía la propia FABP7 (Fig. 37. D). El efecto de la albúmina y del complejo albúmina + ácido oleico sobre MAP2 y GAP43 que se observa en el cultivo de rodajas transfectadas con NT-siRNA se previene cuando se silencia la FABP7 (Fig. 37. A y B).

## 4.7.3. Estudio de la localización de la FABP5 en presencia del ácido oleico en cultivos organotípicos.

La FABP5 es la proteína de la familia de las FABPs que se encuentra tanto en neuronas como células gliales de forma mayoritaria en la etapa perinatal y postnatal temprana. Quisimos investigar si su distribución en presencia del complejo albúmina + ácido oleico mostraba un patrón coincidente, bien con las células en migración (marcadas con DCX), o bien con las neuronas en diferenciación (marcadas con GAP43).

Para ello incubamos rodajas coronales de 250  $\mu$ m en insertos sobre un medio definido con el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Las rodajas fueron fijadas y se realizó una triple tinción inmunohistoquímica con FABP5, GAP43 y DCX.

Los resultados mostraron un marcaje intenso de FABP5 en la zona que rodea al ventrículo, preferentemente hacia la corriente migratoria lateral, en la zona del núcleo *accumbens* y más difusamente en el estriado (Fig. 38. B). Este marcaje coincide con el de GAP43 en la zona de los haces paralelos a la corriente migratoria lateral y el cuerpo calloso (Fig. 38. E). La FABP5 coincide con DCX en la zona adyacente a la SVZ (color morado en Fig. 38. A y F).

### 4.7.4. Estudio del efecto del silenciamiento de FABP5 sobre la viabilidad celular en cultivos organotípicos.

Debido al fuerte efecto sobre la viabilidad celular observado en neuronas al silenciar la FABP5 decidimos estudiar si este efecto también se producía en rodajas de cultivo organotípico. Para ello incubamos rodajas coronales de 250  $\mu$ m en insertos sobre un medio definido (Control), suplementado con albúmina al 2 % (p/v) (+BSA), o con el complejo albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Al medio se le añadió NT-siRNA o FABP5-siRNA 75 nM en una solución con el agente de transfección *Lipofectamina 2000*, y se incubó durante 72 horas. Entonces las secciones se fijaron y se sometieron a la tinción del método de TUNEL, empleándose yoduro de propidio como control del número total de células.

Los resultados muestran que en las condiciones NT-siRNA apenas hay células TUNEL positivas, independientemente de la presencia o no de albúmina o de ácido oleico (Fig. 39. Condición NT-siRNA). Por el contrario, el número de células TUNEL+ es mucho mayor cuando se silencia FABP5 (Fig. 39. FABP5-siRNA), en todas las condiciones experimentales. La cuantificación del número de células TUNEL+ respecto del total de células por campo mostró que mientras que el valor se situaba en torno al 10 % cuando se transfectaba con NT-siRNA, este valor sube hasta el 50 % aproximadamente, cuando se silencia la FABP5 con FABP5-siRNA (Fig. 40. B).

### 4.8. Análisis de las isoformas de la PKC implicadas en el efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas en cultivo primario.

Tal y como se ha descrito en la introducción, la acción neurotrófica del ácido oleico sobre la expresión de GAP43 y MAP2 está mediada por la proteína kinasa C (PKC), (Granda et al. 2003; Rodriguez-Rodriguez et al. 2004). Además, en trabajos no publicados de nuestro grupo de investigación se analizó la presencia de las distintas isoformas de la PKC tanto en cerebro, como en neuronas en cultivo primario, demostrando que aunque en cerebro adulto la mayor parte de las isoformas estaban presentes, sólo la PKCα y la PKCε, estaban presentes en las neuronas en cultivo (véase Fig. 41. Bento-Abreu, A. Resultados no publicados).

Por estos motivos, decidimos estudiar cuál de estas dos isoformas, PKCα y PKCε, estaba implicada en el efecto neurotrófico del ácido oleico. Analizamos el efecto sobre la morfología y la diferenciación neuronal regulando la actividad de estas isoformas y corroboramos estos experimentos con estudios de pérdida de función mediante silenciamiento con siRNAs específicos.

## 4.8.1. Participación de isoforma PKCα en el efecto neurotrófico del ácido oleico en neuronas en cultivo primario.

Empezamos el análisis de las dos isoformas de PKC presentes en neuronas, estudiando la PKCα, estableciendo primero los efectos de su inhibición sobre la morfología y los marcadores de diferenciación neuronal, MAP2 y GAP43, para después corroborar y precisar dichos efectos mediante el silenciamiento específico de dicha isoforma.

En primer lugar, se decidió estudiar la inhibición de la PKCα mediante un inhibidor específico de las isoformas PKCα y la PKCβ (P0102. Sigma). Se trata de un péptido de 9 aminoácidos, miristoilado para facilitar su entrada en las células, que actúa como pseudosustrato y es capaz de inhibir selectivamente a las dos isoformas indicadas, la PKCα y la PKCβ (Omiyi et al. 2005). Aunque este péptido es también un inhibidor de la isoforma PKCβ, los resultados previos habían mostrado una ausencia de la PKCβ en neuronas en cultivo (Fig. 41), por lo que no se esperaba interferencia con las otras isoformas presentes.

Se emplearon neuronas en cultivo primario, incubadas en un medio definido suplementado con albúmina al 2 % (p/v) (+BSA), o el complejo de albúmina al 2 % + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico), a las que se había añadido el inhibidor de PKC $\alpha/\beta$  a concentración de 50  $\mu$ M. Transcurridas 72 horas, las células fueron fotografiadas con ayuda de un microscopio invertido para el análisis de los cambios morfológicos de las neuronas. Posteriormente se recogieron las proteínas con una solución de extracción –descrita en el apartado de Material y Métodos-, y se separaron y analizaron mediante la técnica de Western-blot.

Se emplearon anticuerpos para determinar los niveles de expresión de PKC $\alpha$ , MAP2, GAP43 y GAPDH, utilizado éste último como control de carga. Los resultados se cuantificaron con ayuda de un programa de imagen (ImageJ) y se analizaron estadísticamente.

Los resultados muestran que en ausencia del inhibidor, el complejo de albúmina + ácido oleico (Fig. 42. B) aumenta considerablemente el número y grosor de las neuritas respecto a la condición de albúmina (Fig. 42. A), lo cual es característico del efecto neurotrófico promovido por ácido oleico. En presencia de albúmina, la adición del inhibidor de PKC $\alpha/\beta$  (Fig. 42. C), no produce cambios observables con respecto a la condición control (Fig. 42. A). Con respecto al complejo albúmina + ácido oleico, no se aprecia un aumento en el número, ni en el grosor, de las neuritas en presencia del inibidor de PKC $\alpha/\beta$  (Fig.42. D). Sin embargo sí parece observarse una cierta agrupación celular característica del efecto neurotrófico promovido por el ácido oleico.

Analizamos los niveles de los marcadores moleculares de diferenciación dendrítica y axonal, MAP2 y GAP43, en presencia del inhibidor de PKC $\alpha/\beta$ . Los resultados muestran que el aumento observado en los niveles de expresión de la MAP2 en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, en la situación control (Fig. 43. A y B), se ve reducido, aunque sigue siendo significativo, en presencia del inhibidor. Por otra parte, el aumento de la GAP43 observado en presencia del complejo albúmina + ácido oleico en la situación control, se previene en presencia del inhibidor de PKC $\alpha/\beta$  (Fig. 43. A y C).

Decidimos corroborar los resultados anteriores mediante el silenciamiento de la PKCa mediante la técnica de la transfección con siRNAs. En este sentido, transfectamos neuronas

con un siRNA sin diana (NT-siRNA) o secuencias específicas para el silenciamiento de la isoforma PKCα, que denominaremos PKCα-siRNA. Después, las neuronas se incubaron en un medio definido suplementado con albúmina (+BSA) o con el complejo albúmina + ácido oleico (+BSA +Oleico). Transcurridas 72 horas, se tomaron fotomicrografías y, a continuación se extrajeron las proteínas para su análisis por Wester-blot.

En las condición transfectadas con NT-siRNA, al añadir el complejo albúmina + ácido oleico se observa un aumento en el número y grosor de las neuritas, característico del efecto neurotrófico promovido por el ácido oleico (Fig. 44. A y B). Cuando se silencia la PKC $\alpha$  (PKC $\alpha$ -siRNA), no se observan diferencias en presencia de albúmina (Fig. 44. C) con respecto a la situación NT-siRNA (Fig. 44. A), pero no hay aumento del número, ni del grosor, de las neuritas cuando se añade el complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 44. D), evitándose el efecto neurotrófico del ácido oleico. En esta condición (Fig. 44. D), se observa que la mayoría de las neuronas sólo tienen una o dos neuritas visibles. Además, las células en las que se ha silenciado PKC $\alpha$  en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, muestran cierta agregación que sí se observa en la condición NT-siRNA en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, fig. 44. B y D).

En estas circunstancias se analizaron los niveles de expresión de los marcadores MAP2 y GAP43 en las muestras de proteínas extraídas en cada condición y cuantificadas por Western-blot.

En las condiciones NT-siRNA se observa un aumento significativo de la PKC $\alpha$  en presencia del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 45. A y B). Al analizar el alcance del silenciamiento de PKC $\alpha$  se observó que en presencia de albúmina, el silenciamiento de PKC $\alpha$  supuso una disminución de un 35 % en los niveles de expresión de la PKC $\alpha$  respecto a la condición NT-siRNA con albúmina (Fig. 45. B). La presencia del complejo albúmina + ácido oleico estando silenciada PKC $\alpha$ , no aumenta los niveles de expresión de PKC $\alpha$ , tal y como ocurría en las condiciones NT-siRNA, y sus niveles son significativamente menores cuando se los compara con su equivalente NT-siRNA (Fig. 45. B).

Por otro lado, el aumento de los niveles de MAP2 observado en presencia del complejo albúmina + ácido oleico en las condiciones NT-siRNA, se previene mediante el silenciamiento de PKC $\alpha$  (Fig. 45. C). Así mismo, el aumento de GAP43 en presencia del complejo albúmina + ácido oleico en la condiciones NT-siRNA, se suprime e incluso disminuye significativamente al silenciar PKC $\alpha$ , tanto en presencia de albúmina, como del complejo albúmina + oleico, no observándose diferencias significativas entre las dos condiciones (Fig. 45. D). Estos datos confirman la participación de la PKC $\alpha$  en la inducción de la diferenciación neuronal promovida por ácido oleico.

## **4.8.2.** Participación de la PKCε en la diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico en neuronas en cultivo primario.

El estudio de la posible participación de la PKCɛ se realizó mediante la observación de la morfología neuronal y los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación MAP2

y GAP43, en neuronas en cultivo primario en presencia de inhibidores o activadores específicos de la PKCε, así como mediante el silenciamiento de esta isoforma con un siRNA específico, que denominaremos PKCε-siRNA.

Para ello, se sembraron las neuronas en un medio definido suplementado con albúmina al 2 % (+BSA), o con el complejo albúmina al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Se utilizó un inhibidor específico de la isoforma PKCɛ (Calbiochem. Ref.- 539522), el cual es un octapéptido derivado del ácido linoleico que inhibe la translocación de la PKCɛ a destinos subcelulares, a concentración 50  $\mu$ M. También se utilizó un control negativo del inhibidor (Calbiochem. Ref.- 539542), proporcionado por la casa comercial a la misma concentración. Además, se estudió el efecto causado por la adición al medio de un activador específico de la PKCɛ, denominado DCP-LA (Sigma. D5318) a la misma concentración de los inhibidores de 50  $\mu$ M.

En el caso del silenciamiento, las neuronas fueron transfectadas con un siRNA sin diana (NTsiRNA), o con el específico de la isoforma que queremos silenciar, que denominaremos PKCɛ-siRNA.

A las 72 horas de cultivo, se observaron las células y se tomaron fotomicrografías con ayuda de un microscopio invertido. Después se extrajeron las proteínas para su separación y cuantificación por Western-Blot. Se determinó la expresión de MAP2, GAP43, PKCɛ mediante anticuerpos específicos y el análisis de las bandas obtenidas se cuantificó frente a los niveles de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de la probabilidad empleando la prueba T de Student.

Iniciamos el estudio de la isoforma PKCε, de forma similar a como hicimos con la PKCα, analizando la morfología neuronal. Las imágenes de las neuronas en cultivo mostran la reproducibilidad del efecto neurotrófico del complejo albúmina + oleico, en las condiciones control (Fig. 46. A y B). En presencia del inhibidor de la PKCε, se sigue observando el efecto del complejo albúmina + ácido oleico en cuanto a la agregación celular, pero el número y, especialmente, el grosor de las neuritas no parece incrementarse (Fig. 46. C y D). El control negativo reproduce la situación control (Fig. 46. E y F) y, por último, el activador, DCP-LA, muestra un aumento del número de las neuritas y cierto agrupamiento celular en presencia únicamente de albúmina (Fig. 46. G), de forma muy parecida a la observada en la situación control en presencia del complejo albúmina + oleico.

Ante el análisis de los niveles de proteína por Western-blot y, para descartar un efecto cruzado entre los antisueros para las dos isoformas de la PKC se decidió realizar un estudio paralelo de ambos, silenciando ambas isoformas y comparando las bandas obtenidas para los dos silenciamientos con cada uno de los anticuerpos utilizados.

Se transfectaron neuronas con los NT-siRNA y siRNAs correspondientes a cada una de las isoformas, que denominaremos PKCα-siRNA y PKCε-siRNA, respectivamente. A las 72 horas se extrajeron las proteínas para su separación y análisis por Western-blot. Se determinó la expresión de MAP2, como marcador control del efecto del complejo albúmina + ácido oleico, y las dos PKCs: PKCα y PKCε.

Los resultados mostraron en el caso del anticuerpo de la PKC $\alpha$ , cómo la banda disminuye en las muestras en las que se ha silenciado esta proteína, mientras que se expresa de forma similar a los controles (NT-siRNA), cuando la que se ha silenciado es PKC $\epsilon$  (Fig. 47. A). El

resultado en el caso de la PKC $\epsilon$  es similar. Muestra un incremento en las muestras la muestras control, lo mismo que en las muestras en las que se ha silenciado PKC $\alpha$ , y disminuye y no se incrementa en presencia del complejo albúmina + ácido oleico, en las muestras en las que se ha silenciado PKC $\epsilon$  (Fig. 47. B).

MAP2 no muestra incrementos en ninguna de las muestras silenciadas e incluso disminuye (Fig. 47. A y B).

Descartado el error cruzado entre los silenciamientos o antisueros, procedimos a evaluar el efecto de la inhibición y de la activación de PKCɛ en los niveles de los marcadores MAP2 y GAP43 en presencia o ausencia del factor neurotrófico, ácido oleico.

Nuestros resultados muestran que la presencia del inhibidor de PKCɛ bloquea el efecto del complejo de albúmina + ácido oleico que sobre la MAP2 observable en la situación control (Fig. 48. A y B). Por lo que respecta a la GAP43 (Fig. 48.A y C), el inhibidor de PKCɛ previene el efecto del complejo albúmina + oleico, e incluso disminuye los niveles de GAP43 en su presencia.

En presencia del activador, DCP-LA, se mantiene el efecto del complejo albúmina + ácido oleico, sobre MAP2, y además se observa un aumento significativo de ambas condiciones en relación a sus respectivas condiciones control (Fig. 48. A y B). El activador mantiene el efecto del complejo albúmina + ácido oleico, pero no incrementa los niveles de GAP43 con respecto a la situación control (Fig. 48. A y C).

Para obtener un conocimiento más preciso del bloqueo de forma aguda de la PKC $\epsilon$  y descartar posibles efectos secundarios de los inhibidores, repetimos de manera similar a como hicimos para la isoforma PKC $\alpha$ , el estudio sobre la diferenciación neuronal causada por el factor neurotrófico, ácido oleico, al silenciarse la isoforma PKC $\epsilon$ .

En el caso de la isoforma PKCε, las células tratadas con NT-siRNA siguen repitiendo el patrón de diferenciación y agrupación promovido por el complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 49. A y B). Sin embargo, el tratamiento con PKCε-siRNA afecta ligeramente al número y longitud de las neuritas en presencia de albúmina (Fig. 49. C) y, en presencia del ácido oleico, se reduce el número y grosor de las neuritas, y aún se aprecia agrupamiento celular (Fig. 44. D).

Para terminar, analizamos los niveles de proteína de los marcadores MAP2 y GAP43 al silenciar PKCε mediante Western-blot. Se observa un aumento significativo de la PKCε en presencia del complejo albúmina + ácido oleico en ausencia de silenciamiento (Fig. 50. A y B). El silenciamiento de la isoforma PKCε alcanza niveles próximos al 45 % esté o no presente el ácido oleico, y se previene el aumento de la PKCε observado en presencia del complejo albúmina + ácido oleico NT-siRNA (Fig. 50 A y B). Al silenciar la PKCε los niveles de MAP2 disminuyen en un 30 % en presencia de albúmina y se previene el efecto del complejo albúmina + ácido oleico (Fig. 50. A y C). En el caso del GAP43, el silenciamiento de PKCε impide el efecto neurotrófico del ácido oleico (Fig. 50. D).



Fig. 1.- Localización inmunocitoquímica de las FABPs en astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos de fetos a término (P0), se sembraron a baja densidad (100 cél./mm²) y se cultivaron en medio DEMEM con suero bovino al 10% (v/v) durante 21 días. Entonces se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica para FABP3, FABP5 y FABP7, conjuntamente con el marcador de astrocitos, GFAP. Mientras que la FABP3 no se encuentra presente en astrocitos, la FABP5 presenta un marcaje débil comparativamente con la FABP7 en la mayor parte de los astrocitos. Posiblemente debido a la heterogeneidad de los astrocitos en este tipo de cultivos, se distinguen células marcadas FABP7-/ /GFAP+, células FABP7+/GFAP-, y celulas doblemente marcadas FABP7+/GFAP+. Además la FABP7 muestra un marcaje menos homogéneo en el citoplasma, mostrando zonas con mayor densidad, tal y como se indica con las flechas. Escala 50 μm.



### Fig. 2.- Localización inmunocitoquímica de las FABPs en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas se cultivaron en medio definido suplementado con BSA al 2 % (p/v) durante 72h. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica para FABP3, FABP5 y FABP7, conjuntamente con el marcador de neuronas en desarrollo, beta-tubulina III (TUJ1). Si bien las tres FABPs están presentes en el citoplasma neuronal, la FABP3 presenta un marcaje muy intenso y distribuído a lo largo de las neuritas; la FABP5 le segue en intensidad y distribución, mientras que la FABP7 muestra un marcaje únicamente en la zona próxima al núcleo sin extenderse por las neuritas. Las flechas muestran la acumulación en la base de las neuritas de estas proteínas. Escala 15 µm.

RESULTADOS

(A)



### Fig. 3.- Efecto del ácido oleico sobre los niveles de los marcadores de diferenciación neuronal, MAP2 y GAP43, en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas se cultivaron en un medio definido (Control) suplementado o no, con BSA al 2% (p/v) (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Se extrajeron las proteínas a los tiempos indicados y se analizaron MAP2 y GAP43 junto con el control de carga GAPDH, por la técnica de Western-blot. Las radiografías fueron escaneadas y se cuantificó el área de cada banda. (A) Western-blot de MAP2, GAP43, junto a su respectivo control de carga GAPDH en cada una de las tres condiciones. (B y C) Cuantificación de los valores obtenidos expresados como porcentaje respecto de la condición control a 1 hora (T1), y expresados como valor medio  $\pm$  SEM (n = 4). La significatividad de las diferencias respecto de la condición control se calculó mediante Test *t* de Student con la corrección de Bonferroni y se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.



## Fig. 4.- Efecto del ácido oleico sobre los niveles de FABP3, FABP5 y FABP7, en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas se cultivaron en un medio definido (Control) suplementado o no, con BSA al 2% o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M. Se extrajeron las proteínas a los tiempos indicados y se analizaron las FABPs junto con el control de carga GAPDH, por la técnica de Western-blot. (A, C y E) Western-blot de las FABPs junto a su respectivo control de carga GAPDH. (B, D, y F) Cuantificación de los valores obtenidos expresados como porcentaje respecto de la condición control a 1 hora (T1), y expresados como valor medio ± SEM (n = 4). La significatividad de las diferencias respecto de la condición control se calculó mediante Test *t* de Student con corrección de Bonferroni, y se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.





Las neuronas se transfectaron o no (Control), con un siRNA específico y validado para GAPDH a dos concentraciones: 50 ó 75 nM, y cantidades crecientes (1, 2 ó 3  $\mu$ L) del agente de transfección, *Lipofectamina 2000,* y se cultivaron en medio definido durante 72 horas. Las proteínas se extrajeron y analizaron por la técnica de Western-blot empleándose la tubulina como control de carga.



### Fig. 6.- Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre los niveles de mRNA de FABP5 a las 24 horas de cultivo

Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA o FABP5-siRNA y se cultivaron en medio definido (Control), suplementado o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Transcurridas 24 h se extrajo el RNA total, se realizó la transcripcitón inversa a cDNA y, posteriormente, con ayuda de los oligos específicos, se realizaron las PCRs para amplificar el mRNA correspondiente a FABP5 y  $\beta$ -actina como control de carga. A continuación se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v). El silenciamiento no fue significativo para este tiempo. (A) Imagen resultado del escaneado del gel. (B) Representación cuantitativa correspondiente al gel de FABP5 de la imagen A.



## Fig. 7.- Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre los niveles de mRNA de FABP5 a las 48 horas.

Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA o FABP5-siRNA y se cultivaron en medio definido (Control) suplementado o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico).Transcurridas 48 h se extrajo el RNA total, se realizó la transcripción inversa a cDNA y, posteriormente, con ayuda de los oligos específicos, se realizaron las PCRs para amplificar el mRNA correspondiente a FABP5 y a  $\beta$ -actina, como control de carga. A continuación se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (p/v). (A) Imagen obtenida directamente después de escanear el gel.(B) Imágen 3D resultado de la cuantificación directa de la imágen del gel por el programa de adquisición de la imágen. El primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares y el color rojo indica saturación en la determinación del aparato de medida.



Fig. 8.- Efecto del silenciamiento de FABP5 en la morfología de neuronas en cultivo primario. Las neuronas en cultivo primario fueron transfectadas con NT-siRNA o con FABP5-siRNA y cultivadas en un medio definido suplementado, o no (Control), con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72 horas las células fueron fotografíadas con una cámara de contraste de fases de campo claro acoplada a un microscopio invertido. Escala 50 μm.

RESULTADOS



## Fig. 9.- Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre la viabilidad celular medida por el método del MTT, en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas fueron transfectadas con NT-siRNA o FABP5-siRNA y cultivadas en medio definido suplementado o no, con BSA al 2%, o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M. (A) Absorbancia del MTT a las 72h. Los valores se expresan como porcentaje respecto de la condición control NT-siRNA y son valores medios ± SEM (n ≥ 4). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA (p < 0,05) seguida de agrupación de los valores mediante HSD-Test Tukey. Los grupos con la misma letra no son significativamente diferentes. (B) Absorbancia relativa medida por MTT a los tiempo indicados de neuronas en las que se ha silenciado FABP5. Los valores se expresan como porcentaje relativo a la condición control FABP5-siRNA a las 24h y son valores medios ± SEM (n ≥ 4). RESULTADOS



# RESULTADOS

### Fig. 10.- Efecto del ácido oleico sobre la viabilidad de las neuronas en cultivo primario.

Las neuronas fueron cultivadas en medio definido (Control), suplementado o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). (A) Medida de la absorbancia relativa obtenida por el método de MTT (570 nm) a intervalos de 24 horas. Los resultados se expresan como porcentaje relativo con respecto a la condición control a las 24 horas, y son medias ± SEM (n ≥ 4). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA (p < 0,05) seguido de la formación de grupos mediante el Test de HSD-Tukey. Los grupos con la misma letra indican que no existen diferencias significativas. (B) Inmunocitoquímica para el marcador mitocondrial Mitotracker en neuronas tras 72 horas en cultivo. Las neuronas se incubaron durante 30 minutos en presencia de el colorante Mitotracker, marcador mitocondrial, previamente a ser fijadas con paraformaldehído al 4 % (p/v).



Fig. 11.- Determinación de la muerte celular por apoptosis inducida por el silenciamiento de FABP5 mediante la técnica de tinción con *Anexina V*.

Las neuronas en cultivo primario fueron transfectadas con NT-siRNA o con FABP5-siRNA y cultivadas en un medio definido (Control) suplementado, o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Transcurridas 36h las células fueron incubadas con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) durante 15 min y fijadas. Finalmente se añadió el marcador nuclear DAPI. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio invertido de fluorescencia. Escala 10  $\mu$ m.



### Fig. 12.- Cuantificación de los resultados de muerte neuronal por apoptosis inducida por el silenciamiento de FABP5

Las neuronas fueron transfectadas con NT-siRNA o FABP5-siRNA y cultivadas 36 horas en un medio suplementado con BSA al 2% o el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M. Después, las células fueron incubadas con Anexina V-FITC o yoduro de propidio (IP) durante 15 min. A continuación fueron fijadas y teñidas con DAPI. Se tomaron microfotografías con ayuda de un microscopio invertido de fluorescencia. Se cuantificó el número de células Anexina V+, IP+ y el total de células por campo (DAPI+) de un total de 9 campos (objetivo 20x) por condición (n = 9). Los valores obtenidos son valores medios ± SEM. La significatividad se analizó por ANOVA (p< 0,05) factorial seguido de agrupación por HSM-Tuckey. Letras similares indican que no son valores significativamente diferentes.





Las neuronas en cultivo primario fueron transfectadas con NT-siRNA o con FABP5-siRNA y cultivadas en un medio definido (Control) suplementado o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Transcurridas 48h las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se realizó la tinción de la técnica TUNEL y finalmente se tiñeron los núcleos de las células fijadas con yoduro de propidio (IP). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio invertido de fluorescencia. Escala 15  $\mu$ m.



## Fig. 14.- Cuantificación de las células teñidas por la técnica TUNEL tras el silenciamiento de FABP5

Las neuronas fueron transfectadas con NT-siRNA o FABP5-siRNA y cultivadas 48 horas en un medio definido (Control), suplementado o no, con BSA al 2% o el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 µM. Entonces las células fueron fijadas y teñidas con mediante el protocolo de la técnica TUNEL descrito en Material y Métodos. Se tomaron microfotografías con ayuda de un microscopio invertido de fluorescencia. Se cuantificó el número de células TUNEL positivas frente al total de células por campo, marcadas con yoduro de propidio después de la fijación (IP) de un total de 9 campos (objetivo 20x) por condición (n = 9). Los valores obtenidos son valores medios ± SEM. La significatividad se analizó por ANOVA (p< 0,05) factorial seguido de agrupación por HSM-Tuckey. Letras similares indican que no son valores significativamente diferentes.


### Fig. 15.- Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre los niveles de expresión de MAP2, GAP43, y TUJ1 en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas fueron transfectadas con NT-siRNA o FABP5-siRNA y cultivadas en medio definido suplementado o no, con BSA al 2%, o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 µM. Transcurridas 72h se extrajeron todas las proteínas y se analizaron por Western FABP5, MAP2, GAP43 y TUJ1. (A) Western-blot de las proteínas FABP5, MAP2, GAP43, TUJ1 y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B,C,D,E y F) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western-blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje (%) respecto al control NT-siRNA, y son valores medios  $\pm$  SEM (n  $\ge$  4). Análisis estadístico mediante Test t Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005. La significatividad de las diferencias entre NT-siRNA y FABP5-siRNA se expresa como # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,005.



Fig. 16.- Efecto del silenciamiento de FABP3 en la morfología de neuronas en cultivo primario. Las neuronas en cultivo primario fueron transfectadas con NT-siRNA o con FABP3-siRNA y cultivadas en un medio definido suplementado, o no (Control), con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72 horas las células fueron fotografíadas con una cámara de contraste de fases de campo claro acoplada a un microscopio invertido. Escala 50 μm.





### Fig. 17.- Efecto del silenciamiento de FABP3 sobre los niveles de expresión de MAP2 y GAP43, en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas fueron transfectadas con NT-siRNA o FABP3-siRNA y cultivadas en medio definido suplementado o no, con BSA al 2%, o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 µM. Transcurridas 72h se extrajeron todas las proteínas y se analizaron por Western Blot FABP3, MAP2, GAP43. (A) Western blot de las proteínas FABP3, MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B,C, y D) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje (%) respecto al control NT-siRNA, y son valores medios  $\pm$  SEM (n  $\ge$  4). Análisis estadístico mediante Test *t* Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005. La significatividad de las diferencias entre NT-siRNA y FABP3-siRNA se expresa como # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,005.



Fig. 18.- Efecto del silenciamiento de FABP7 en la morfología de neuronas en cultivo primario. Las neuronas en cultivo primario fueron transfectadas con NT-siRNA o con FABP7-siRNA y cultivadas en un medio definido suplementado, o no (Control), con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72 horas las células fueron fotografiadas con una cámara de contraste de fases de campo claro acoplada a un microscopio invertido. Escala 50 μm.



#### Fig. 19.- Efecto del silenciamiento de FABP7 sobre los niveles de expresión de MAP2 y GAP43, en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas fueron transfectadas con NT-siRNA o FABP7-siRNA y cultivadas en medio definido suplementado o no, con BSA al 2%, o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 µM. Transcurridas 72h se extrajeron todas las proteínas y se analizaron por Western-blot FABP7, MAP2, GAP43. (A) Western-blot de las proteínas FABP7, MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B,C, y D) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje (%) respecto al control NT-siRNA, y son valores medios  $\pm$  SEM (n  $\ge$  4). Análisis estadístico mediante Test t Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005. La significatividad de las diferencias entre NT-siRNA y FABP7-siRNA se expresa como # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,005.



### Fig. 20.- Colocalización inmunocitoquímica de FABP5 y albúmina sérica bovina (BSA) en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas fueron sembradas en un medio definido (Control) y tratadas o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Transcurridas 45 min las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (p/v) y se relizó una doble tinción contra BSA y FABP5. Fotografías de microscopía confocal. Escala 15  $\mu$ m.



Fig. 21.- Localización inmunocitoquímica de FABP7 y PPARα en neuronas en cultivo primario tras 15 minutos de incubación con albúmina o el complejo albúmina + ácido oleico.
Las neuronas se sembraron en un medio definido (Control) y se incubaron durante 15 minutos en presencia o no, de BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico).
Las células se fijaron con paraformaldehído y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica con FABP7 (A, D y G) y PPARα (B, E y H) según se describe en el apartado de Material y Métodos. Fusión de los dos canales en las fotografías de fluorescencia C, F e I. Las flechas blancas indican zonas de colocalización. Escala 15 µm.



Fig. 22.- Localización inmunocitoquímica de FABP3, GAP43 y Mitotracker en neuronas en cultivo en presencia de albúmina.

Las neuronas fueron sembradas en un medio definido suplementado con BSA al 2% (+BSA), y se dejaron en incubación durante 72 horas. Se incubaron con Mitotracker durante 15 min y se fijaron.Se relizó una triple tinción inmunocitoquímica contra GAP43 (A y E), FABP3 (B y F), y Mitotracker (C y G). (D y H) Fusión de tres canales. Las flechas blancas indican colocalización de GAP43 y FABP3, y las flechas rosas colocalización de Mitotracker y FABP3. Escala 15 µm.



Fig. 23.- Colocalización inmunocitoquímica de FABP3, GAP43 y Mitotracker en neuronas en cultivo primario en presencia del complejo albúmina + ácido oleico. Las neuronas cultivadas durante 72 en medio definido suplementado con el complejo BSA al 2% +ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico) fueron fijadas con paraformaldehido. (A) Triple localización de FABP3, GAP43 y Mitotracker. (B, C y D) Cada uno de los tres canales por separado: FABP3 (B), GAP43 (C), y Mitotracker (D). (E, F y G) Fusión de marcadores dos a dos: FABP3-GAP43 (E); FABP3-Mitotracker (F); y GAP43-Mitotracker (G). (H,I y J) Puntos de colocalización, representados en blanco, y obtenidos con ImageJ, para las parejas de marcadores indicadas en la parte inferior de cada imagen. Las flechas rosas indican colocalización de FABP3 y Mitotracker, mientras que las flechas blancan indican colocalización de FABP3 y GAP43. Escala 15 µm.



 Fig. 24.- Colocalización inmunocitoquímica de FABP3 y Mitotracker en neuronas en cultivo primario en presencia del complejo albúmina-ácido oleico.
 Neuronas cultivadas en presencia del complejo albúmina-ácido oleico durante 72h, a las que se ha realizado una doble inmunocitoquímica para la FABP3 y Mitotracker. (A) Fotomicrografía de un campo con agregaciones neuronales y doble tinción. (B, C y D) Fotomicrografías ampliadas de la región indicada en el recuadro azul mostrando cada canal por separado y su fusión. (E y F) Estudio de la intensidad de cada canal con graduación de color.
 (G) Colocalización de la imágen D. (H) Bidimensional con cada canal para calcular el umbral de colocalización y





Fig. 25.- Colocalización inmunocitoquímica de FABP3 y GAP43 en neuronas en cultivo primario en presencia del complejo albúmina-ácido oleico. Neuronas cultivadas en presencia del complejo albúmina-ácido oleico durante 72h, a las que se ha realizado una doble inmunocitoquímica para FABP3 y GAP43. (A) Fotomicrografía de un campo con agregaciones neuronales y doble tinción. (B, C y D) Fotomicrografías ampliadas de la región indicada en el recuadro azul mostrando cada canal por separado y su fusión. (E y F) Estudio de la intensidad de cada canal con graduación de color. (G) Colocalización de la imágen D. (H) Bidimensional con cada canal para calcular el umbral de colocalización e (I) puntos de colocalización de la imágen D. Las puntas de flecha rosa indican zonas de colocalización. Escala 15 μm.



Fig. 26.- Localización inmunohistoquímica de las FABPs en cortes coronales de cerebro de rata de uno y tres días de vida postnatal (P1 y P3).

Neonatos de uno o tres días de vida postnatal fueron perfundidos y sus cerebros fueron extraídos, postfijados y cortados con orientación coronal en un criostato, en secciones de 15 µm. Se seleccionaron las secciónes de interés y se realizó una tinción inmunohistoquímica para cada una de las FABPs. Escala 300 µm. Abreviaturas: CPI, Plexo Coroideo; LMS, Corriente migratoria lateral; LV, ventrículo lateral; Str, Estriado; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular.



## Fig. 27.- Localización inmunohistoquímica de las FABPs y de la GAP43 en cortes coronales de cerebro de rata de un día de vida postnatal (P1).

Neonatos de un día de vida postnatal fueron perfundidos con paraformaldehído al 4 %. Sus cerebros fueron extraídos, postfijados y cortados con orientación coronal en un criostato, en secciones de 15 µm. Se seleccionaron las secciones comprendidas entre la aparición del cuerpo calloso que une los dos hemisferios en su región más rostral, hasta la aparición de la comisura hipocampal en su región rostral y se realizó una doble tinción inmunohistoquímica para cada una de las FABPs y GAP43. Escala 300 µm. Abreviaturas: CPI, Plexo Coroideo; LMS, Corriente migratoria lateral; LV, ventrículo lateral; Str, Estriado; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular.



Fig. 28.- Localización inmunohistoquímica de las FABPs y de la GAP43 en cortes coronales de cerebro de rata de tres días de vida postnatal (P3).

Neonatos de tres días de vida postnatal fueron perfundidos con paraformaldehído al 4 %. Sus cerebros fueron extraídos, postfijados y cortados con orientación coronal en un criostato, en secciones de 15 µm. Se seleccionaron las secciónes comprendidas entre la aparición del cuerpo calloso que une los dos hemisferios en su región más rostral, hasta la aparición de la comisura hipocampal en su región rostral y se realizó una doble tinción inmunohistoquímica para cada una de las FABPs y GAP43. Escala 300 µm. Abreviaturas: CPI, Plexo Coroideo; LMS, Corriente migratoria lateral; LV, ventrículo lateral; Str, Estriado; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular.



Fig. 29.- Localización inmunohistoquímica de FABP3 y MAP2 en cortes coronales de rata en la etapa postnatal temprana.

Cortes coronales de 15 µm de uno (P1 - Fig.A) y tres (P3 - Fig.B) días de vida postnatal, respectivamente. Doble tinción inmunohistoquímica de FABP3 y MAP2 y el marcador de núcleos DAPI. Los paneles con un recuadro rojo muestran ampliada la SVZ, mientras que los que tienen recuadro azul muestran el estriado. Abreviaturas: LV, ventrículo lateral; Str, Estriado; SVZ, zona subventricular. Escala 100 µm.



## Fig. 30.- Localización inmunohistoquímica de la FABP5 y de la MAP2 en cortes coronales de cerebro de rata de un día de vida postnatal (P1).

Neonatos de un día de vida postnatal fueron perfundidos con paraformaldehído al 4 %. Sus cerebros fueron extraídos, postfijados y cortados con orientación coronal en un criostato, en secciones de 15 µm. Se realizó una doble tinción inmunohistoquímica para la FABP5 y la MAP2. Fotomicrografías de fluorescencia confocal. Las flechas blancas indican los puntos de colocalización. Escala 300 µm. Abreviaturas: Str, Estriado; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular.



Fig. 31.- Efecto del ácido oleico en la axonogénesis determinada mediante el marcador de diferenciación axonal, GAP43, en cultivo organotípico

Se extrajeron los cerebros de fetos de rata a término (PO), se obtuvieron rodajas de 250 µm que se incubaron en insertos sobre medio definido (control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA), o el complejo albúmina 2% + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico), y se mantuvieron durante 72 horas en cultivo.Después, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó una tinción inmunocitoquímica con el marcador de diferenciación axonal GAP43. (A, B y C) Hemisferio cerebral en cada una de las tres condiciones. (D, E y F) Ampliación de la zona punteada en A, B y C, respectivamente. (G, H e I) Detalle de las fibras en cada una de las condiciones. En los medios suplementados con albúmina y el complejo con oleico, se aprecia un aumento de las fasciculaciones axonales, en número y grosor, fundamentalmente en la zona del estriado desde las zonas próximas al ventrículo y a la corriente migratoria lateral. Abreviaturas: LV, ventrículo lateral; LMS, corriente migratoria ç lateral; Str, estriado; SVZ, zona subventricular. Escala 200 µm salvo que haya otra indicación.



Fig. 32.- Efecto del ácido oleico en la localización de la FABP3 y la GAP43 en cultivos organotípicos. Se extrajeron los cerebros de fetos de rata a término (P0), se obtuvieron rodajas de 250 μm que se incubaron en insertos sobre medio definido (control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA) o el complejo albúmina + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico), y se mantuvieron durante 72 horas en cultivo. Entonces se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica con FABP3 (A, B, y C), y GAP43 (D, E y F). Las flechas blancas señalan la localización de células FABP3+ en la SVZ en el caso de la situación control, y en el estriado cerca a la SVZ en presencia de albúmina, y en zonas más internas del estriado y con mayor intensidad, en presencia del complejo albúmina + ácido oleico. Abreviaturas: LMS, corriente migratoria lateral; LV, ventrículo lateral; Str, estriado; SVZ, zona subventricular. Escala 300 μm.



Fig. 33.- Efecto del ácido oleico en la localización de FABP3 y MAP2 en cultivos organotípicos. Se extrajeron los cerebros de fetos de rata a término (P0), se obtuvieron rodajas de 250 μm que se incubaron en insertos sobre medio definido (control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA) o el complejo albúmina 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico), y se mantuvieron durante 72 horas en cultivo. A continuación se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica con MAP2 y FABP3. (A, B, y C) Canal de fluorescencia por separado de MAP2. (D, E y F) Canal de FABP3, y (G, H e I) Fusión de ambos canales. Las flechas blancas indican acúmulos de células FABP3+. Abreviaturas: LMS, corriente migratoria lateral; Str, estriado; SVZ, zona subventricular. Escala 300 μm.



#### Fig. 34.- Efecto del silenciamiento de FABP3 sobre los niveles de expresión de MAP2 y GAP43, en cultivos organotípicos.

Las rodajas de 250 µm de cerebros de fetos a término se transfectaron con NT-siRNA o FABP3-siRNA y se cultivaron en medio definido (Control) suplementado o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72h se extrajeron todas las proteínas y se analizaron por Western-blot FABP3, MAP2, GAP43. (A) Western-blot de las proteínas FABP3, MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B,C, y D) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western-blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje (%) respecto al control NT-siRNA, y son valores medios  $\pm$  SEM (n  $\geq$  4). Análisis estadístico mediante Test *t* Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005. La significatividad de las diferencias entre NT-siRNA y FABP3-siRNA se expresa como # p < 0,05; ## p < 0,01.



Fig. 35.- Efecto del ácido oleico en la migración y la axonogénesis determinada mediante los marcadores de migración, DCX, y de diferenciación axonal, GAP43, en cultivo organotípico. Se extrajeron los cerebros de fetos de rata a término (P0), se obtuvieron rodajas de 250 μm que se sembraron en insertos sobre medio definido (control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA), o el complejo albúmina 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico), y se mantuvieron durante 72 horas en cultivo. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica con el marcardor molecular de migración, DCX (A, B, y C), y el marcador de diferenciación axonal, GAP43 (D, E y F). El marcador DCX en la condición control, marca células migrando a lo largo de la SVZ y la LMS; en presencia de albúmina, marca radialmente desde la SVZ donde su expresión es intensa; y en presencia del complejo albúmina + ácido oleico se acumula en la zona del estriado (véase las flechas blancas indicadas). En los medios suplementados con albúmina y el complejo con oleico, se aprecia un aumento de la fasciculación axónica, así como de su grosor, en la región del estriado, macadas con GAP43, formando ovillos en el estriado y colocalizando (véase flechas azules ) en parte con DCX. Abreviaturas: LMS, corriente migratoria lateral; LV, ventrículo lateral; Str, estriado; SVZ, zona subventricular. Escala

300 µm.



Fig. 36.- Efecto del ácido oleico sobre la localización de la FABP7 y la DCX en cultivos organotípicos. Se extrajeron los cerebros de fetos de rata a término (P0), se obtuvieron rodajas de 250 μm que se incubaron en insertos sobre medio definido (control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA) o el complejo albúmina + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico), y se mantuvieron durante 72 horas en cultivo. Después se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se realizó una doble tinción inmunocitoquímica con FABP7 y DCX. (A, B, y C) La FABP7 en su canal por separado. (D, E y F) La DCX en su canal por separado. (G, H e I) Fusión de ambos canales. Las flechas blancas señalan la localización de células FABP7+ en la SVZ y migrando radialmente hacia el estriado y la LMS. Abreviaturas: LMS, corriente migratoria lateral; LV, ventrículo lateral; Str, estriado; SVZ, zona subventricular. Escala 300 μm.





Las rodajas de 250 µm de cerebros de fetos a término fueron transfectadas con NT-siRNA o FABP7---siRNA y cultivadas en medio definido (Control) suplementado o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72h se extrajeron todas las proteínas y se analizaron por Western-blot FABP3, MAP2, GAP43. (A) Western-blot de las proteínas FABP7, MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B,C, y D) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje (%) respecto al control NT-siRNA, y son valores medios  $\pm$  SEM (n  $\geq$  4). Análisis estadístico mediante Test *t* Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005. La significatividad de las diferencias entre NT-siRNA y FABP7-siRNA se expresa como # p < 0,05; ## p < 0,01.



DCX

GAP43

214

DCX



Fig. 39.- Determinación mediante la técnica de tinción TUNEL de la muerte celular por apoptosis inducida por el silenciamiento de FABP5. Las rodajas de 250 μm de cerebros de fetos a término (PO), fueron tratadas con NT-siRNA

o con FABP5-siRNA y cultivadas en un medio definido suplementado, o no, con BSA al 2%, o con el complejo BSA al 2% y ácido oleico 50  $\mu$ M. Transcurridas 48 h las células fueron fijadas y se realizó la tinción del método TUNEL empleándose yoduro de propidio (IP) para marcar el número total de células por campo, según se ha descrito en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal. Escala 30  $\mu$ m.



#### Fig. 40.- Efecto del silenciamiento de FABP5 sobre la apoptosis celular en rodajas de cultivo organotípico.

Se extrajeron los cerebros de fetos de rata a término (P0), se obtuvieron rodajas de 250 µm que se sembraron en insertos sobre medio definido (control), suplementado o no, con albúmina al 2 % (+BSA), o el complejo albúmina + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico), y se trataron con NT-siRNA o FABP5-siRNA. Los insertos con las rodajas se mantuvieron durante 48 horas en cultivo. Después, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó la tinción inmunocitoquímica del método TUNEL tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. (A) Detalle de la tinción TUNEL para un hemisferio cerebral en la condición +BSA. Fotomicrografía del doble marcaje para TUNEL y yoduro de propidio (IP) en las rodajas en las que se ha silenciado con NT-siRNA o FABP5-siRNA. Escala 200 µm. Abreviaturas: LV, ventrículo lateral; Str, estriado; SVZ, zona subventricular. (B) Cuantificación del porcentaje de células TUNEL+ por campo, siendo analizados 9 campos por condición. Los resultados son valores medios ±SEM (Número de experimientos independientes, n = 3). Las diferencias se cuantificaron mediante el método ANOVA factorial seguido de agrupación por Tukey (p <0,05). Letras idénticas indican diferencias no significativas.



**Fig. 41.- Expresión del RNA de las distintas isoformas de PKC en neuronas y cerebro de rata.** Se extrajo el RNA total tanto de un homogenado de cerebro de rata, como de neuronas cultivadas en un medio definido durante 72 horas. Se analizó por RT-PCR la expresión de los mRNA de las distintas isoformas de las PKCs. Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 1 % (p/v). (Resultados no publicados. Bento-Abreu, A; Tabernero, A; Medina, JM.).



Fig. 42.- Efecto del la inhibición de PKCα en la morfología de neuronas en cultivo primario. Las neuronas se cultivaron en un medio definido suplementado con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo albúmina al 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico). La células fueron tratadas con el inhibidor de PKCα/β, un pseudosutrato miristoilado (P0102. Sigma) a concentraciones finales de 50 μM. Transcurridas 72 horas las células fueron fotografiadas con una cámara de contraste de fases de campo claro acoplada a un microscopio invertido. Escala 50 μm.



# Fig. 43.- Efecto de la inhibición de PKCα/β en la diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico en neuronas en cultivo.

Las neuronas se incubaron en presencia del albúmina al 2 % (+BSA), o del complejo albúmina + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Se añadió al medio el inhibidor de PKC $\alpha/\beta$  a concentración final de 50  $\mu$ M. Transcurridas 72h se extrajeron las proteínas de todas las condiciones y se analizó por Western-blot la expresión de MAP2, GAP43.(A) Western-blot de las proteínas MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B y C) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western-blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje respecto al NT-siRNA (+BSA), y son valores medios  $\pm$  SEM (n  $\ge$  3). El análisis estadístico se realizó mediante el Test *t* Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control (+BSA) se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.La significatividad de las diferencias entre Inhibidor y Control se expresa como ## p < 0,01.



Fig. 44.- Efecto del silenciamiento de PKCα en la morfología de neuronas en cultivo primario. Las neuronas fueron transfectadas con NT-siRNA o PKCα-siRNA y cultivadas en un medio definido suplementado con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72 horas las células fueron fotografiadas con una cámara de contraste de fases de campo claro acoplada a un microscopio invertido. Escala 50 μm.



## Fig. 45.- Efecto del silenciamiento de PKCα sobre el efecto la diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico en neuronas en cultivo.

Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA o PKC $\alpha$ -siRNA y se incubaron en presencia del albúmina al 2 % (+BSA), o del complejo albúmina + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72h se extrajeron las proteínas de todas las condiciones y se analizó por Western-blot la expresión de PKC $\alpha$ , MAP2, GAP43. (A) Western-blot de las proteínas PKC $\alpha$ , MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B,C, y D) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western-blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje respecto al NT-siRNA (+BSA), y son valores medios ± SEM (n ≥ 4). El análisis estadístico se realizó mediante el Test *t* Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control (+BSA) se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005. La significatividad de las diferencias entre NT-siRNA y PKC $\alpha$ -siRNA se expresa como # p < 0,05; ## p < 0,01.



Fig. 46.- Efecto del la inhibición o activación de PKCε en la morfología de neuronas en cultivo primario.

Las neuronas en cultivo primario cultivadas en un medio definido suplementado con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). La células fueron tratadas con el péptido inhibidor de la translocación de PKCe o con su control negativo a concentraciones finales de 50  $\mu$ M (Calbiochem-Merk); o el activador específico de PKCe, DCP-LA, a concentración 50  $\mu$ M (Sigma). Transcurridas 72 horas las células fueron fotografíadas con una cámara de contraste de fases de campo claro acoplada a un microscopio invertido. Escala 50  $\mu$ m.



### Fig. 47.- Determinación de la ausencia de efectos cruzados en el silenciamiento de PKCα con respecto al silencimiento de PKCε en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA y los correspondientes a las dos isoformas de PKC: PKCαsiRNA y PKCε-siRNA, y se incubaron en presencia del albúmina al 2 % (+BSA), o del complejo albúmina + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72h se extrajeron las proteínas de todas las condiciones y se analizó por Western Blot la expresión de PKCα, PKCε y MAP2, junto con GAPDH como control de carga. (A) Western-blot de las proteínas MAP2, PKCα, y GAPDH. (B) Western-blot de las proteínas MAP2, PKCε, y GAPDH.



### Fig. 48.- Efecto de la inhibición o la activación de PKCɛ sobre la diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico en neuronas en cultivo.

Las neuronas se incubaron en presencia del albúmina al 2 % (+BSA), o del complejo albúmina 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). Se añadió el péptido inhibidor de la translocación de PKCɛ o el activador, DCP-LA (Sigma), ambos a concentración final de 50  $\mu$ M. Transcurridas 72h se extrajeron las proteínas de todas las condiciones y se analizó por Western-blot la expresión de los marcadores de diferenciación MAP2, GAP43. (A) Western-blot de las proteínas MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B y C) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western-blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje respecto la condición control (+BSA), y son valores medios ± SEM (n  $\ge$  3). El análisis estadístico se realizó mediante el Test *t* Student. La significatividad de las diferencias entre Inhibidor y Control se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. La significatividad de las diferencias entre el Activador y el Control se expresa como  $\Delta$  p < 0,05.



Fig. 49.- Efecto del silenciamiento de PKCε en la morfología de neuronas en cultivo primario. Las neuronas en cultivo primario fueron transfectadas con un NT-siRNA ó PKCε-siRNA y cultivadas en un medio definido suplementado con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50 μM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72 horas las células fueron fotografiadas con una cámara de contraste de fases de campo claro acoplada a un microscopio invertido. Escala 50 μm.



# Fig. 50.- Efecto del silenciamiento de PKCɛ sobre el efecto la diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico en neuronas en cultivo.

Las neuronas se transfectaron con NT-siRNA o PKC $\varepsilon$ -siRNA y se incubaron en presencia del albúmina al 2 % (+BSA), o del complejo albúmina + ácido oleico 50 µM (+BSA +Oleico). Transcurridas 72h se extrajeron las proteínas de todas las condiciones y se analizó por Western Blot la expresión de PKC $\varepsilon$ , MAP2, GAP43. (A) Western-blot de las proteínas PKC $\varepsilon$ , MAP2, GAP43, y GAPDH. Las películas fueron escaneadas y se cuantificaron las bandas. (B,C, y D) Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western-blot. Los valores se normalizaron frente a GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje (%) respecto al NT-siRNA (+BSA), y son valores medios ± SEM (n ≥ 4). Análisis estadístico mediante Test *t* Student. La significatividad de las diferencias respecto de la condición control (+BSA) se expresa como \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. La significatividad de las diferencias entre NT-siRNA y PKC $\varepsilon$ --siRNA se expresa como # p < 0,05; ## p < 0,01.
MATERIAL Y MÉTODOS PLAN DE TRABAJO INTRODUCCIÓN

DISCUSIÓN

## ≻ 5.- DISCUSIÓN

INTRODUCCIÓN
PLAN DE TRABAJO
MATERIAL Y MÉTODOS
RESULTADOS
Discusión
Conclusiones
BIBLIOGRAFÍA

La albúmina es la proteína sérica de mayor abundancia en el plasma y líquido cefalorraquídeo del cerebro en la etapa perinatal (Dziegielewska et al. 1981a). De hecho, su concentración llega a ser diez veces superior a los niveles que presenta en adulto, siendo especialmente alta el primer día de vida postnatal y disminuyendo progresivamente, hasta alcanzar los valores del adulto, en torno al día 20 postnatal (Habgood et al. 1992; Velasco et al. 2003). La albúmina es una proteína encargada del transporte de múltiples sustancias a nivel extracelular, destacando en el transporte de ácidos grasos libres (Spector 1986; Spector et al. 1969). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que los astrocitos son capaces de sintetizar ácido oleico en respuesta a la albúmina en el medio extracelular (Tabernero et al. 2002a; Tabernero et al. 2001a). El mecanismo de síntesis del ácido oleico, comienza cuando la albúmina es internalizada a través de un sistema caveolina-dependiente, que utiliza a la megalina como receptor y en el que participa el elemento DAB1 (Bento-Abreu et al. 2009; Bento-Abreu et al. 2008). A continuación, la albúmina sufre un proceso de transcitosis que incluye el paso de la albúmina por el retículo endoplasmasmático y por el complejo de Golgi (Medina and Tabernero 2002; Tabernero et al. 2002c). Una vez en el retículo, la albúmina promueve la hidrólisis de SREBP-1 (ahora denominado también SREBF-1), factor de transcripción que induce la estearil-CoA desaturasa-1 (SCD-1), enzima clave y limitante de la síntesis de ácido oleico (Tabernero et al. 2001b; Tabernero et al. 2002c; Velasco et al. 2003). Una vez sintetizado, el ácido oleico es liberado al medio extracelular, formando el complejo albúmina + ácido oleico. Este complejo albúmina + ácido oleico, posteriormente puede se endocitado por neuronas, induciendo la expresión de proteínas marcadoras de diferenciación dendrítica y axonal, MAP2 y GAP43, respectivamente (Tabernero et al. 2001b; Tabernero et al. 2002c). La vía de señalización del ácido oleico en las neuronas incluye la activación del factor de transcripción NeuroD (Rodriguez-Rodriguez et al. 2004) y de la proteína kinasa C (PKC) (Granda et al. 2003), y requiere del PPAR $\alpha$ , que es translocado al núcleo (Bento-Abreu et al. 2007). El ácido oleico promueve la agregación neuronal en grupos que emiten axones y dendritas, formando una red similar a la materia blanca y la materia gris del sistema nervioso central (Tabernero et al. 2001b).

La albúmina se encuentra presente en la zona subventricular y en el paréquima cerebral circundante durante el primer día de vida postanatal, y se mantiene hasta el día tercero (Polo-Hernandez et al. 2010). En este periodo, la albúmina coincide en la SVZ con la estearil-CoA desaturasa-1 (SCD-1). La SCD-1 presenta su nivel más alto en el primer día de vida postnatal (Velasco et al. 2003), coincidiendo con el pico máximo de ácido oleico (Polo-Hernandez et al. 2010). Además, la megalina (Bento-Abreu et al. 2008), así como las caveolinas 1 y 2, todas ellas, están presentes también en las células que rodean el ventrículo lateral en el período perinatal. De hecho, en cultivos organotípicos se ha observado que la albúmina promueve un aumento de la GAP43 y la fasciculación axonal en el estriado (Polo-Hernandez et al. 2010).

Todos estos antecedentes, nos llevaron a investigar la posible participación de la familia de las FABPs presentes en el Sistema Nervioso Central en el efecto neurotrófico del ácido oleico.

En explantes de la SVZ, se ha observado un aumento de las células GAP43+ que migran en presencia de albúmina, lo que se corresponde con el aumento de la fasciculación axonal en la región del estriado, en cultivos organotípicos de rodajas coronales en las mismas circunstancias (Polo-Hernandez et al. 2010).

Nuestro primer objetivo fue determinar la localización de las FABPs presentes en el Sistema Nervioso Central en el cerebro en desarrollo. Nuestros resultados muestran que la FABP3 se expresa el día P1 en la SVZ y, débilmente en el estriado, en donde su marcaje se hace intenso en el día P3. Los estudios en cultivos primarios indican que la FABP3 no está presente en astrocitos, aunque sí en neuronas, dónde su expresión aumenta durante la diferenciación neuronal. En cultivos organotípicos su expresión se intensifica en el estriado por la presencia del factor neurotrófico ácido oleico, colocalizando con los fascículos axonales en crecimiento (GAP43+) y con las dendritas que están diferenciándose (MAP2+). Estos resultados son consecuentes con la bibliografía, que indica que la FABP3 es característica de neuronas adultas o maduras, y su expresión va en incremento después del nacimiento (Liu et al. 2010; Veerkamp et al. 2000; Veerkamp et al. 1999; Veerkamp and Zimmerman 2001).

La FABP5 se expresa en células localizadas en la SVZ y regiones periventriculares, alcanzando el comienzo de la corriente migratoria lateral en los días P1 y P3. En neuronas en cultivo primario su expresión es alta y constante, a diferencia de los astrocitos en los que se encuentra a niveles más bajos. En cultivos organotípicos su expresión se mantiene localizada de manera intensa en la SVZ y zona periventricular y de forma menos intensa en el estriado. Estos resultados coinciden con estudios previos que señalan su expresión no solo en "neuronas en estadios tempranos o durante la etapa perinatal", sino que también se expresa en células de naturaleza glial (Alexandre-Gouabau et al. 2012; De Leon et al. 1996; Matsumata et al. 2012; Veerkamp et al. 1999).

Por último, la FABP7 se expresa en la SVZ a P1 y comienza a extenderse radialmente por el estriado a P3. Asimismo, está presente en neuronas en cultivo primario en estadios tempranos, pero su expresión disminuye con la diferenciación. En astrocitos en cultivo se encuentra marcando de manera intensa tanto algunas células GFAP positivas como algunas negativas. En cultivos organotípicos se localiza en la zona que rodea al ventrículo lateral, pero en presencia del factor neurotrófico ácido oleico aumenta su expresión y se localiza en el estriado, radialmente al ventrículo. Todo ello coincide con lo descrito para las células de la glía radial (D'Amico et al. 2011; Podgornyi and Aleksandrova 2009) y vendría a indicar que el factor neurotrófico ácido oleico disminuye la expresión de FABP7 en neuronas pero incrementa el número de células FABP7+.

Es interesante destacar la relación inversa entre los niveles de la FABP3 y la FABP7, observada preferentemente en neuronas en cultivo, así como los cambios en este balance promovidos por el factor neurotrófico ácido oleico. Así, en neuronas en cultivo primario, mientras que la FABP3 aumenta a consecuencia de la presencia de ácido oleico, la FABP7 disminuye. De hecho, se reproduce lo descrito en la bibliografía, en la que se indica que la FABP3 es propia de neuronas adultas, y la FABP7, aunque es un marcador preferentemente de células de la glía radial, también lo es de progenitores neurales (Allen

et al. 2000; Banaszak et al. 1994; Feng et al. 1994; Feng and Heintz 1995; Godbout et al. 1998; Hunt et al. 1986; Owada 2008; Owada et al. 1996a; Owada et al. 1996b; Veerkamp et al. 1999). Además, los resultados obtenidos en presencia de ácido oleico indican que el desbalance entre la FABP3 y la FABP7 se adelanta, siendo muy similar el aumento de la FABP3 al de la GAP43. Estos resultados vendrían a reforzar la idea de que el acido oleico actúa como un factor neurotrófico responsable del cambio hacia un fenotipo neuronal diferenciado y, así mismo, señalaría al ácido oleico como uno de los responsables de la inducción de la FABP3. Nuestros resultados también corroboran lo descrito en la bibliografía en relación a la expresión de las FABPs en células gliales, que indica que la FABP3 no se expresa en células gliales, pero sí lo hace la FABP7 (Hartfuss et al. 2001; Liu et al. 2010). Además, de acuerdo con lo descrito recientemente (Liu et al. 2010; Matsumata et al. 2012; Owada 2008), también la FABP5, aunque sea en niveles bajos, se expresa en astrocitos de más de 21 días de cultivo.

Nuestros resultados muestran que en neuronas en cultivo, la FABP3 se acumula en la base de las neuritas, en donde se ha descrito que se produce la incorporación del ácido oleico a las membranas neuronales (Velasco et al. 2003). Así mismo es una zona con una gran presencia de mitocondrias, con las cuales la FABP3 está relacionada ya que colocaliza con el marcador Mitotracker. Este hecho es significativo, puesto que nuestros resultados también muestran que el ácido oleico aumenta los valores registrados por el método de MTT, así como el número de mitocondrias en dichas neuronas teñidas con Mitotracker. Estas zonas de acúmulo mitocondrial, son zonas de gran demanda energética durante la diferenciación neuronal y la formación de las neuritas, y también durante la consolidación de las conexiones neuronales. En la etapa postnatal temprana, este último hecho es importante en el estriado después de que se hayan producido las primeras oleadas migratorias durante la etapa prenatal. Estos resultados sugieren que el ácido oleico podría estar induciendo una diferenciación también a nivel mitocondrial y que FABP3 podría estar implicada en su transporte e incorporación a su destino en estas zonas. Además, los niveles de expresión de la FABP3 se incrementan de forma paralela a los de la GAP43, y ambas aumentan en presencia del complejo álbúmina + ácido oleico. Es más, existe una colocalización de la FABP3 y la GAP43 a lo largo del axón neuronal, tanto en neuronas en cultivo como en cultivos organotípicos, en las células diana del ácido oleico en el estriado, las cuales muestran una fasciculación axonal importante. Para confirmar la relación de la FABP3 con el efecto neurotrófico del ácido oleico se silenció FABP3. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de la FABP3 impide la diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico, observándose neuronas indiferenciadas con muy pocas neuritas de grosor y longitud reducida. El silenciamiento de la FABP3 redujo los niveles de expresión tanto de MAP2 como de GAP43. De hecho, el silenciamiento de la FABP3 impidió la fasciculación axonal en los cultivos organotípicos. Todos estos hechos corroboran la participación de esta proteína, la FABP3, en el transporte intracelular del ácido oleico en neuronas para llevar a cabo su efecto neurotrófico.

Nuestros resultados muestran que la FABP5 se localiza durante los primeros días de vida postnatal en la SVZ y de manera difusa también en el estriado. En neuronas, como ya hemos indicado, sus niveles son altos y constantes, y su silenciamiento en neuronas en

cultivo primario u organotípicos induce la muerte neuronal por apoptosis, como nos muestran los resultados de las tinciones de Anexina V y de TUNEL. Así mismo, la expresión de la FABP5 en cultivos organotípicos, incluso en presencia de albúmina y de ácido oleico, queda restringida a las células de la SVZ y del comienzo de la corriente migratoria lateral desde el cuerpo callososo. En su conjunto, estos resultados podrían indicar que la FABP5 juega un papel muy importante en los progenitores neuronales durante este periodo del desarrollo, ya que su silenciamiento o una disminución prematura de sus niveles de expresión impide la viabilidad de estas células. En este sentido, recientemente, se ha mostrado la existencia de una disminución de la proliferación de los progenitores neuronales postnatales en ratones KO para FABP5, FABP7 o doble KO para ambas proteínas, lo que señala la importancia de ambas proteínas en la supervivencia de los progenitores neuronales (Matsumata et al. 2012). Así mismo, el aumento de FABP5 en presencia del factor neurotrófico ácido oleico, su colocalización con la albúmina en neuronas y el hecho de que su silenciamiento prevenga el efecto neurotrófico del ácido oleico nos hace sugerir que la FABP5 pudiese también estar implicada en el proceso de captación del ácido oleico por las neuronas.

Los experimentos de cultivos organotípicos con rodajas coronales de P0, muestran que la presencia de albúmina induce la expresión de FABP7 en células GAP43- que se alejan radialmente de la SVZ, recorriendo toda la pared del ventrículo. Este marcaje es similar aunque más intenso, que el que se muestra en los cortes de P3. Estos datos sugieren un marcaje o bien de progenitores, o bien de las células de la glía radial, caracterizada por la expresión del marcador conocido como BLBP, que es el nombre primitivo de la FABP7. Otra posibilidad es que el ácido oleico induzca el aumento del número células FABP7+, en la región adyacente al estriado. Por otra parte, el silenciamiento de la FABP7 impide la acción neurotrófica del ácido oleico, indicando que la FABP7 interviene en la vía de señalización del ácido oleico en neuronas. En base a los resultados de su colocalización del ácido oleico. En este sentido, algunos autores han mostrado la existencia de una interacción directa de la FABP7 con los PPAR, sugiriéndose un mecanismo de control enzimático por regulación de sustrato libre ejercido por parte de las FABPs (Hostetler et al. 2008; Mita et al. 2010).

El silenciamiento de FABP7 impide el efecto neurotrófico del ácido oleico también en cultivos organotípicos. En este caso, la acción podría ser doble, actuando a nivel de la neurona por bloqueo de la señal neurotrófica y, por otra, a nivel de la glía radial impidiendo su desarrollo. Como resultado, se reduciría la síntesis de ácido oleico en las células gliales como respuesta a la llegada de la albúmina desde el ventrículo y, posiblemente, se impediría la migración radial de los progenitores hacia el estriado inducida por el ácido oleico. No podemos descartar, no obstante, que el silenciamiento de FABP7 en neuronas además de bloquear la vía de señalización del ácido oleico, impida la diferenciación neuronal de un modo más amplio, por lo que la ausencia de FABP7 durante este periodo actúe como señal inhibitoria de la diferenciación de las neuronas.

El ácido oleico promueve el aumento de células FABP7+ radialmente al ventrículo y de células FABP3+ en el estriado donde coincide con la fasciculación axonal identificada por GAP43 en cultivos organotípicos. A estos hechos habría que sumar un aumento del marcaje de la DCX, el marcador de células en migración, desde las zonas en las que hay más marcaje con FABP7+, en la SVZ, hasta las áreas de diferenciación axonal marcadas con GAP43 y FABP3, correspondientes al estriado. Es interesante resaltar que la localización de DCX coincide en regiones, aunque no en las mismas células, con el marcaje de la FABP7. Se puede sugerir, por consiguiente, que el aumento de la glía radial (FABP7+) y la migración de las células (DCX+) causados por la presencia del ácido oleico se producirían de forma simultánea aunque empleando un mecanismo que puede ser sinérgico o secuencial. Este hecho sugiere que además de inducir la diferenciación neuronal, el ácido oleico actuaría previamente estimulando la migración de los progenitores neuronales, bien de una forma directa, o bien indirectamente sobre las células que actúan como andamiaje para la migración de las neuronas, es decir, la glía radial, produciendo un efecto sinérgico.

En este sentido, como ya se ha señalado al inicio de la discusión, nuestro grupo de investigación ha mostrado que el ácido oleico promueve el agrupamiento de las neuronas en cultivo (Tabernero et al. 2001b), así como la migración de las células de la SVZ en explantes (Polo-Hernandez 2009). Todos estos datos, junto con el aumento de los niveles de DCX en presencia del complejo albúmina + ácido oleico en cultivos de neuronas (Tello-Hernandez 2008), sugieren que el ácido oleico induce la migración radial de los progenitores neuronales previamente al aumento de los niveles de los marcadores de diferenciación. A la vista de los resultados obtenidos con la FABP5, sería interesante estudiar también el posible aumento de la migración tangencial hacia el bulbo olfatorio.

Nuestros datos corroboran el efecto del ácido oleico sobre el aumento del marcador de diferenciación dendrítica, MAP2, observado previamente en neuronas en cultivo primario, y ahora detectado en cultivos organotípicos. En efecto, los niveles de expresión de la MAP2 aumentan en presencia de albúmina en cultivos organotípicos y disminuyen tras el silenciamiento de las FABPs. Su marcaje inmunohistoquímico aparece disperso, aunque intenso por todo el estriado, dando una idea del aumento de la arborización neurítica de las neuronas en dicha zona. Su localización en el estriado es coincidente con las fasciculaciones de GAP43, lo cual reproduciría *ex vivo*, lo observado previamente en nuestros cultivos de neuronas *in vitro*. Además, estos datos reforzarían el papel del ácido oleico como un factor diferenciador responsable de la maduración y consolidación de las conexiones estriatales.

Finalmente, nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de la cascada de señalización del ácido oleico, en la diferenciación neuronal. En este sentido se ha estudiado la participación de las distintas isoformas de la proteína kinasa C (PKC), la cual estaba implicada en dicha vía, tal y como se expuso al inicio de la discusión (Granda et al. 2003). Nuestros resultados han puesto de manifiesto la presencia mayoritaria de dos isoformas, la PKCα y la PKCε, en neuronas en cultivo primario por lo que se ha analizado la posible participación de ambas isoformas en la cascada de señalización del ácido oleico.

Hay que mencionar que la PKC $\alpha$  es una de las formas más abundantes y ubicuas de la PKC. Se sabe que puede estar implicada en la reorganización de microtúbulos, en los mecanismos de fosforilación de MAP2c, en los procesos de migración, en la fosforilación de GAP43, así como en la supervivencia neuronal (Battaini et al. 1994b; Gallicano et al. 1997; Khan et al. 1993; Perrone-Bizzozero et al. 1993; Schaechter and Benowitz 1993; Ventura and Maioli 2001; Zeidman et al. 2002). Pues bien, el uso de inhibidores de la PKC $\alpha$ , así como su silenciamiento redujo la expresión de los marcadores de diferenciación axonal y dendrítica, GAP43 y MAP2, observándose como las neuronas presentaban una morfología indiferenciada y en algún caso morían. Además, su inhibición o silenciamiento suprimen el efecto del ácido oleico sobre la expresión de estas proteínas. Por otro lado, los niveles de la PKC $\alpha$  aumentan en presencia del ácido oleico en neuronas en cultivo primario. Nuestros datos no indican un cambio en la movilidad celular, manteniéndose cierta agregación celular, si bien es cierto que disminuye el número y grosor de las neuritas y su silenciamiento impide la diferenciación promovida por el ácido oleico.

De forma similar, el estudio de la PKCε, mostró la participación de esta isoforma en la vía de señalización del ácido oleico. Así, tanto la inhibición como el silenciamiento de PKCε previenen el efecto del ácido oleico. Además, la activación específica de PKCε muestra un aumento del número de neuritas y de los niveles de MAP2, pero no de GAP43 y este efecto es sinérgico con el del ácido oleico. Al igual que ocurría con la PKCα, los niveles de PKCε aumentan en presencia del complejo albúmina + ácido oleico. Estos datos podrían relacionar preferentemente la activación de la PKCε con la formación de nuevas dendritas. Así, la PKCε participa en la extensión y retirada del cono de crecimiento en un mecanismo comandado por el ácido araquidónico y los eicosanoides (Lopez-Nicolas et al. 2006; Schmitt and Meves 1993), lo cual podría relacionarse con un mecanismo similar mediado por el ácido oleico.

Discusión

MATERIAL Y MÉTODOS PLAN DE TRABAJO INTRODUCCIÓN

RESULTADOS

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

## ≻ 6.- CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN	
PLAN DE TRABAJO	
MATERIAL Y MÉTODOS	
RESULTADOS	
Discusión	
CONCLUSIONES	
BIBLIOGRAFÍA	

1.- La FABP3 se localiza en neuronas, incluidas las del estriado que son diana del ácido oleico, y su expresión aumenta con la diferenciación neuronal. Por su parte, la FABP5 se expresa en neuronas y astrocitos de la VZ y la SVZ, y su expresión no está relacionada con la diferenciación. La FABP7 se localiza fundamentalmente en la glía radial en la SVZ y el estriado, aunque también está presente en progenitores neuronales en los que disminuye su expresión conforme se diferencian.

2.- La FABP3 se concentra en la base de las neuritas, en las zonas con mayor acúmulo de mitocondrias. Además, colocaliza con GAP43 en algunos axones de las neuronas en cultivo, así como de las neuronas del estriado. Dado que estas células son la diana del efecto axonogénico del complejo albúmina + ácido oleico, se puede sugerir que FABP3 puede estar relacionada con el transporte intracelular del ácido oleico en las neuronas del estriado.

3.- La presencia del complejo albúmina + ácido oleico induce un aumento de la expresión de FABP7, intensificándose su marcaje en células GAP43 negativas, adyacentes a la SVZ y localizadas radialmente hacia el estriado. En esta zona es donde se acumulan las fasciculaciones axonales promovidas por el complejo albúmina + ácido oleico. Este hecho sugiere que el ácido oleico promueve el aumento de la glía radial o células gliales adyacentes a la SVZ. Así mismo, los resultados de los estudios en neuronas, su colocalización con PPAR $\alpha$  y el hecho de que su silenciamiento en neuronas y organotípicos impida el efecto del ácido oleico, sugieren que la FABP7 interviene en la cascada de diferenciación neuronal.

4.- La FABP5 colocaliza con la albúmina cuando ésta es captada por las neuronas, lo que sugiere una interacción de ambas proteínas en el proceso de internalización del ácido oleico. Su silenciamiento induce la muerte neuronal por apoptosis, tanto en las neuronas en cultivo primario como en organotípicos. Además, la FABP5 se localiza mayoritariamente en la SVZ y en la corriente migratoria lateral. Todo ello sugiere que la FABP5 interviene en la supervivencia de las células progenitoras y de los neuroblastos generados postnatalmente.

5.- El complejo albúmina + ácido oleico promueve el aumento de la expresión del marcador de migración neuronal DCX, en zonas adyacentes a la SVZ y en el estriado. Estos resultados, junto a los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación sugieren que el complejo albúmina + oleico podría estar involucrado en la migración radial de los progenitores de la SVZ hacia el estriado.

6.- La presencia del complejo albúmina + ácido oleico en cultivos organotípicos induce la expresión del marcador de diferenciación dendrítica MAP2 en la región del estriado, tal y como se ha mostrado para la diferenciación axonal, mediante el marcador GAP43. Estos resultados confirman *ex vivo* el efecto sobre la diferenciación neuronal promovida por el complejo albúmina + ácido oleico.

7.- Las isoformas de PKC más abundantes en neuronas son PKCα y PKCε. Ambas incrementan sus niveles de expresión en presencia del complejo albúmina + ácido oleico. El silenciamiento o inhibición de cada una de las isoformas, aunque no impide la agregación neuronal, suprime el incremento de los marcadores MAP2 y GAP43 observados en presencia del complejo albúmina + ácido oleico. Estos resultados sugieren que ambas isoformas participan en la diferenciación neuronal promovida por el complejo albúmina + ácido oleico.

CONCLUSIÓN FINAL: La albúmina induce el aumento de células FABP7+ (posiblemente células de la glía radial) que se desarrollan radialmente desde la SVZ hacia el estriado, a la vez que promueve la migración de los progenitores neuronales y su diferenciación en el estriado. Este efecto está posiblemente mediado por el ácido oleico, que es transportado por la albúmina a las neuronas, donde es captado por la FABP5 y conducido al núcleo donde interacciona con el PPAR $\alpha$ , el cual induce la diferenciación neuronal . Así mismo, en la diferenciación neuronal interviene la FABP3, posiblemente transportando ácido grasos para la mitocondriogénesis. Por último, tanto la PKC $\alpha$  como la PKC $\varepsilon$  intervienen en la cadena de señalización del ácido oleico ya que su silenciamiento o inhibición reduce de manera significativa el efecto neurotrófico del ácido oleico.

RESULTADOS MATERIAL Y MÉTODOS PLAN DE TRABAJO INTRODUCCIÓN

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

ICLUSIONES BIBLIOGRA
Con
Discusión
RESULTADOS
MATERIAL Y MÉTODOS
PLAN DE TRABAJO
INTRODUCCIÓN

- Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A. 1999. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. Biochimica et Biophysica Acta 1441(1):4-13.
- Adida A, Spener F. 2006. Adipocyte-type fatty acid-binding protein as inter-compartmental shuttle for peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists in cultured cell. Biochimica et Biophysica Acta 1761(2):172-81.
- Alberts B. JA, Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2004. Biología Molecular de la Célula. Barcelona: Ediciones Omega S.A.
- Alexandre-Gouabau MC, Bailly E, Moyon TL, Grit IC, Coupe B, Le Drean G, Rogniaux HJ, Parnet P. 2012. Postnatal growth velocity modulates alterations of proteins involved in metabolism and neuronal plasticity in neonatal hypothalamus in rats born with intrauterine growth restriction. J Nutr Biochem 23(2):140-52.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. Journal of Comparative Neurology 124(3):319-35.
- Allen GW, Liu JW, De Leon M. 2000. Depletion of a fatty acid-binding protein impairs neurite outgrowth in PC12 cells. Brain Research Molecular Brain Research 76(2):315-24.
- Angevine JB, Jr., Sidman RL. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. Nature 192:766-8.
- Anversa P, Kajstura J. 1998. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. Circulation Research 83(1):1-14.
- Arias C, Becerra-Garcia F, Arrieta I, Tapia R. 1998. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus in vivo. Experimental Neurology 153(2):242-54.
- Avila J, Dominguez J, Diaz-Nido J. 1994a. Regulation of microtubule dynamics by microtubuleassociated protein expression and phosphorylation during neuronal development. International Journal of Developmental Biology 38(1):13-25.
- Avila J, Ulloa L, Gonzalez J, Moreno F, Diaz-Nido J. 1994b. Phosphorylation of microtubuleassociated proteins by protein kinase CK2 in neuritogenesis. Cellular & Molecular Biology Research 40(5-6):573-9.
- Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. 1994. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. Advances in Protein Chemistry 45:89-151.
- Barbin G, Pollard H, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. 1993. Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. Neuroscience Letters 152(1-2):150-4.
- Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D, Jr., Dorsa DM. 1987. Insulin in the brain. Annu Rev Physiol 49:335-47.
- Bass NM, Raghupathy E, Rhoads DE, Manning JA, Ockner RK. 1984. Partial purification of molecular weight 12 000 fatty acid binding proteins from rat brain and their effect on synaptosomal Na+-dependent amino acid uptake. Biochemistry 23(26):6539-44.
- Battaini F, Garbillo G, Bergamaschi S, Parenti M, Wetsel WC, Govoni S, Trabucchi M. 1994a. Regulation of protein kinase C in NG108-15 cell differentiation. Biochem Biophys Res Commun 201(1):135-42.
- Battaini F, Pascale A, Lucchi L, Racchi M, Bergamaschi S, Parenti M, Wetsel WC, Govoni S, Trabucchi M. 1994b. Expression and regulation of calcium-independent protein kinase C in NG 108-15 cell differentiation. Biochem Biophys Res Commun 203(3):1423-31.

- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. 2006. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. European Journal of Neuroscience 23(1):83-93.
- Bayer S. 1995. Neurogenesis and Neuronal Migration. In: G P, editor. The Rat Nervous System. Sidney: Academic Press. p 1041-1076.
- Bayer SA. 1985. The development of the central nervous system. In: Wiggins R.C. MDW, Enna S.J., editor. Development Neurochemistry. Austin: University of Texas Press. p 18-56.
- Bayer SA, Altman J. 1991. Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. Neuroscience 45(2):391-412.
- Bayer SA, Wills KV, Triarhou LC, Ghetti B. 1995. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. Experimental Brain Research 105(2):191-9.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K and others. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 114(6):763-76.
- Bennett E, Stenvers KL, Lund PK, Popko B. 1994. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel fatty acid binding protein from rat brain. Journal of Neurochemistry 63(5):1616-24.
- Benowitz LI, Routtenberg A. 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. Trends in Neurosciences 20(2):84-91.
- Bento-Abreu A, Tabernero A, Medina JM. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptoralpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. Journal of Neurochemistry 103(3):871-81.
- Bento-Abreu A, Velasco A, Polo-Hernandez E, Lillo C, Kozyraki R, Tabernero A, Medina JM. 2009. Albumin endocytosis via megalin in astrocytes is caveola- and Dab-1 dependent and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. Journal of Neurochemistry 111(1):49-60.
- Bento-Abreu A, Velasco A, Polo-Hernandez E, Perez-Reyes PL, Tabernero A, Medina JM. 2008. Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. Journal of Neurochemistry 106(3):1149-59.
- Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzel AV, Banaszak LJ. 1997. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. Annual Review of Nutrition 17:277-303.
- Bhattacharya AA, Grune T, Curry S. 2000. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. J Mol Biol 303(5):721-32.
- Blakemore C, Hague B. 1972. Evidence for disparity detecting neurones in the human visual system. J Physiol 225(2):437-55.
- Bleck B, Hohoff C, Binas B, Rustow B, Dixkens C, Hameister H, Borchers T, Spener F. 1998. Cloning and chromosomal localisation of the murine epidermal-type fatty acid binding protein gene (Fabpe). Gene 215(1):123-30.
- Bonni A, Ginty DD, Dudek H, Greenberg ME. 1995. Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. Mol Cell Neurosci 6(2):168-83.
- Bourre JM, Dumont OS, Piciotti MJ, Pascal GA, Durand GA. 1992. Dietary alpha-linolenic acid deficiency in adult rats for 7 months does not alter brain docosahexaenoic acid content, in contrast to liver, heart and testes. Biochim Biophys Acta 1124(2):119-22.

- Bozoyan L, Khlghatyan J, Saghatelyan A. 2012. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. Journal of Neuroscience 32(5):1687-704.
- Brodersen R, Andersen S, Vorum H, Nielsen SU, Pedersen AO. 1990. Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. European Journal of Biochemistry 189(2):343-9.
- Brown NA, Wilson AG, Bridges JW. 1982. Chain length dependency of fatty acid and carbamate binding to serum albumin. Biochem Pharmacol 31(24):4019-29.
- Bulloch AG. 1987. Somatostatin enhances neurite outgrowth and electrical coupling of regenerating neurons in Helisoma. Brain Research 412(1):6-17.
- Campbell K. 2005. Cortical neuron specification: it has its time and place. Neuron 46(3):373-6.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ. 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. Nat Genet 36(8):827-35.
- Carey E.M. 1982. The biochemistry of fetal brain development and myelination. In: C.T. J, editor. Biochemical Development of the Fetus and Neonate. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. p 287-336.
- Cattaneo E, McKay R. 1990. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. Nature 347(6295):762-5.
- Caviness JVS. 1989. Normal development of cerebral neocortex. In: A. EPyM, editor. Developmental Neurobiology. New York: Vevey, Raven Press. p 1-10.
- Caviness VS, Jr., Takahashi T. 1995. Proliferative events in the cerebral ventricular zone. Brain Dev 17(3):159-63.
- Cistola DP, Sacchettini JC, Banaszak LJ, Walsh MT, Gordon JI. 1989. Fatty acid interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in Escherichia coli. A comparative 13C NMR study. Journal of Biological Chemistry 264(5):2700-10.
- Cogram P, Hynes A, Dunlevy LP, Greene ND, Copp AJ. 2004. Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol. Hum Mol Genet 13(1):7-14.
- 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(3):302-11.
- Corbalan-Garcia S, Gomez-Fernandez JC. 2006. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. Biochim Biophys Acta 1761(7):633-54.
- Corbin JG, Nery S, Fishell G. 2001. Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. Nat Neurosci 4 Suppl:1177-82.
- Cowan WM. 1987. Desarrollo del cerebro. El Cerebro (Hubel DH),. Barcelona: Prensa Científica p69-81.
- Cowen WF, Heydrick FP. 1972. Incorporation of C 18 polyunsaturated fatty acids into L cell phospholipids under normal conditions and during infection with Venezuelan equine encephalitis virus. Experimental Cell Research 72(2):354-60.
- Crepel F, Jaillard D. 1991. Pairing of pre- and postsynaptic activities in cerebellar Purkinje cells induces long-term changes in synaptic efficacy in vitro. J Physiol 432:123-41.
- Curry S, Brick P, Franks NP. 1999. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. Biochim Biophys Acta 1441(2-3):131-40.
- Chen Y, Tian Q. 2011. The role of protein kinase C epsilon in neural signal transduction and neurogenic diseases. Front Med 5(1):70-6.

- Chiaramello A, Neuman T, Peavy DR, Zuber MX. 1996. The GAP-43 gene is a direct downstream target of the basic helix-loop-helix transcription factors. Journal of Biological Chemistry 271(36):22035-43.
- Chmurzynska A. 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. Journal of Applied Genetics 47(1):39-48.
- D'Amico LA, Boujard D, Coumailleau P. 2011. Proliferation, migration and differentiation in juvenile and adult Xenopus laevis brains. Brain Research 1405:31-48.
- Dani JW, Armstrong DM, Benowitz LI. 1991. Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. Neuroscience 40(1):277-87.
- de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. 1996a. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. Journal of Neuroscience 16(19):6146-56.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. 1996b. Early olfactory fiber projections and cell migration into the rat telencephalon. Int J Dev Neurosci 14(7-8):853-66.
- de Castro F, Hu L, Drabkin H, Sotelo C, Chedotal A. 1999. Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. Journal of Neuroscience 19(11):4428-36.
- de la Torre-Ubieta L, Bonni A. 2011. Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain. Neuron 72(1):22-40.
- De Leon M, Welcher AA, Nahin RH, Liu Y, Ruda MA, Shooter EM, Molina CA. 1996. Fatty acid binding protein is induced in neurons of the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. Journal of Neuroscience Research 44(3):283-92.
- DeDiego I, Smith-Fernandez A, Fairen A. 1994. Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. European Journal of Neuroscience 6(6):983-97.
- DeFelipe J. 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. Journal of Chemical Neuroanatomy 14(1):1-19.
- DeFelipe J, Farinas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. Progress in Neurobiology 39(6):563-607.
- Dehay C, Kennedy H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. Nature Reviews Neuroscience 8(6):438-50.
- Desai A, Mitchison TJ. 1997. Microtubule polymerization dynamics. Annual Review of Cell & Developmental Biology 13:83-117.
- Dicicco-Bloom E, Lu N, Pintar JE, Zhang J. 1998. The PACAP ligand/receptor system regulates cerebral cortical neurogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences 865:274-89.
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. Early Hum Dev 3(1):79-83.
- Doetsch F. 2003. The glial identity of neural stem cells. Nat Neurosci 6(11):1127-34.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(20):11619-24.
- Ducibella T, Kurasawa S, Duffy P, Kopf GS, Schultz RM. 1993. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. Biology of Reproduction 48(6):1251-7.

- Dziegielewska KM, Evans CA, Lai PC, Lorscheider FL, Malinowska DH, Mollgard K, Saunders NR. 1981a. Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal rats during development. Developmental Biology 83(1):193-200.
- Dziegielewska KM, Evans CA, Lorscheider FL, Malinowska DH, Mollgard K, Reynolds ML, Saunders NR. 1981b. Plasma proteins in fetal sheep brain: blood-brain barrier and intracerebral distribution. Journal of Physiology 318:239-50.
- Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong WW, Kamen R, Weichselbaum R and others. 1995. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. EMBO Journal 14(24):6148-56.
- Engelhardt JF, Schlossberg H, Yankaskas JR, Dudus L. 1995. Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. Development 121(7):2031-46.
- Eylar EH, Ishaque A, Szymanska I. 1980a. The P2 protein of peripheral nerve myelin. Progress in Clinical & Biological Research 49:37-53.
- Eylar EH, Szymanska I, Ishaque A, Ramwani J, Dubiski S. 1980b. Localization of the P2 protein in peripheral nerve myelin. Journal of Immunology 124(3):1086-92.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD. 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. European Journal of Neuroscience 18(10):2803-12.
- Fedoroff S, Ahmed I, Opas M, Kalnins VI. 1987. Organization of microfilaments in astrocytes that form in the presence of dibutyryl cyclic AMP in cultures, and which are similar to reactive astrocytes in vivo. Neuroscience 22(1):255-66.
- Feldmeyer D, Lubke J, Silver RA, Sakmann B. 2002. Synaptic connections between layer 4 spiny neurone-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column. J Physiol 538(Pt 3):803-22.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N. 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. Neuron 12(4):895-908.
- Feng L, Heintz N. 1995. Differentiating neurons activate transcription of the brain lipidbinding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. Development 121(6):1719-30.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. Mol Cell Neurosci 23(3):373-82.
- Fishell G, Mason CA, Hatten ME. 1993. Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. Nature 362(6421):636-8.
- Fishman PS, Farrand DA, Kristt DA. 1990. Internalization of plasma proteins by cerebellar Purkinje cells. Journal of the Neurological Sciences 100(1-2):43-9.
- Fletcher JE, Spector AA. 1977. Alternative models for the analysis of drug-protein binding. Molecular Pharmacology 13(3):387-99.
- Fukuchi-Shimogori T, Grove EA. 2001. Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. Science 294(5544):1071-4.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. 2006. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. Journal of Neuroscience 26(3):1045-56.

- Gallagher HC, Murphy KJ, Foley AG, Regan CM. 2001. Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. Journal of Neurochemistry 77(2):425-34.
- Gallicano GI, McGaughey RW, Capco DG. 1995. Protein kinase M, the cytosolic counterpart of protein kinase C, remodels the internal cytoskeleton of the mammalian egg during activation. Developmental Biology 167(2):482-501.
- Gallicano GI, Yousef MC, Capco DG. 1997. PKC--a pivotal regulator of early development. Bioessays 19(1):29-36.
- García-Verdugo JM, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. Brain Res Bull 57(6):765-75.
- Garel S, Huffman KJ, Rubenstein JL. 2003. Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants. Development 130(9):1903-14.
- Gekle M. 2005. Renal tubule albumin transport. Annu Rev Physiol 67:573-94.
- Godbout R, Bisgrove DA, Shkolny D, Day RS, 3rd. 1998. Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. Oncogene 16(15):1955-62.
- Gohlke JM, Griffith WC, Faustman EM. 2004. The role of cell death during neocortical neurogenesis and synaptogenesis: implications from a computational model for the rat and mouse. Brain Res Dev Brain Res 151(1-2):43-54.
- Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. 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(10):4653-7.
- Gotz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 6(10):777-88.
- Götz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 6(10):777-88.
- Granda B, Tabernero A, Tello V, Medina JM. 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(1-2):1-8.
- Grdadolnik J, Marechal Y. 2005. Hydrogen-deuterium exchange in bovine serum albumin protein monitored by Fourier transform infrared spectroscopy, part II: kinetic studies. Appl Spectrosc 59(11):1357-64.
- Grimm-Jorgensen Y. 1987. Somatostatin and calcitonin stimulate neurite regeneration of molluscan neurons in vitro. Brain Research 403(1):121-6.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. Journal of Neuroscience 22(2):437-45.
- Gurr M.I. HJL, Frayn K.N.,, editor. 2002. Lipid Biochemistry: Blackwell Science.
- Habgood MD, Sedgwick JE, Dziegielewska KM, Saunders NR. 1992. A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. Journal of Physiology 456:181-92.
- Hamburger V, Levi-Montalcini R. 1949. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. Journal of Experimental Zoology 111(3):457-501.
- Hamilton JA, Kamp F. 1999. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? Diabetes 48(12):2255-69.
- Hamon M. 1989. Dopamine et serotonine. Implications dans les effets centraux des psychotropes. Encephale 15 Spec No:119-25.

- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M. 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Developmental Biology 229(1):15-30.
- Hatten ME, Liem RK, Mason CA. 1986. Weaver mouse cerebellar granule neurons fail to migrate on wild-type astroglial processes in vitro. Journal of Neuroscience 6(9):2676-83.
- Hayasaka K, Himoro M, Takada G, Takahashi E, Minoshima S, Shimizu N. 1993. Structure and localization of the gene encoding human peripheral myelin protein 2 (PMP2). Genomics 18(2):244-8.
- Hayashi M. 1992. Ontogeny of some neuropeptides in the primate brain. Progress in Neurobiology 38(3):231-60.
- He XM, Carter DC. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin.[erratum appears in Nature 1993 Jul 22;364(6435):362]. Nature 358(6383):209-15.
- Herbert MR, Harris GJ, Adrien KT, Ziegler DA, Makris N, Kennedy DN, Lange NT, Chabris CF, Bakardjiev A, Hodgson J and others. 2002. Abnormal asymmetry in language association cortex in autism. Annals of Neurology 52(5):588-96.
- Herschkowitz N. 1988. Brain development in the fetus, neonate and infant. Biology of the Neonate 54(1):1-19.
- Hertzel AV, Bernlohr DA. 2000. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. Trends in Endocrinology & Metabolism 11(5):175-80.
- Hevner RF. 2006. From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development. Molecular Neurobiology 33(1):33-50.
- Hevner RF, Hodge RD, Daza RA, Englund C. 2006. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. Neurosci Res 55(3):223-33.
- Hodsdon ME, Cistola DP. 1997. Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by 15N NMR relaxation and 1H exchange. Biochemistry 36(8):2278-90.
- Hodsdon ME, Toner JJ, Cistola DP. 1995. 1H, 13C and 15N assignments and chemical shiftderived secondary structure of intestinal fatty acid-binding protein. Journal of Biomolecular NMR 6(2):198-210.
- Hohoff C, Borchers T, Rustow B, Spener F, van Tilbeurgh H. 1999. Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. Biochemistry 38(38):12229-39.
- Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. 1999. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. Nature 401(6748):69-73.
- Hostetler HA, Balanarasimha M, Huang H, Kelzer MS, Kaliappan A, Kier AB, Schroeder F. 2010. Glucose regulates fatty acid binding protein interaction with lipids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Journal of Lipid Research 51(11):3103-16.
- Hostetler HA, Huang H, Kier AB, Schroeder F. 2008. Glucose directly links to lipid metabolism through high affinity interaction with peroxisome proliferator-activated receptor alpha. J Biol Chem 283(4):2246-54.
- Hostetler HA, Petrescu AD, Kier AB, Schroeder F. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. Journal of Biological Chemistry 280(19):18667-82.
- Houlgatte R, Mallat M, Brachet P, Prochiantz A. 1989. Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain. Journal of Neuroscience Research 24(2):143-52.

- Hu JG, Wang XF, Zhou JS, Wang FC, Li XW, Lu HZ. 2010. Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. Acta Neurobiol Exp (Wars) 70(3):239-45.
- Hunt CR, Ro JH, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM. 1986. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cellspecific genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83(11):3786-90.
- Ido M, Sato K, Sakurai M, Inagaki M, Saitoh M, Watanabe M, Hidaka H. 1987. Decreased phorbol ester receptor and protein kinase C in P388 murine leukemic cells resistant to etoposide. Cancer Res 47(13):3460-3.
- Ito K, Sato T, Arita M. 2001. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K+ channels during reoxygenation in guinea-pig ventricular myocytes. J Physiol 532(Pt 1):165-74.
- Itoh H, Yamamura S, Ware JA, Zhuang S, Mii S, Liu B, Kent KC. 2001. Differential effects of protein kinase C on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281(1):H359-70.
- Ivins JK, Pittman RN. 1989. Growth cone-growth cone interactions in cultures of rat sympathetic neurons. Developmental Biology 135(1):147-57.
- J. Sanes TJ. 2001. Guía de los axones hacia sus objetivos. Principios de Neurociencia. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España. p 1063-1086.
- Jacob SN, Choe CU, Uhlen P, DeGray B, Yeckel MF, Ehrlich BE. 2005. Signaling microdomains regulate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium transients in cultured neurons. Journal of Neuroscience 25(11):2853-64.
- Jakoby MG, Miller KR, Toner JJ, Bauman A, Cheng L, Li E, Cistola DP. 1993. Ligand-protein electrostatic interactions govern the specificity of retinol- and fatty acid-binding proteins. Biochemistry 32(3):872-8.
- Jessell TM, Sanes JR. 2000. Development. The decade of the developing brain. Curr Opin Neurobiol 10(5):599-611.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(18):11946-50.
- Johnson GV, Jope RS. 1992. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. Journal of Neuroscience Research 33(4):505-12.
- Juurlink BH, Devon RM. 1990. Macromolecular translocation--a possible function of astrocytes. Brain Research 533(1):73-7.
- Kalcheva N, Rockwood JM, Kress Y, Steiner A, Shafit-Zagardo B. 1998. Molecular and functional characteristics of MAP-2a: ability of MAP-2a versus MAP-2b to induce stable microtubules in COS cells. Cell Motility & the Cytoskeleton 40(3):272-85.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science 197(4308):1092-4.
- Katoh T, Karasaki Y, Hirano H, Gotoh S, Higashi K. 1990. Translocation of protein kinase C to membranes induced by TNF does not cause the inhibition of EGF binding to human wish cells. Biochem Biophys Res Commun 168(2):690-5.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1996. Physiological and morphological identification of somatostatinor vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. Journal of Neuroscience 16(8):2701-15.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer 26(4):239-57.

- Khan WA, Blobe G, Halpern A, Taylor W, Wetsel WC, Burns D, Loomis C, Hannun YA. 1993. Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. J Biol Chem 268(7):5063-8.
- Khan WA, Blobe GC, Hannun YA. 1992. Activation of protein kinase C by oleic acid. Determination and analysis of inhibition by detergent micelles and physiologic membranes: requirement for free oleate. J Biol Chem 267(6):3605-12.
- Kleiman R, Banker G, Steward O. 1990. Differential subcellular localization of particular mRNAs in hippocampal neurons in culture. Neuron 5(6):821-30.
- Kleiman R, Banker G, Steward O. 1994. Development of subcellular mRNA compartmentation in hippocampal neurons in culture. Journal of Neuroscience 14(3 Pt 1):1130-40.
- Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM and others. 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(9):4318-23.
- Konno Y, Ohno S, Akita Y, Kawasaki H, Suzuki K. 1989. Enzymatic properties of a novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC. J Biochem 106(4):673-8.
- Kornack DR, Rakic P. 2001. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(8):4752-7.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bruns GA, Benowitz LI, MacDonald GP, Cox DR, Neve RL. 1988. Human GAP-43: its deduced amino acid sequence and chromosomal localization in mouse and human. Neuron 1(2):127-32.
- Kotton DN, Summer R, Fine A. 2004. Lung stem cells: new paradigms. Exp Hematol 32(4):340-3.
- Kriegstein AR, Noctor SC. 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends in Neurosciences 27(7):392-9.
- Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, Bruning G, Spener F, Muller T. 1994. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. Development 120(9):2637-49.
- Kuznetsov SA, Rodionov VI, Bershadsky AD, Gelfand VI, Rosenblat VA. 1980. High molecular weight protein MAP 2 promoting microtubule assembly in vitro is associated with microtubules in cells. Cell Biology International Reports 4(11):1017-24.
- Lai HC, Wu MJ, Chen PY, Sheu TT, Chiu SP, Lin MH, Ho CT, Yen JH. 2011. Neurotrophic effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone: promotion of neurite outgrowth via cAMP/PKA/CREB pathway in PC12 cells. PLoS One 6(11):e28280.
- Le Magueresse C, Alfonso J, Bark C, Eliava M, Khrulev S, Monyer H. 2011a. Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Use Vasculature as a Scaffold to Migrate Radially to the Cortex in Neonatal Mice. Cereb Cortex.
- Le Magueresse C, Alfonso J, Khodosevich K, Arroyo Martin AA, Bark C, Monyer H. 2011b. "Small axonless neurons": postnatally generated neocortical interneurons with delayed functional maturation. Journal of Neuroscience 31(46):16731-47.
- Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA. 1999. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. Mol Cell Neurosci 13(6):450-64.
- Levi-Montalcini R. 1982. Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. Annual Review of Neuroscience 5:341-62.
- Lipton SA, Kater SB. 1989. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. Trends in Neurosciences 12(7):265-70.

- Liu RZ, Mita R, Beaulieu M, Gao Z, Godbout R. 2010. Fatty acid binding proteins in brain development and disease. International Journal of Developmental Biology 54(8-9):1229-39.
- Liu Y, Longo LD, De Leon M. 2000. In situ and immunocytochemical localization of E-FABP mRNA and protein during neuronal migration and differentiation in the rat brain. Brain Research 852(1):16-27.
- Liu Y, Molina CA, Welcher AA, Longo LD, De Leon M. 1997. Expression of DA11, a neuronalinjury-induced fatty acid binding protein, coincides with axon growth and neuronal differentiation during central nervous system development. Journal of Neuroscience Research 48(6):551-62.
- Lopez-Nicolas R, Lopez-Andreo MJ, Marin-Vicente C, Gomez-Fernandez JC, Corbalan-Garcia S. 2006. Molecular mechanisms of PKCalpha localization and activation by arachidonic acid. The C2 domain also plays a role. J Mol Biol 357(4):1105-20.
- Luckenbill-Edds L. 1997. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. Brain Research -Brain Research Reviews 23(1-2):1-27.
- Ma DK, Ming GL, Song H. 2005. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. Curr Opin Neurobiol 15(5):514-20.
- Maccioni RB, Cambiazo V. 1995. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. Physiological Reviews 75(4):835-64.
- Madtes P, Jr., Redburn DA. 1983. GABA as a trophic factor during development. Life Sciences 33(10):979-84.
- Mandelkow E, Mandelkow EM. 1995. Microtubules and microtubule-associated proteins. Current Opinion in Cell Biology 7(1):72-81.
- Manent JB, Beguin S, Ganay T, Represa A. 2011. Cell-autonomous and cell-to-cell signalling events in normal and altered neuronal migration. European Journal of Neuroscience 34(10):1595-608.
- Marin O, Rubenstein JL. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. Nature Reviews Neuroscience 2(11):780-90.
- Marin O, Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. Annual Review of Neuroscience 26:441-83.
- Marin O, Valiente M, Ge X, Tsai LH. 2010. Guiding neuronal cell migrations. Cold Spring Harb Perspect Biol 2(2):a001834.
- Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL. 2001. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. Science 293(5531):872-5.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nature Reviews Neuroscience 5(10):793-807.
- Masouye I, Hagens G, Van Kuppevelt TH, Madsen P, Saurat JH, Veerkamp JH, Pepper MS, Siegenthaler G. 1997. Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. Circulation Research 81(3):297-303.
- Matsumata M, Sakayori N, Maekawa M, Owada Y, Yoshikawa T, Osumi N. 2012. The effects of fabp7 and fabp5 on postnatal hippocampal neurogenesis in the mouse. Stem Cells 30(7):1532-43.
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieger FW. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. Science 294(5545):1354-7.
- McBain CJ, Traynelis SF. 2006. Malevolent lurkers no more: NMDA receptors come of age. J Physiol 575(Pt 2):317-8.

- McConnell SK. 1988. Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. Brain Research 472(1):1-23.
- McCormick DA. 1989. GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. J Neurophysiol 62(5):1018-27.
- Medina JM, Tabernero A. 2002. Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. J Physiol Paris 96(3-4):265-71.
- Mehler MF, Kessler JA. 1995. Cytokines and neuronal differentiation. Crit Rev Neurobiol 9(4):419-46.
- Meisami E. TPS. 1982. Normal and abnormal biochemical development of the brain after birth. In: C.T. J, editor. Biochemical Development of the Fetus and Neonate. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. p 759-821.
- Mellor H, Parker PJ. 1998. The extended protein kinase C superfamily. Biochemical Journal 332 (Pt 2):281-92.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. Journal of Comparative Neurology 451(2):170-88.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. Science 317(5836):381-4.
- Metin C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG. 2006. Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. European Journal of Neuroscience 23(4):894-900.
- Michler A. 1990. Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. Int J Dev Neurosci 8(4):463-72.
- Miller MW. 1985. Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABAimmunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. Brain Research 355(2):187-92.
- Minami H, Owada Y, Suzuki R, Handa Y, Kondo H. 2000. Localization of mRNAs for novel, atypical as well as conventional protein kinase C (PKC) isoforms in the brain of developing and mature rats. J Mol Neurosci 15(2):121-35.
- Mione MC, Cavanagh JF, Harris B, Parnavelas JG. 1997. Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. Journal of Neuroscience 17(6):2018-29.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. Cell Stem Cell 3(3):265-78.
- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS, Jr. 1988. Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. Brain Res Dev Brain Res 44(1):95-108.
- Mita R, Beaulieu MJ, Field C, Godbout R. 2010. Brain fatty acid-binding protein and omega-3/omega-6 fatty acids: mechanistic insight into malignant glioma cell migration. J Biol Chem 285(47):37005-15.
- Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M. 2001. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron 31(5):727-41.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nature Reviews Neuroscience 8(6):427-37.
- Mollgard K, Reynolds ML, Jacobsen M, Dziegielewska KM, Saunders NR. 1984. Differential immunocytochemical staining for fetuin and transferrin in the developing cortical plate. Journal of Neurocytology 13(4):497-502.

- Muoio DM, Way JM, Tanner CJ, Winegar DA, Kliewer SA, Houmard JA, Kraus WE, Dohm GL. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. Diabetes 51(4):901-9.
- Nadal A, Fuentes E, Pastor J, McNaughton PA. 1995. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(5):1426-30.
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG. 2002. Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. Nat Neurosci 5(3):218-24.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat Neurosci 4(2):143-50.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. Nature Reviews Neuroscience 3(6):423-32.
- Nakajima K. 2007. Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. Neurochem Int 51(2-4):121-31.
- Narayanan V, Kaestner KH, Tennekoon GI. 1991. Structure of the mouse myelin P2 protein gene. Journal of Neurochemistry 57(1):75-80.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. 1986. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. Brain Research 387(3):271-80.
- Newton AC. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. Chem Rev 101(8):2353-64.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409(6821):714-20.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. Journal of Neuroscience 22(8):3161-73.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7(2):136-44.
- O'Rourke NA, Chenn A, McConnell SK. 1997. Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. Development 124(5):997-1005.
- O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK. 1992. Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. Science 258(5080):299-302.
- Oancea E, Meyer T. 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. Cell 95(3):307-18.
- Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. 1972. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. Science 177(43):56-8.
- Oestreicher AB, De Graan PN, Gispen WH, Verhaagen J, Schrama LH. 1997. B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. Progress in Neurobiology 53(6):627-86.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ and others. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci U S A 100(21):12313-8.
- Ohtsuka T, Asahi M, Matsuura N, Kikuchi H, Hojo M, Kageyama R, Ohkubo H, 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 Research 293(1):23-9.

Olmsted JB. 1986. Microtubule-associated proteins. Annual Review of Cell Biology 2:421-57.

- Omiyi D, Brue RJ, Taormina P, 2nd, Harvey M, Atkinson N, Young LH. 2005. Protein kinase C betall peptide inhibitor exerts cardioprotective effects in rat cardiac ischemia/reperfusion injury. J Pharmacol Exp Ther 314(2):542-51.
- Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. Annual Review of Neuroscience 14:453-501.
- Owada Y. 2008. Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. Tohoku Journal of Experimental Medicine 214(3):213-20.
- Owada Y, Abdelwahab SA, Kitanaka N, Sakagami H, Takano H, Sugitani Y, Sugawara M, Kawashima H, Kiso Y, Mobarakeh JI and others. 2006. Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid-binding protein gene. European Journal of Neuroscience 24(1):175-87.
- Owada Y, Kitanaka N, Kondo H. 2004. [Fatty acid binding proteins]. Nippon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine 62 Suppl 12:95-7.
- Owada Y, Suzuki I, Noda T, Kondo H. 2002. Analysis on the phenotype of E-FABP-gene knockout mice. Mol Cell Biochem 239(1-2):83-6.
- Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. 1996a. Increased expression of the mRNA for brain- and skin-type but not heart-type fatty acid binding proteins following kainic acid systemic administration in the hippocampal glia of adult rats. Brain Research Molecular Brain Research 42(1):156-60.
- Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. 1996b. Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. Journal of Chemical Neuroanatomy 12(2):113-22.
- Palacios G, Mengod G, Sarasa M, Baudier J, Palacios JM. 1994. De novo synthesis of GAP-43: in situ hybridization histochemistry and light and electron microscopy immunocytochemical studies in regenerating motor neurons of cranial nerve nuclei in the rat brain. Brain Research Molecular Brain Research 24(1-4):107-17.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. Journal of Comparative Neurology 425(4):479-94.
- Parnavelas JG, Barfield JA, Franke E, Luskin MB. 1991. Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. Cereb Cortex 1(6):463-8.
- Patel AJ, Hunt A. 1989. Regulation of production by primary cultures of rat forebrain astrocytes of a trophic factor important for the development of cholinergic neurons. Neuroscience Letters 99(1-2):223-8.
- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. 2001. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. Experimental Neurology 172(1):1-16.
- Perez-Martin M, Grondona JM, Cifuentes M, Perez-Figares JM, Jimenez JA, Fernandez-Llebrez P. 2000. Ependymal explants from the lateral ventricle of the adult bovine brain: a model system for morphological and functional studies of the ependyma. Cell & Tissue Research 300(1):11-9.
- Perrone-Bizzozero NI, Cansino VV, Kohn DT. 1993. Posttranscriptional regulation of GAP-43 gene expression in PC12 cells through protein kinase C-dependent stabilization of the mRNA. Journal of Cell Biology 120(5):1263-70.
- Pignatelli A, Belluzzi O. 2010. Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb.

- Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL. 2000. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. Neuron 28(3):727-40.
- Podgornyi OV, Aleksandrova MA. 2009. BLBP-immunoreactive cells in the primary culture of neural precursors from embryonic mouse brain. Bull Exp Biol Med 147(1):125-31.
- Poirier J. 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. Trends in Neurosciences 17(12):525-30.
- Polo-Hernandez E. 2009. Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado en la zona subventricular durante el desarrollo postnatal. Salamanca: University of Salamanca.
- Polo-Hernandez E, De Castro F, Garcia-Garcia AG, Tabernero A, Medina JM. 2010. Oleic acid synthesized in the periventricular zone promotes axonogenesis in the striatum during brain development. Journal of Neurochemistry 114(6):1756-66.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A. 2002. Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. Development 129(13):3147-60.
- Ponti G, Aimar P, Bonfanti L. 2006. Cellular composition and cytoarchitecture of the rabbit subventricular zone and its extensions in the forebrain. Journal of Comparative Neurology 498(4):491-507.
- Pravenec M, Kren V, Wang J, Kurtz TW. 1997. Linkage mapping of the cellular retinoic acidbinding protein 1 (Crabp1) gene to rat chromosome 8. Mammalian Genome 8(6):455-6.
- Purkayastha S, Fernando SS, Diallo S, Cohen L, Ranasinghe B, Levano K, Banerjee P. 2009. Regulation of protein kinase C isozymes during early postnatal hippocampal development. Brain Research 1288:29-41.
- Rakic P. 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. Science 183(4123):425-7.
- Rakic P. 1978. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. Postgraduate Medical Journal 54 Suppl 1:25-40.
- Rakic P. 1985. Limits of neurogenesis in primates. Science 227(4690):1054-6.
- Rakic P. 1988. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. Prog Brain Res 73:15-37.
- Ramón y Cajal S. 1911a. Histologie du système nerveux de l'hommes et des vertébrés. Paris: Maloine.
- Ramón y Cajal S. 1911b. Histology of nervous system. New York: Oxford U.P.
- Rapoport SI. 2005. In vivo approaches and rationale for quantifying kinetics and imaging brain lipid metabolic pathways. Prostaglandins & Other Lipid Mediators 77(1-4):185-96.
- Rash BG, Grove EA. 2006. Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. Curr Opin Neurobiol 16(1):25-34.
- Reese-Wagoner A, Thompson J, Banaszak L. 1999. Structural properties of the adipocyte lipid binding protein. Biochimica et Biophysica Acta 1441(2-3):106-16.
- Reisert I, Han V, Hartwig S, Ahnert-Hilger G, Pilgrim C. 1989. Rapid maturation of synaptic functions of prenatal serotoninergic neurons in short-term cultures: absence of sex differences and hormone effects. Neuroscience 32(1):133-9.
- Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 255(5052):1707-10.

- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. 1992. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(18):8591-5.
- Richieri GV, Kleinfeld AM. 1995. Unbound free fatty acid levels in human serum. Journal of Lipid Research 36(2):229-40.
- Rodriguez-Rodriguez RA, Tabernero A, Velasco A, Lavado EM, Medina JM. 2004. The neurotrophic effect of oleic acid includes dendritic differentiation and the expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2. Journal of Neurochemistry 88(5):1041-51.
- Sacchettini JC, Gordon JI, Banaszak LJ. 1988. The structure of crystalline Escherichia coliderived rat intestinal fatty acid-binding protein at 2.5-A resolution. Journal of Biological Chemistry 263(12):5815-9.
- Saito N, Itouji A, Totani Y, Osawa I, Koide H, Fujisawa N, Ogita K, Tanaka C. 1993. Cellular and intracellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the epsilon-subspecies. Brain Research 607(1-2):241-8.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM and others. 2011. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. Nature 478(7369):382-6.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. Progress in Neurobiology 61(2):133-68.
- Scott BB, Gardner T, Ji N, Fee MS, Lois C. 2012. Wandering neuronal migration in the postnatal vertebrate forebrain. Journal of Neuroscience 32(4):1436-46.
- Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF. 2002. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. Molecular & Cellular Biochemistry 239(1-2):69-77.
- Schaechter JD, Benowitz LI. 1993. Activation of protein kinase C by arachidonic acid selectively enhances the phosphorylation of GAP-43 in nerve terminal membranes. Journal of Neuroscience 13(10):4361-71.
- Schaffer JE. 2002. Fatty acid transport: the roads taken. American Journal of Physiology -Endocrinology & Metabolism 282(2):E239-46.
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG. 2004. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. Brain Pathol 14(3):237-48.
- Schmitt H, Meves H. 1993. Protein kinase C as mediator of arachidonic acid-induced decrease of neuronal M current. Pflugers Arch 425(1-2):134-9.
- Schoenfeld TA, Obar RA. 1994. Diverse distribution and function of fibrous microtubuleassociated proteins in the nervous system. International Review of Cytology 151:67-137.
- Schoentgen F, Pignede G, Bonanno LM, Jolles P. 1989. Fatty-acid-binding protein from bovine brain. Amino acid sequence and some properties. European Journal of Biochemistry 185(1):35-40.
- Sellner PA, Chu W, Glatz JF, Berman NE. 1995. Developmental role of fatty acid-binding proteins in mouse brain. Brain Research Developmental Brain Research 89(1):33-46.
- Senjo M, Ishibashi T, Imai Y, Takahashi K, Ono T. 1985. Isolation and characterization of fatty acid-binding protein from rat brain. Arch Biochem Biophys 236(2):662-8.
- Shafit-Zagardo B, Kalcheva N. 1998. Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. Molecular Neurobiology 16(2):149-62.

- Shen LH, Zhang JT. 2004. Ginsenoside Rg1 promotes proliferation of hippocampal progenitor cells. Neurol Res 26(4):422-8.
- Shirai Y, Adachi N, Saito N. 2008. Protein kinase Cepsilon: function in neurons. FEBS J 275(16):3988-94.
- Simpson MA, LiCata VJ, Ribarik Coe N, Bernlohr DA. 1999. Biochemical and biophysical analysis of the intracellular lipid binding proteins of adipocytes. Molecular & Cellular Biochemistry 192(1-2):33-40.
- Skene JH. 1989. Axonal growth-associated proteins. Annual Review of Neuroscience 12:127-56.
- Skene JH, Jacobson RD, Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA. 1986. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. Science 233(4765):783-6.
- Skene JH, Virag I. 1989. Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. Journal of Cell Biology 108(2):613-24.
- Soma MR, Baetta R, Bergamaschi S, De Renzis MR, Davegna C, Battaini F, Fumagalli R, Govoni S. 1994. PKC activity in rat C6 glioma cells: changes associated with cell cycle and simvastatin treatment. Biochem Biophys Res Commun 200(2):1143-9.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J Physiol 562(Pt 1):9-26.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. 2002a. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature 417(6884):39-44.
- Song HJ, Stevens CF, Gage FH. 2002b. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. Nat Neurosci 5(5):438-45.
- Spector AA. 1986. Structure and lipid binding properties of serum albumin. Methods in Enzymology 128:320-39.
- Spector AA, John K, Fletcher JE. 1969. Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. Journal of Lipid Research 10(1):56-67.
- Spoerri PE. 1988. Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. Synapse 2(1):11-22.
- Stastna M, Abraham MR, Van Eyk JE. 2009. Cardiac stem/progenitor cells, secreted proteins, and proteomics. FEBS Letters 583(11):1800-7.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. 1996. Differentiation of adult hippocampusderived progenitors into olfactory neurons in vivo. Nature 383(6601):624-7.
- Sweetser DA, Birkenmeier EH, Klisak IJ, Zollman S, Sparkes RS, Mohandas T, Lusis AJ, Gordon JI. 1987. The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. Journal of Biological Chemistry 262(33):16060-71.
- Sweetser DA, Lowe JB, Gordon JI. 1986. The nucleotide sequence of the rat liver fatty acidbinding protein gene. Evidence that exon 1 encodes an oligopeptide domain shared by a family of proteins which bind hydrophobic ligands. Journal of Biological Chemistry 261(12):5553-61.
- Tabata H, Nakajima K. 2003. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. Journal of Neuroscience 23(31):9996-10001.
- Tabernero A, Bolaños JP, Medina JM. 1993. Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. Biochemical Journal 294(Pt 3):635-8.

- Tabernero A, Granda B, Medina A, Sanchez-Abarca LI, Lavado E, Medina JM. 2002a. Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate. Journal of Neurochemistry 81(4):881-91.
- Tabernero A, Jimenez C, Velasco A, Giaume C, Medina JM. 2001a. The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation. Journal of Neurochemistry 78(4):890-8.
- Tabernero A, Lavado EM, Granda B, Velasco A, Medina JM. 2001b. Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. Journal of Neurochemistry 79(3):606-16.
- Tabernero A, Medina A, Sanchez-Abarca LI, Lavado E, Medina JM. 1999. The effect of albumin on astrocyte energy metabolism is not brought about through the control of cytosolic Ca2+ concentrations but by free-fatty acid sequestration. GLIA 25(1):1-9.
- Tabernero A, Velasco A, Granda B, Lavado EM, Medina JM. 2002b. Transcytosis of albumin in astrocytes activates the sterol regulatory element-binding protein-1, which promotes the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. J Biol Chem 277(6):4240-6.
- Tabernero A, Velasco A, Granda B, Lavado EM, Medina JM. 2002c. Transcytosis of albumin in astrocytes activates the sterol regulatory element-binding protein-1, which promotes the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. Journal of Biological Chemistry 277(6):4240-6.
- Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N. 2002. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription.[erratum appears in Mol Cell Biol 2002 Sep;22(17):6318]. Molecular & Cellular Biology 22(14):5114-27.
- Tan SS, Breen S. 1993. Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. Nature 362(6421):638-40.
- Tan SS, Faulkner-Jones B, Breen SJ, Walsh M, Bertram JF, Reese BE. 1995. Cell dispersion patterns in different cortical regions studied with an X-inactivated transgenic marker. Development 121(4):1029-39.
- Tan SS, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PP, Reese BE, Faulkner-Jones B. 1998. Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. Neuron 21(2):295-304.
- Tanaka C, Saito N. 1992. Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. Neurochem Int 21(4):499-512.
- Tejero-Diez P, Rodriguez-Sanchez P, Diez-Guerra FJ. 1995. Expression of protein kinase C isozymes in hippocampal neurones in culture. FEBS Letters 363(3):293-8.
- Tello-Hernandez V. 2008. Efecto del ácido oleico en la migración y en la formación de sinapsis. Salamanca: University of Salamanca.
- Thompson AF, Levin LA. 2010. Neuronal differentiation by analogs of staurosporine. Neurochem Int 56(4):554-60.
- Thompson J, Ory J, Reese-Wagoner A, Banaszak L. 1999. The liver fatty acid binding protein-comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. Molecular & Cellular Biochemistry 192(1-2):9-16.
- Thomson AM, Deuchars J. 1994. Temporal and spatial properties of local circuits in neocortex. Trends in Neurosciences 17(3):119-26.
- Thomson AM, West DC, Hahn J, Deuchars J. 1996. Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurones in slices of rat neocortex. J Physiol 496 (Pt 1):81-102.
- Tildon JT, McKenna MC, Stevenson J, Couto R. 1993. Transport of L-lactate by cultured rat brain astrocytes. Neurochemical Research 18(2):177-84.

- Timiras PS, Choy VJ, Hudson DB. 1982. Neuroendocrine pacemaker for growth, development and ageing. Age & Ageing 11(2):73-88.
- Tonsgard JH, Meredith SC. 1991. Characterization of the binding sites for dicarboxylic acids on bovine serum albumin. Biochemical Journal 276(Pt 3):569-75.
- Trapp BD, Dubois-Dalcq M, Quarles RH. 1984. Ultrastructural localization of P2 protein in actively myelinating rat Schwann cells. Journal of Neurochemistry 43(4):944-8.
- Treuner M, Kozak CA, Gallahan D, Grosse R, Muller T. 1994. Cloning and characterization of the mouse gene encoding mammary-derived growth inhibitor/heart-fatty acid-binding protein. Gene 147(2):237-42.
- Trojan J, Uriel J. 1979. Localisation intracellulaire de l'alpha-foetoproteine et de la serumalbumine dans le systeme nerveux central du Rat au cours du developpement foetal et postnatal. Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences Serie D, Sciences Naturelles 289(15):1157-60.
- Tsunoda S, Sierralta J, Zuker CS. 1998. Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes. Current Opinion in Genetics & Development 8(4):419-22.
- Tucker RP. 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. Brain Research Brain Research Reviews 15(2):101-20.
- Udvadia AJ, Koster RW, Skene JH. 2001. GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration. Development 128(7):1175-82.
- Uhlen M, Ponten F. 2005. Antibody-based proteomics for human tissue profiling. Mol Cell Proteomics 4(4):384-93.
- Valiente M, Marin O. 2010. Neuronal migration mechanisms in development and disease. Curr Opin Neurobiol 20(1):68-78.
- Vallee RB, Bloom GS, Luca FC. 1986. Differential structure and distribution of the high molecular weight brain microtubule-associated proteins, MAP-1 and MAP-2. Annals of the New York Academy of Sciences 466:134-44.
- Vallieres L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. Journal of Neuroscience 22(2):486-92.
- Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HB. 1989. Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. Journal of Comparative Neurology 289(2):213-27.
- Varon S, Williams LR, Gage FH. 1987. Exogenous administration of neuronotrophic factors in vivo protects central nervous system neurons against axotomy induced degeneration. Prog Brain Res 71:191-201.
- Veerkamp JH. 1995. Fatty acid transport and fatty acid-binding proteins. Proc Nutr Soc 54(1):23-37.
- Veerkamp JH, Maatman RG. 1995a. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. Prog Lipid Res 34(1):17-52.
- Veerkamp JH, Maatman RG. 1995b. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. Progress in Lipid Research 34(1):17-52.
- Veerkamp JH, Van M, Ht, Zimmerman AW. 2000. Effect of fatty acid-binding proteins on intermembrane fatty acid transport studies on different types and mutant proteins. Eur J Biochem 267(19):5959-66.

- Veerkamp JH, van Moerkerk HT, Prinsen CF, van Kuppevelt TH. 1999. Structural and functional studies on different human FABP types. Molecular & Cellular Biochemistry 192(1-2):137-42.
- Veerkamp JH, Zimmerman AW. 2001. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. J Mol Neurosci 16(2-3):133-42; discussion 151-7.
- Velasco A, Tabernero A, Medina JM. 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 stearoyl-CoA desaturase during postnatal development of the brain. Brain Research 977(1):103-11.
- Ventura C, Maioli M. 2001. Protein kinase C control of gene expression. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression 11(1-3):243-67.
- Ventura RE, Goldman JE. 2007. Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. Journal of Neuroscience 27(16):4297-302.
- Vernadakis A. 1988. Neuron-glia interrelations. International Review of Neurobiology 30:149-224.
- Vernadakis A, Mangoura DA. 1988. Factors influencing glia growth in culture: nutrients and cell-secreted factors. Progress in Clinical & Biological Research 259:57-79.
- Verstappen J, Katsaros C, Torensma R, Von den Hoff JW. 2009. A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. Wound Repair Regen 17(3):296-305.
- Vicario C, Medina JM. 1992. Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period. Journal of Neurochemistry 59(1):32-40.
- Viveiros MM, O'Brien M, Wigglesworth K, Eppig JJ. 2003. Characterization of protein kinase C-delta in mouse oocytes throughout meiotic maturation and following egg activation. Biology of Reproduction 69(5):1494-9.
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, 2nd, Scheffler B, Steindler DA. 2006. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. GLIA 54(8):815-25.
- Wiche G, Oberkanins C, Himmler A. 1991. Molecular structure and function of microtubuleassociated proteins. International Review of Cytology 124:217-73.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A. 1999. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. Nat Neurosci 2(5):461-6.
- Woolf NJ. 1998. A structural basis for memory storage in mammals. Progress in Neurobiology 55(1):59-77.
- Xu Z, Bernlohr DA, Banaszak LJ. 1993. The adipocyte lipid-binding protein at 1.6-A resolution. Crystal structures of the apoprotein and with bound saturated and unsaturated fatty acids. Journal of Biological Chemistry 268(11):7874-84.
- Young KM, Fogarty M, Kessaris N, Richardson WD. 2007. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. Journal of Neuroscience 27(31):8286-96.
- Zanotti G. 1999. Muscle fatty acid-binding protein. Biochimica et Biophysica Acta 1441(2-3):94-105.
- Zeidman R, Troller U, Raghunath A, Pahlman S, Larsson C. 2002. Protein kinase Cepsilon actinbinding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. Mol Biol Cell 13(1):12-24.
- Zerouga M, Beauge F, Niel E, Durand G, Bourre JM. 1991. Interactive effects of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and chronic ethanol intoxication on synaptic membrane lipid composition and fluidity in rats. Biochim Biophys Acta 1086(3):295-304.

- Zhai XY, Nielsen R, Birn H, Drumm K, Mildenberger S, Freudinger R, Moestrup SK, Verroust PJ, Christensen EI, Gekle M. 2000. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. Kidney International 58(4):1523-33.
- Zimmerman AW, Veerkamp JH. 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. Cell Mol Life Sci 59(7):1096-116.

## **ANEXO**

ANEXO I
## Fig.51.- Representación esquemática de las secciones empleadas en los cultivos organotípicos.

Se emplearon secciones de 250 µm de cerebros de fetos a término PO. De cada cerebro se emplearon aproximadamente 3 secciones a lo largo del eje rostro-caudal, desde la unión entre hemisferios en la parte más rostral, a través del cuerpo calloso (*Coronal Plate 06*), hasta antes de la aparición del hipocampo, en su parte más caudal (*Coronal Plate 09*). Se empleó como referencia el "Atlas of Prenatal Rat Brain Development" de Altman & Bayer, CRC Press, 1995.





## Fig. 52.- Efecto del silenciamiento de FABP5 en la viabilidad neuronal medida por el método MTT, en neuronas en cultivo primario.

Las neuronas fueron trasnfectadas con NT-siRNA o FABP5-siRNA y cultivadas en medio definido suplementado o no, con BSA al 2% (+BSA), o con el complejo BSA al 2% + ácido oleico 50  $\mu$ M (+BSA +Oleico). (A) Absorbancia relativa medida por MTT a los tiempo indicados. Los valores se expresan como porcentaje relativo a la condición control FABP5-siRNA a las 24h y son valores medios ± SEM (n ≥ 4).Las líneas contínuas hacen referencia a condiciones transfectadas con NT-siRNA y las discontínuas a condiciones transfectadas con FABP5-siRNA

**ANEXO**