

**VNiVERSiDAD DE SALAMANCA**  
DEPARTAMENTO DE BiOQViMICA Y BiOLOGíA MOLECULAR

**LAS NEURONAS DEL ESTRIADO SON LA DIANA  
DEL EFECTO NEUROTRÓFICO DEL ÁCIDO OLEICO  
SINTETIZADO EN LA ZONA SUBVENTRICULAR  
DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL**

**ERICA POLO HERNÁNDEZ**  
**2009**



D. JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ, Catedrático de Universidad y D<sup>a</sup> 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: “Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado en la zona subventricular durante el desarrollo postnatal”, realizada bajo su dirección por la Licenciada en Farmacia y Bioquímica D<sup>a</sup> Erica Polo Hernández en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, firman el documento en Salamanca a 25 de mayo de 2009.

Fdo. José María Medina Jiménez    Fdo. Aránzazu Tabernero Urbietta



## ABREVIATURAS

AMPS- persulfato amónico  
BSA- albúmina sérica bovina  
BHE- barrera hematoencefálica  
BHT- 2,6-di-ter-butil-4-metilfenol  
bHLH- *basic Helix loop Helix*  
BLBP- proteína de unión a ácidos grasos  
BrdU- bromo-deoxiuridina  
CC- cuerpo calloso  
cDNA- DNA complementario  
CP- plexo coroideo  
18-Crown- 1,4,7,10,13,16-hexaxociclooctadecano  
Cy3- cianina 3  
DAPI- 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro  
DEPC- dietilpirocarbonato  
DIV- días *in vitro*  
DMEM- medio de Eagle modificado por Dulbecco  
DNA- ácido desoxirribonucleico  
dNTPs- desoxirribonucleótidos trifosfato  
DTT- ditionitrosol  
E- día embrionario  
FBS- suero fetal bovino  
GABA- ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GAP-43- proteína asociada al crecimiento 43  
GAPDH- gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GFAP- proteína ácida fibrilar de la guía  
HPLC- cromatografía líquida de alta eficiencia  
IGF- factor de crecimiento de la insulina  
IPTG- isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido  
kDa- kilodalton  
LB- Luria Bertani  
LCR- líquido cefalorraquídeo  
LGE- eminencia ganglionar lateral

LV- ventrículo lateral  
MAP-2- proteína asociada a microtúbulos 2  
MGE- eminencia ganglionar medial  
mRNA- ácido ribonucleico mensajero  
NBT/BCIP- cloruro de tetrazolio nitro-azul/5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato  
N-CAM- molécula de adhesión celular neuronal  
NGF- factor de crecimiento nervioso  
NT-siRNA  
P- día postnatal  
pb- pares de bases  
PBS- tampón fosfato salino  
PBPB- 2,4-dibromoacetofenona  
PCR- reacción en cadena de la polimerasa  
PDH- piruvato deshidrogenasa  
PKC- proteína kinasa C  
PMSF- fenil metil sulfonil fluoruro  
PPARs- receptores activados por proliferadores de peroxisomas  
p/v- peso/volumen  
RE- retículo endoplasmático  
RGC- células de la glía radial  
RNA- ácido ribonucleico  
RT- retrotranscripción  
SCD- estearil-CoA desaturasa  
SDS- dodecilsulfato sódico  
SEM- error estándar de la media  
siRNA- RNA de interferencia corta  
SNC- sistema nervioso central  
SNP- sistema nervioso periférico  
SREBP- proteína que se une al elemento regulado por estrógenos  
SSC- tampón citrato sódico  
STR- estriado  
SVZ- zona subventricular  
TAE- tris acetato

TBS- tampón Tris salino

TEMED- N,N,N',N'.tetrametiletildiamina

TNF- factor de necrosis tumoral

TUJ-1- tubulina  $\beta$ -III específica de neuronas

UTR- región no traducible

VZ- zona ventricular

X-Gal- 5-bromo-4-cloro-3-idolil- $\beta$ -D-galactopiranosido





# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Desarrollo celular del sistema nervioso central.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Células madre neurales y progenitores celulares.....	4
1.1.2 Neuronas de la corteza cerebral.....	6
1.1.3 Células gliales.....	8
<b>1.2 Desarrollo neuronal del SNC.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Neurogénesis.....	11
1.2.2 Migración neuronal.....	13
1.2.3 Agregación celular.....	16
1.2.4 Diferenciación neuronal.....	16
1.2.4.1 GAP-43, proteína asociada al crecimiento.....	18
1.2.4.2 MAP-2, proteína asociada a microtúbulos.....	20
1.2.5 Sinaptogénesis.....	22
1.2.6 Muerte neuronal.....	23
<b>1.3 Desarrollo del núcleo estriado.....</b>	<b>23</b>
1.3.1 Organización del núcleo estriado.....	26
1.3.2 Morfología del núcleo estriado.....	27
<b>1.4 La albúmina.....</b>	<b>29</b>
1.4.1 La albúmina en el cerebro.....	31
1.4.2 La albúmina y el factor neurotrófico ácido oleico.....	32
1.4.3 Relevancia clínica de la albúmina.....	35
1.4.4 Captación de la albúmina.....	36
<b>1.5. Biosíntesis del ácido oleico.....</b>	<b>36</b>
1.5.1 Localización, estructura y mecanismo de acción de la SCD.....	36
<b>2. PLAN DE TRABAJO.....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>45</b>
3.1.1 Especie ensayada y condiciones del animalario.....	45
3.1.2 Medios instrumentales.....	45

3.1.3 Productos.....	48
3.1.3.1 Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares.....	48
3.1.3.2 Productos utilizados para la preparación de los cultivos tisulares.....	49
3.1.3.3 Productos utilizados para la preparación de la albúmina libre de ácidos grasos.....	49
3.1.3.4 Productos utilizados para el análisis del mRNA.....	49
3.1.3.5 Productos empleados para el silenciamiento génico.....	50
3.1.3.6 Productos utilizados para el análisis de las proteínas.....	50
3.1.3.7 Productos empleados para el análisis de los ácidos grasos.....	51
3.1.3.8 Productos empleados para la obtención de la sonda de estearil-CoA desaturasa-1.....	52
3.1.3.9 Productos empleados para la comprobación de marcaje de la sonda con digoxigenina.....	52
3.1.3.10 Productos empleados para la hibridación <i>in situ</i> .....	52
<b>3.2 Métodos.....</b>	<b>53</b>
3.2.1 Preparación de los cultivos celulares.....	53
3.2.1.1 Preparación del cultivo primario de astrocitos.....	53
3.2.2 Preparación de los cultivos tisulares.....	54
3.2.2.1 Preparación de los cultivos organotípicos de rodajas de cerebro.....	54
3.2.2.2 Preparación del cultivo de explantes de la zona subventricular.....	55
3.2.3 Preparación de la albúmina libre de ácidos grasos.....	55
3.2.4 Tratamientos empleados en los cultivos.....	56
3.2.4.1 Tratamientos en astrocitos.....	56
3.2.4.2 Tratamientos en cultivos de explantes y organotípicos de rodajas de cerebro.....	56
3.2.5 RT-PCR.....	56
3.2.5.1 Extracción y cuantificación del RNA total.....	56
3.2.5.2 Retrotranscripción (RT).....	57
3.2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
3.2.5.4 Electroforesis de DNA.....	58

3.2.6 Transfección del siRNA.....	58
3.2.7 Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo <i>Western</i> .....	60
3.2.8 Análisis de los ácidos grasos.....	62
3.2.8.1 Extracción de los ácidos grasos.....	62
3.2.8.2 Derivatización de los ácidos grasos.....	63
3.2.8.3 Método cromatográfico.....	63
3.2.8.4 Cuantificación de las áreas cromatográficas.....	64
3.2.9 Obtención y preparación de los cortes histológicos.....	64
3.2.9.1 Fijación del tejido.....	64
3.2.9.2 Obtención de los cortes histológicos.....	65
3.2.10 Inmunofluorescencia.....	65
3.2.11 Obtención de la sonda de <i>Scd-1</i> utilizada en la hibridación <i>in situ</i> .....	66
3.2.11.1 Amplificación y marcaje de la secuencia de RNA de SCD-1.....	67
3.2.11.2 Dot blot.....	68
3.2.12 Hibridación <i>in situ</i> .....	69
3.2.13 Análisis estadístico.....	70
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Determinación de ácido oleico en el cerebro por HPLC.....</b>	<b>73</b>
4.1.1 Puesta a punto del método para el análisis de ácidos grasos por HPLC.....	73
4.1.2 Recuperación de los ácidos grasos con el método de extracción de Bligh.....	76
4.1.3 Evolución de la concentración de ácido oleico en cerebro durante el desarrollo postnatal.....	76
<b>4.2 Localización de la enzima responsable de la síntesis de ácido oleico en el cerebro.....</b>	<b>79</b>
4.2.1 Construcción de una sonda para la localización de la estearil-CoA desaturasa-1.....	79
4.2.2 Localización del mRNA de la estearil-CoA desaturasa-1 en el cerebro.....	82
4.2.3 Relación espacio-temporal de la SCD-1 con la albúmina.....	84

4.2.4 Distribución espacio-temporal del receptor de la albúmina, la megalina, y las proteínas implicadas en su internalización, caveolina-1 y caveolina-2, en el cerebro durante el desarrollo postnatal.....	87
4.2.5 Estudio del fenotipo de las células que rodean al ventrículo durante el desarrollo postnatal.....	88
<b>4.3 Distribución espacio-temporal de TUJ-1, GAP-43 y MAP-2 durante el desarrollo postnatal.....</b>	<b>93</b>
<b>4.4 Estudio del papel de la SCD-1 en las células de la SVZ.....</b>	<b>97</b>
4.4.1 Efecto de la albúmina en las células de la SVZ.....	97
4.4.2 Silenciamiento de la SCD-1 en las células de la SVZ.....	100
4.4.2.1 Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en los cultivos de explantes de la SVZ.....	100
4.4.2.2 Efecto del silenciamiento de la SCD-1 en las células de la SVZ.....	104
4.4.3 Estudio de las características de las células que migran en los explantes de SVZ en presencia de albúmina.....	106
4.4.3.1 Efecto de la albúmina sobre la expresión de GAP-43 en las neuronas que migran en los explantes de SVZ en presencia de albúmina.....	107
4.4.3.2 Efecto del silenciamiento de la SCD-1 en la expresión de GAP-43 en las neuronas que migran en los explantes de SVZ en presencia de albúmina.....	109
<b>4.5 Efecto de la albúmina en la expresión de GAP-43 en cultivos organotípicos de rodajas de cerebro.....</b>	<b>111</b>
4.5.1 Efecto del silenciamiento de la SCD-1 sobre la axonogénesis del núcleo estriado.....	114
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>119</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>

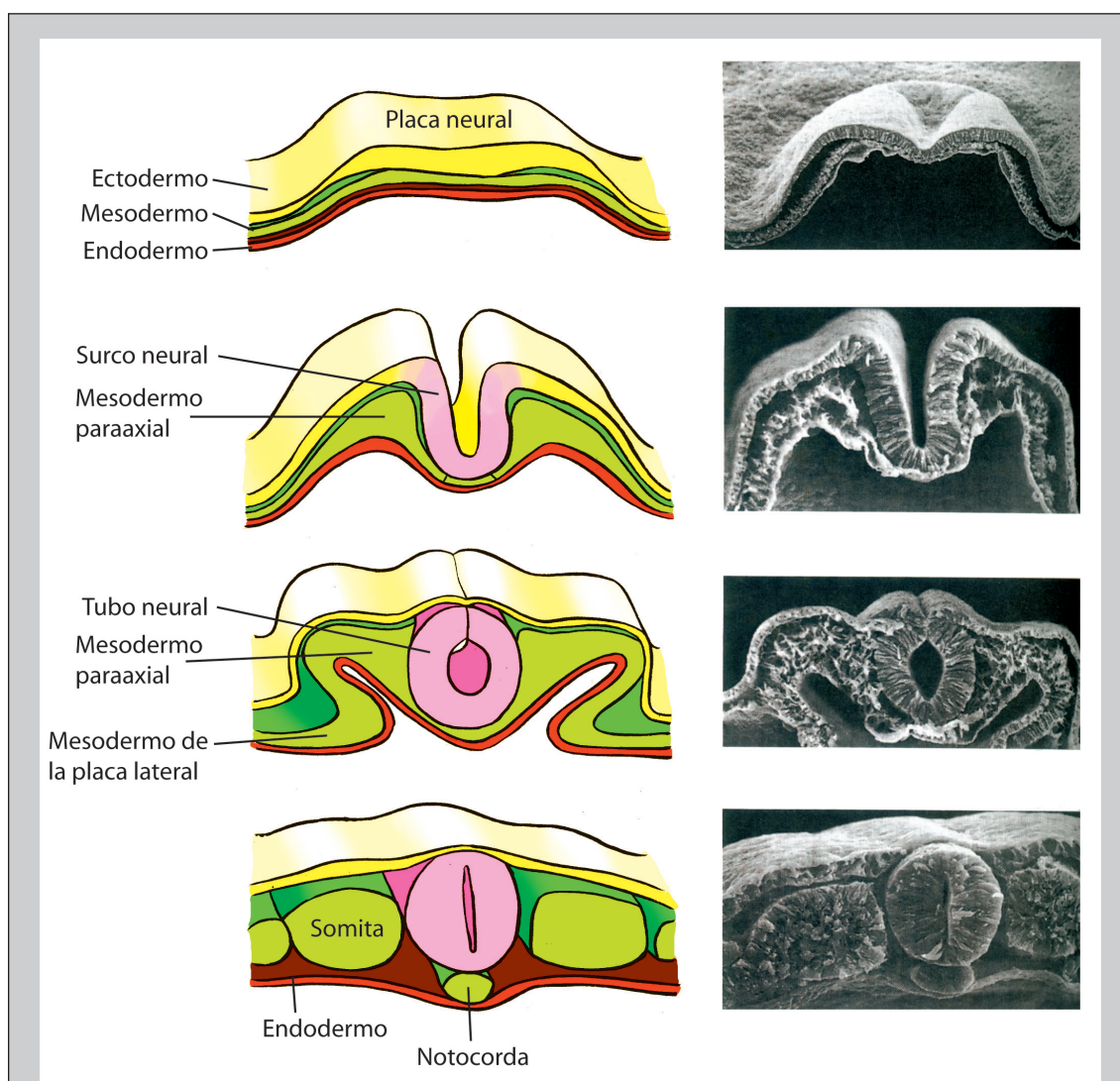
# INTRODUCCIÓN



## 1.1 DESARROLLO CELULAR DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso se origina a partir del ectodermo durante la fase embrionaria. Este proceso es conocido como neurulación y tiene como inicio la invaginación de la blástula, que origina la placa neural. Esta placa se pliega formando una estructura alargada y hueca denominada tubo neural que está compuesto por una capa de células neuroepiteliales, los neuroblastos o células madre neurales (esquema 1).

Durante el desarrollo las células madre neurales dan lugar a todas las células del sistema nervioso central, neuronas, células macrogliales del SNC, astrocitos y oligodendrocitos.



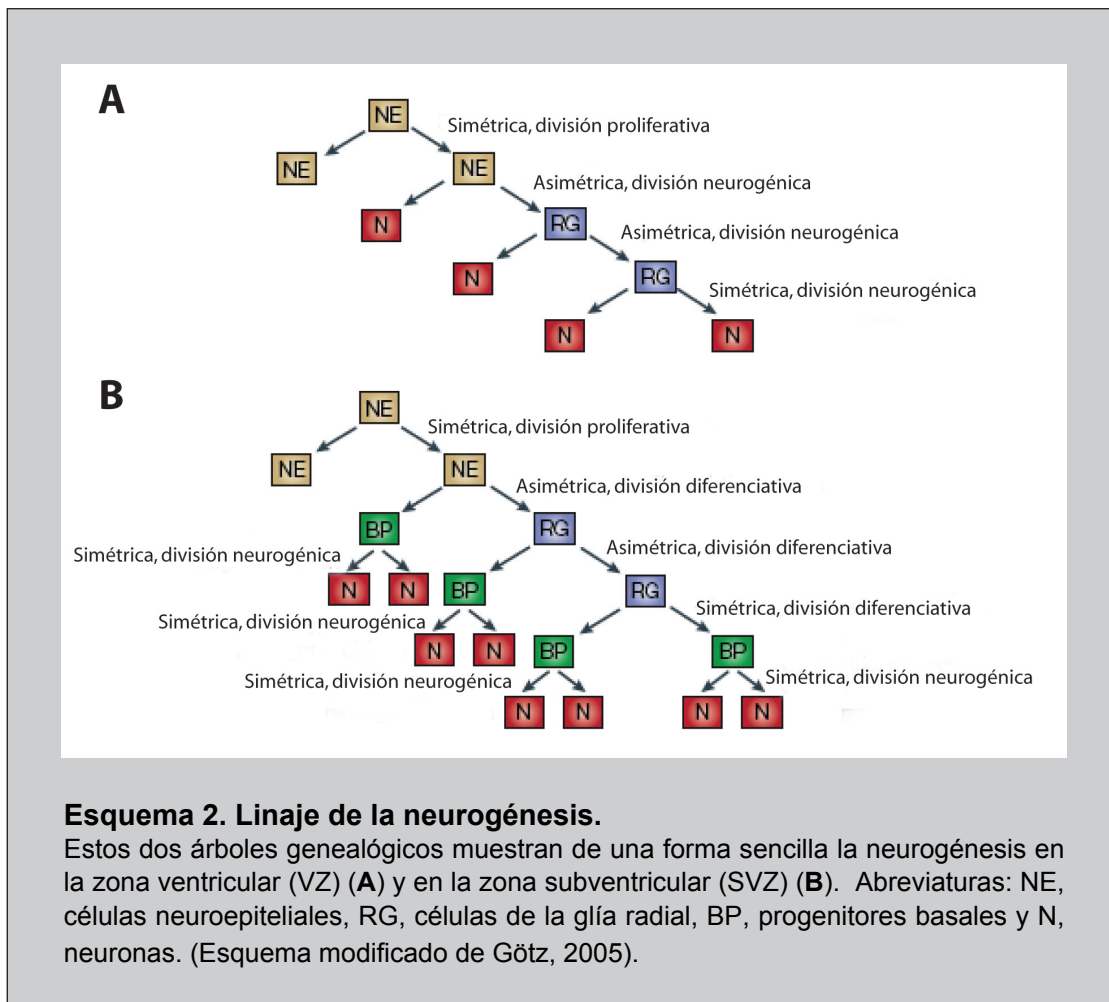
**Esquema 1. Formación del tubo neural.**

Cambios morfológicos que tienen lugar durante la neurulación.

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

### 1.1.1 Células madre neurales y progenitores celulares

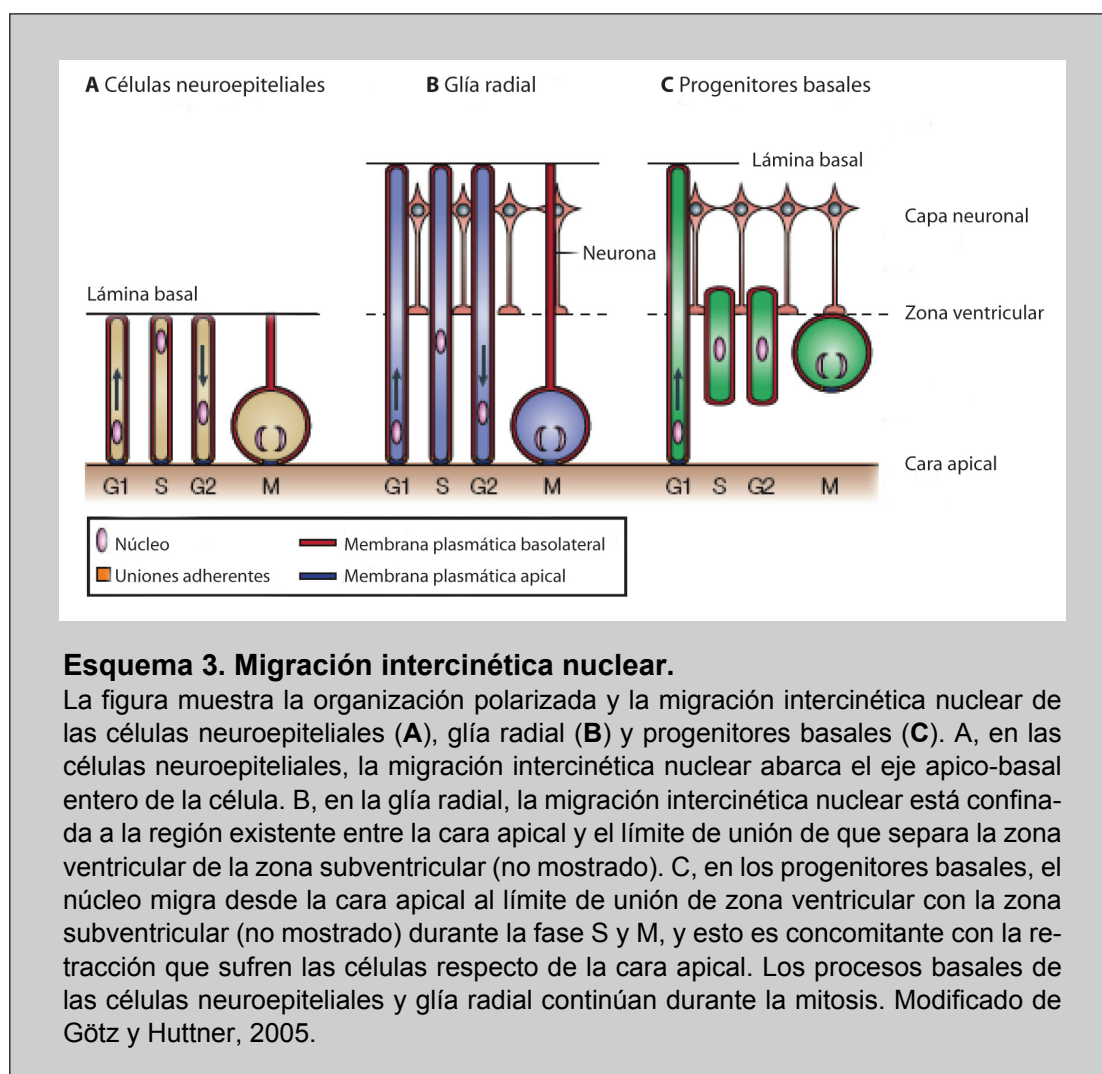
Se aplican dos criterios para definir una célula como célula madre, es decir, multiplicidad para un número ilimitado de divisiones celulares y multipotencialidad, que es la capacidad de generar diferentes tipos de células diferenciadas. La multiplicidad puede ocurrir tanto por divisiones simétricas, generando dos células totalmente iguales, o asimétricas, produciendo una célula que es idéntica a la madre y una segunda de diferente tipo celular. Estas divisiones asimétricas pueden dar lugar a una neurona o un progenitor celular (esquema 2).





De acuerdo con estas características, en el SNC podemos distinguir:

**Células Neuroepiteliales.** Antes de la neurogénesis la placa neural y el tubo neural está compuesto por una única capa de células, las células neuroepiteliales, las cuales forman el neuroepitelio. El neuroepitelio parece estar pseudoestratificado porque el núcleo de las células neuroepiteliales migra arriba y abajo en el eje apico-basal durante el ciclo celular (migración intercinética nuclear) (esquema 3) (Gotz y Huttner 2005).



Las células neuroepiteliales están altamente polarizadas a través de su eje apico-basal debido a la organización de su membrana plasmática. Proteínas de membrana tales como la prominina-1 o las uniones estrechas “tight junctions” y adherentes “adherens junctions”, están presentes en la cara apical de la membrana plasmática; mientras que algunos receptores, tales como la integrina  $\alpha 6$  están concentrados en la lámina basal.

**Glía radial.** Con la generación de neuronas el neuroepitelio se transforma en un tejido con numerosas capas. La capa que linda con el ventrículo (capa más apical que contiene la mayoría de progenitores celulares) es la denominada zona ventricular. Cuando se inicia la neurogénesis, las células neuroepiteliales disminuyen la expresión de ciertas características epiteliales y el reparto apico-basal de ciertas proteínas de la membrana plasmática. Concomitantemente, aparecen en ellas características astrogliales. En esencia, después del comienzo de la neurogénesis, las células neuroepiteliales dan lugar a un tipo de células distintas (glía radial) que exhiben propiedades residuales neuroepiteliales, como la intercinética nuclear, aunque también las astrogliales. Como consecuencia de esto, la mayoría de neuronas del cerebro derivan, directamente o indirectamente, de las células de la glía radial (Gotz y Huttner 2005).

En términos de potencialidad, a diferencia de las células neuroepiteliales, la mayoría de la glía radial no se autorenewa y está restringida a la generación de determinados tipos celulares, tales como astrocitos, oligodendrocitos y, en la mayoría de los casos, da origen a neuronas.

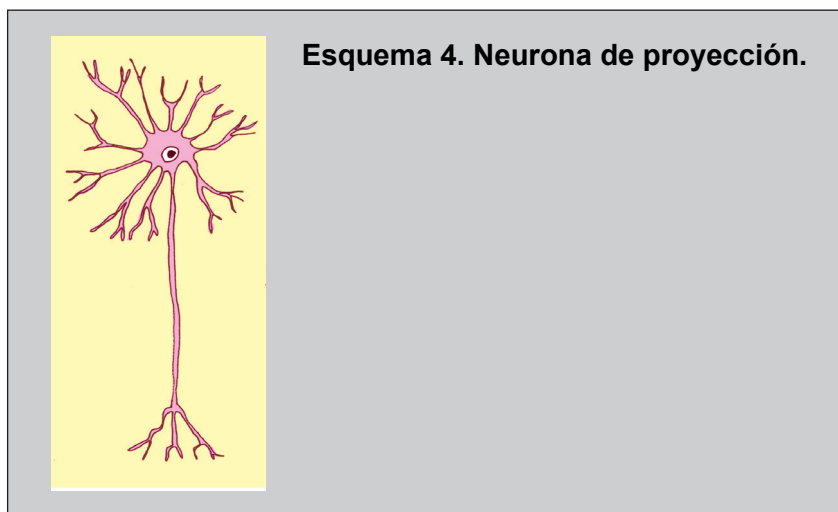
**Progenitores basales o de la zona subventricular.** Junto con la glía radial, aparece otro tipo de progenitores neuronales que contribuyen a la neurogénesis, llamados progenitores basales. Proceden de las células neuroepiteliales y de la glía radial. Los progenitores basales se diferencian de las células neuroepiteliales y de la glía radial, en que su núcleo migra de la cara apical a la basal durante la fase S hasta la M originando células que se retraen de la cara apical. Debido a esto, durante las etapas tardías de la neurogénesis, los progenitores basales forman la zona subventricular, una capa de células mitóticas, basal a la zona ventricular (Gotz y Huttner 2005). Los progenitores basales contribuyen a la neurogénesis mediante la división celular simétrica generando dos células hijas neuronales.

### 1.1.2 Neuronas de la corteza cerebral

En la corteza cerebral se han descrito decenas de tipos neuronales atendiendo a su morfología. A pesar de esta diversidad, las neuronas de la corteza se pueden agrupar en dos clases principales: las neuronas excitadoras, la mayoría de las

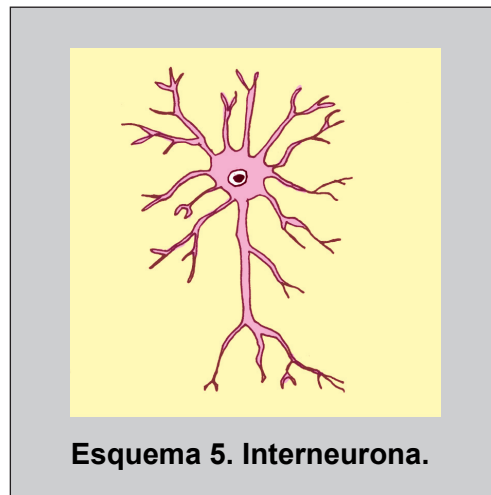
cuales tienen morfología piramidal y son también denominadas neuronas de proyección o células piramidales, y las neuronas inhibitorias, también conocidas como interneuronas (DeFelipe y Farinas 1992). Las neuronas excitadoras utilizan como neurotransmisor el glutamato (Thomson y Deuchars 1994); por el contrario, las interneuronas emplean el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor principal (McCormick 1989; Thomson y col. 1996). En los últimos años se ha puesto de manifiesto que el funcionamiento de los circuitos corticales requiere la perfecta coordinación de las neuronas excitadoras y de las inhibitorias (McBain y Fisahn 2001).

**Neuronas glutamatérgicas.** La mayor parte de las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral son piramidales ([esquema 4](#)). Constituyen alrededor del 80% del total de la población neuronal de la corteza cerebral y se encuentran en todas las capas corticales excepto en la capa I. Una neurona piramidal típica se caracteriza por tener un cuerpo celular con forma piramidal de cuyo polo apical emerge una prominente dendrítica apical que 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 localizadas en capa IV y alguna de capa V no la alcanzan. La superficie dendrítica está cubierta de espinas. 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”. Aunque poseen una morfología similar, las neuronas piramidales de las diferentes capas se diferencian entre ellas por su árbol dendrítico, la densidad de sus espinas, el patrón de colaterales axónicos y el lugar hacia donde proyectan.



Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

**Interneuronas GABAérgicas.** Las interneuronas (esquema 5) o neuronas inhibitorias representan aproximadamente el 20% del total de las neuronas corticales. Constituyen un grupo altamente heterogéneo de células con una gran diversidad morfológica, fisiológica, molecular y sináptica (DeFelipe 1997; Kawaguchi y Kubota 1996; Markram y col. 2004). A pesar de esta enorme diversidad, las interneuronas también tienen propiedades comunes: así carecen de espinas dendríticas, pueden recibir sinapsis tanto inhibitorias o excitatorias en su soma, dendritas y axón, y tanto su axón como su árbol dendrítico se encuentran siempre confinados en la neocorteza (Kawaguchi y Kubota, 1996). Aunque con frecuencia el axón de las interneuronas GABAérgicas contacta con neuronas situadas en su proximidad, se han descrito algunas poblaciones de neuronas GABAérgicas con largas proyecciones hacia otras zonas de la corteza (Somogyi y Klausberger 2005).



### 1.1.3 Células gliales

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

**Astrocitos.** Los astrocitos son la glía mayoritaria del SNC. Constituyen una población celular muy heterogénea, habiéndose clasificado en astrocitos protoplasmáticos y astrocitos fibrosos. Los protoplasmáticos son más grandes, poco ramificados y se localizan, fundamentalmente, en la sustancia gris. Los fibrosos son más ramificados y se localizan en la sustancia blanca. Además, desde el punto de vista inmunocitoquímico, los astrocitos se han clasificado como astrocitos tipo-1 y astro-

citosis tipo-2 (Raff 1989). Esta clasificación se ha realizado en astrocitos en cultivo primario. De hecho, la presencia de astrocitos tipo-2 *in vivo* es controvertida, detectándose en las proximidades de los nódulos de Ranvier, por lo que se han considerado funcionalmente como astrocitos fibrosos de las fibras mielínicas (French-Constant y col. 1996). También se han detectado astrocitos tipo-2 en las lesiones cerebrales producidas por la epilepsia experimental inducida por ácido kaínico (Niquet y col. 1994; Represa y col. 1993).

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

Los astrocitos disponen de apéndices bastante largos, algunos de los cuales forman los pies terminales que rodean los capilares cerebrales. A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, las células endoteliales de los capilares cerebrales están fuertemente conectadas por las uniones estrechas “tight junctions” lo que impide la diapédesis y el paso indiscriminado de solutos. De hecho, los astrocitos inducen en las células endoteliales la formación de estas uniones, así como la síntesis de los transportadores y de las enzimas característicos de la BHE (Janzer y Raff 1987). La principal función de la BHE es regular el movimiento de nutrientes y de otras moléculas entre la sangre y el cerebro.

**Oligodendrocitos.** Los oligodendrocitos constituyen el otro subgrupo más importante de la macroglía. Se distinguen morfológicamente de los astrocitos por sus pequeños cuerpos celulares, en los que el núcleo ocupa una gran proporción de volumen. Como su propio nombre indica tienen, relativamente, pocos apéndices, de los que surge una extensa red de finísimas ramificaciones y membranas en forma arborescente. El principal papel de los oligodendrocitos es formar y mantener la vaina de mielina alrededor de los axones en el SNC. La mielina es la membrana de los oligodendrocitos en su mayor grado de diferenciación. Está compuesta, aproximadamente, por un 30% de proteínas y un 70% de lípidos. Este enriquecimiento carac-

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

terístico en lípidos se debe, sobre todo, al colesterol, los cerebrósidos y la fosfatidiletanolamina (Bradford 1986). Parece ser que la clave del aislamiento efectivo de los axones por la mielina es el alto grado de compactación de las capas de mielina, que excluye el fluido extracelular (Bradford 1986).

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

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

## 1.2 DESARROLLO NEURONAL DEL SNC

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

### 1.2.1 Neurogénesis

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 y Takahashi 1995) y en la rata comienza el día 13 y finaliza el día 19 de la gestación (Gohlke y col. 2004). 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 necesiten un período largo de adaptación al medio para poder ejercer funciones altamente especializadas, como son la memoria, el aprendizaje, etc (Rakic 1985). Sin embargo, para una misma especie animal, el período de proliferación neuronal depende de la región del SNC (Bayer 1995). Así, por ejemplo, en el hipocampo de la rata el número de neuronas sigue aumentando hasta el primer año de vida postnatal (Herschkowitz 1988).

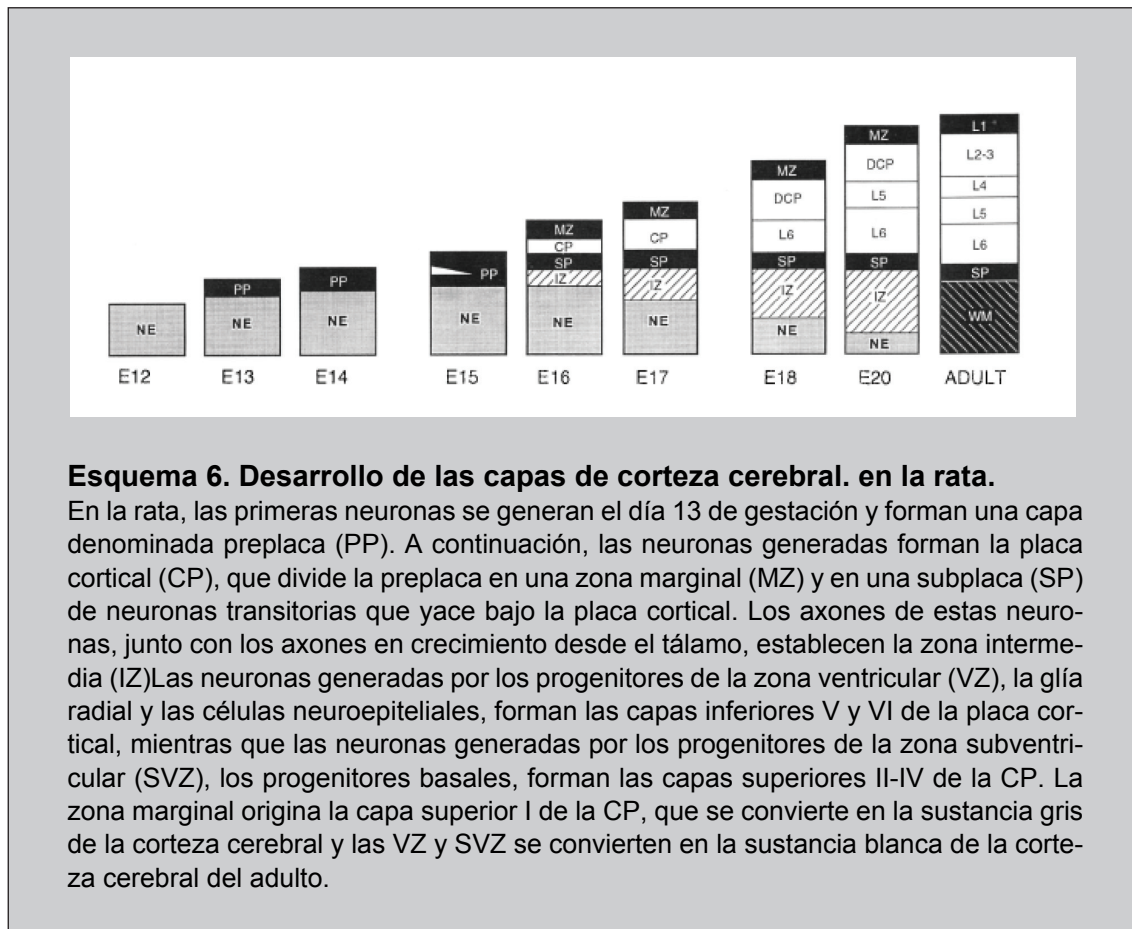
La mayor parte de las neuronas corticales se generan en el epitelio pseudoestratificado que limita las cavidades ventriculares del tubo neural. Este epitelio se conoce como zona ventricular (VZ). Existe además una población proliferativa secundaria, que incluye progenitores localizados en la zona subventricular (SVZ) y en la zona intermedia, según la denominación del Comité Boulder (1970).

Existen tres gradientes neurogénicos durante el desarrollo de la corteza cerebral: radial, medio-lateral y antero-posterior (Bayer y Altman 1991). Radialmente la corteza se organiza de forma que las neuronas que nacen primero ocupan posiciones más profundas respecto a las que nacen posteriormente (McConnell 1988; Rakic 1974). A este gradiente también se le conoce como patrón de neurogénesis de

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

dentro hacia fuera. Además, se ha descrito que las neuronas que se originan en las regiones laterales de la corteza se desarrollan antes que aquellas que lo hacen en regiones más mediales. Lo mismo ocurre con las regiones anteriores respecto de las posteriores.

En el ratón la actividad neurogénica de la VZ se extiende durante siete días, iniciándose el día embrionario (E) 11 y finalizando en E17 (Takahashi y col., 1995b). En la rata este periodo se encuentra retrasado dos días, transcurriendo entre E13-19 (esquema 6). Sin embargo, la duración del ciclo celular no es constante a lo largo del período embrionario, ya que la fase G1 tiene una mayor duración en los estadios más tardíos. Este hecho explica que la tasa de proliferación sea menor en las últimas etapas del desarrollo que en las etapas iniciales (Takahashi y col. 1995b).



La multipotencialidad presente en los estadios tempranos de la neurogénesis se pierde con el tiempo (Desai y McConnell 2000). Además se ha observado que esta potencialidad de los progenitores está limitada a las primeras etapas del ciclo celular.



En la VZ de la corteza se han identificado dos tipos de precursores corticales: las células de glía radial (RGC) (Miyata y col. 2001; Noctor y col. 2001; Noctor y col. 2002) y las células neuroepiteliales (Gotz y Huttner 2005). Las células progenitoras de la SVZ, es decir, los progenitores basales (BP), se forman a partir de la zona ventricular desde E13 en ratón y E15 en rata y su periodo neurogénico se extiende desde E14 a E16 en ratón y E16 a E19 o 20 en la rata, considerándose este periodo como la segunda neurogénesis embrionaria (Campbell 2005). Los progenitores de la zona ventricular y la zona subventricular expresan diferentes genes (Gal y col. 2006; Molyneaux y col. 2007), y estas diferencias parecen estar relacionadas con la progenie neuronal a la que dan lugar. Así, se ha postulado que los progenitores de la SVZ generarían neuronas de capas superficiales que expresan los genes *Cux2*, *Tbr2* y *Svet1*, mientras los progenitores de la VZ darían lugar a neuronas de capas profundas que expresan los genes *Otx1* y *Fez1* (Dehay y Kennedy 2007). Otros autores sugieren que la expresión diferencial de estos genes se debe a una progresiva especificación de las neuronas en su viaje a la placa cortical. Según esta hipótesis, las células expresarían de forma secuencial los diferentes factores de transcripción en su proceso de maduración de forma independiente del precursor del que procedan (Hevner y col. 2006).

La neurogénesis en el cerebro no sólo se ve restringida a la etapa del desarrollo, también en el adulto se conocen nichos neurogénicos como son la SVZ, la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (Ihrle y Álvarez-Buylla 2008).

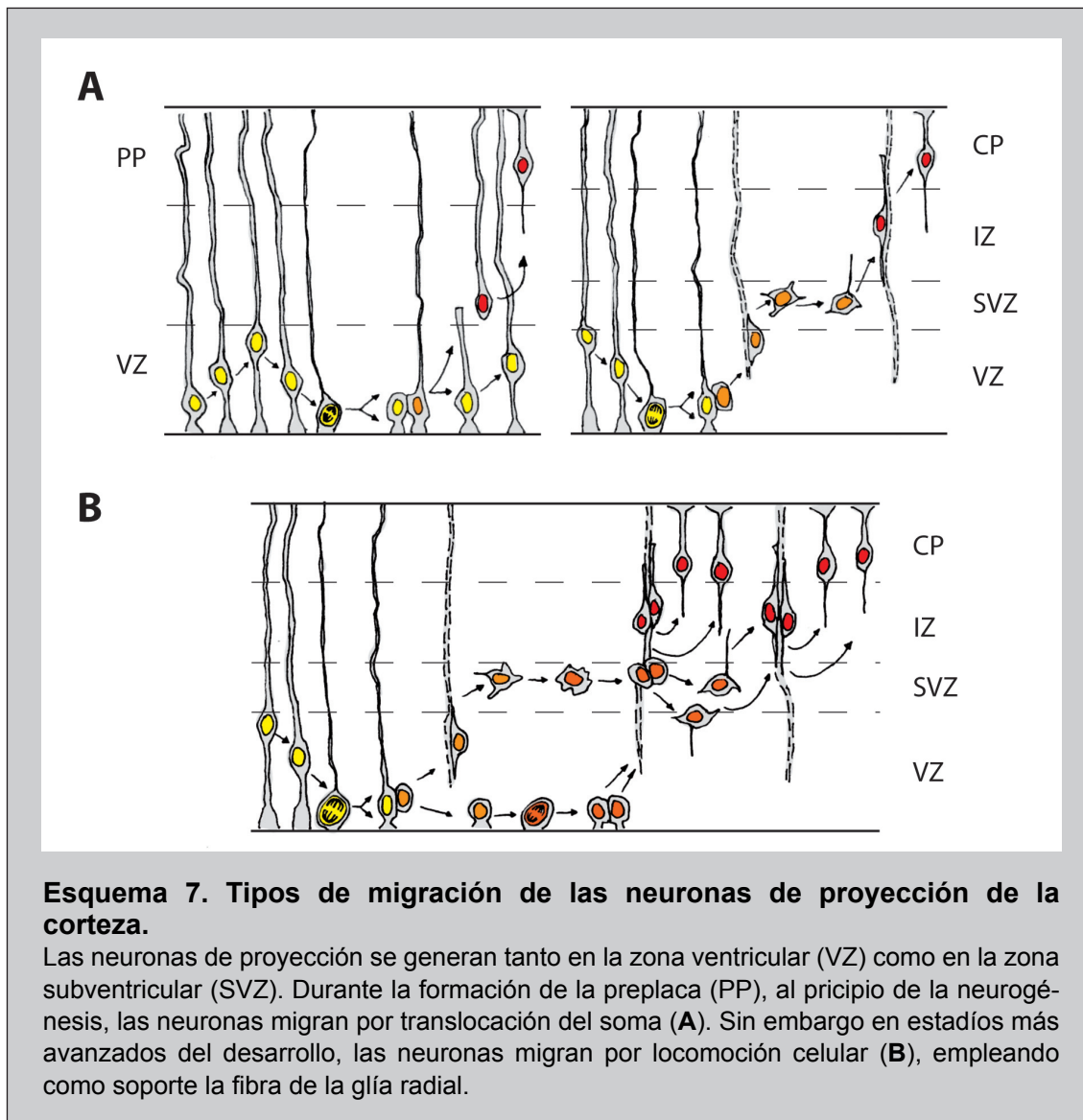
### 1.2.2 Migración neuronal

Tal y como se ha mencionado antes, las neuronas se pueden agrupar, principalmente, en dos clases: neuronas de proyección o piramidales e interneuronas o neuronas de circuito local.

Tanto los estudios clásicos como los más recientes coinciden en que las neuronas de proyección de la corteza cerebral se originan, principalmente, en la zona ventricular de la región dorsal del encéfalo (pallio) y migran radialmente a través de la zona intermedia de la corteza hasta alcanzar su posición definitiva en la placa cortical (Angevine y Sidman 1961; Nadarajah y col. 2001). La migración radial de las

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

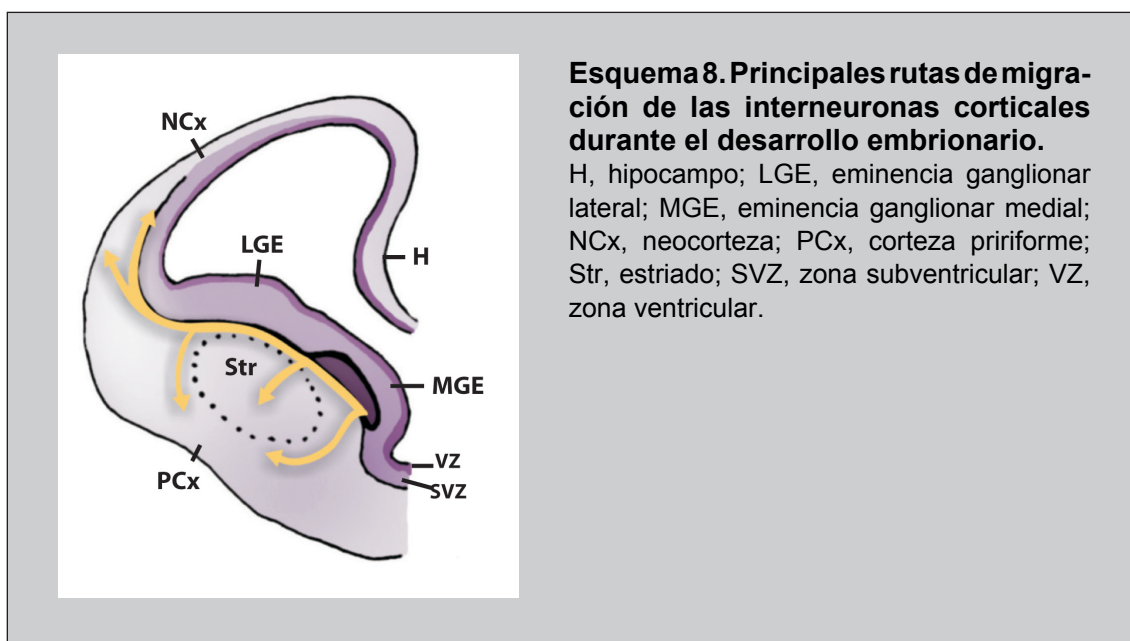
neuronas de proyección permite la transferencia de información topográfica desde la capa ventricular hasta la placa cortical. Así, la información derivada de la posición está determinada por su origen en la zona ventricular, progenitores corticales adyacentes dan lugar a neuronas de proyección que se sitúan próximas en la placa cortical, habitualmente en la misma columna cortical (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 y col. 1991), si bien durante las primeras fases del desarrollo cortical la migración radial parece ser independiente de la glía radial (Nadarajah y Parnavelas 2002) (esquema 7).



Durante mucho tiempo se pensó que las interneuronas corticales que se originan en la zona ventricular del palio y que se desplazan hasta alcanzar su posición definitiva, lo hacían mediante migración radial al igual que las neuronas de proyec-

ción. Sin embargo, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la migración radial no es el único modo de desplazamiento celular en la corteza cerebral, ya que la existencia de células orientadas de forma tangencial en la zona intermedia de la corteza en desarrollo sugiere que no todas las células corticales se desplazan de forma radial.

La idea de que son las interneuronas las que migran tangencialmente durante el desarrollo de la corteza procede de estudios inmunohistoquímicos y de marcaje con bromo-deoxiuridina (BrdU) (DeDiego y col. 1994; Van Eden y col. 1989). Esta hipótesis se confirmó cuando experimentos de clonaje celular demostraron que las neuronas corticales con migración radial y las neuronas corticales con migración tangencial proceden de diferentes linajes celulares (Mione y col. 1997; Tan y col. 1998). Además ningún estudio precedente investigó el origen de las interneuronas corticales y por lo que se asumía implícitamente que se originaban en las zonas proliferativas del palio, al igual que las neuronas proyección. El primer trabajo que mostró que las interneuronas corticales procedían del subpalio, región ventral del telencefalo, data de 1996 (de Carlos y col. 1996). Dicho trabajo describe como las interneuronas corticales se originan en el subpalio y se dispersan tangencialmente en la corteza embrionaria. Estudios más recientes han confirmado que el subpalio es el origen de interneuronas que finalmente residen en todas las áreas corticales, incluidas la neocorteza, el hipocampo o la corteza piriforme (Pleasure y col. 2000; Wichterle y col. 1999) (esquema 8).



Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

Existe una serie de factores que participan en la migración de estas neuronas, como son: los factores génicos, promovidos por neurotrofinas como NT4 y BDNF (Polleux 2002), los sustratos extracelulares como TAG-1 (Denaxa 2001), con los que ciertas neuronas interaccionan con sus axones en su recorrido (migración axonofílica) y los factores guía, que pueden tener actividad quimioattractiva, como neurorregulina-1 (Marín y Rubenstein 2001), o quimiorrepulsiva, como las semaforinas de clase III (de Castro 1999; Marín y Rubenstein 2001).

### 1.2.3 Agregación celular

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

### 1.2.4 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 el agrupamiento de los cuerpos neuronales formando acumulaciones de las que parten radialmente las neuritas. Esta distribución da lugar a la disposición en materia blanca y materia gris que adoptan las neuronas en el SNC y a la adquisición de la propiedad de propagar potenciales de acción. En la rata, el proceso de diferenciación neuronal comienza prenatalmente y 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 y Timiras 1982).

En las neuronas existen unas zonas que Ramón y Cajal denominó conos de crecimiento, donde se originan las dendritas y los axones (Caviness 1989; Herschkowitz

1988). Los conos de crecimiento guían a los axones, convirtiendo las señales positivas y negativas en órdenes que determinan el trayecto y la rapidez de crecimiento del axón. La sensibilidad del cono de crecimiento depende, en gran medida, de sus filopodios. Los filopodios son estructuras ricas en actina, muy móviles, que poseen receptores para moléculas que sirven como señales de dirección al axón (Sanes y Jessell 2001).

Es necesaria la presencia de un “sustrato permisivo” que permita el avance de los conos de crecimiento. Los conos de crecimiento reconocen diferencias entre los sustratos en los que crecen y esto puede regular la dirección y la velocidad de su crecimiento. Se han identificado numerosas sustancias capaces de favorecer el crecimiento *in vitro* de los axones, tales como el colágeno, la fibronectina y algunos proteoglicanos. Son de especial importancia las lamininas, componentes de todas las láminas basales de los seres vivos. Los conos de crecimiento poseen una serie de proteínas (integrinas) capaces de interactuar con las lamininas de la matriz extracelular (Raper y Tessier-Lavigne 1999) y transmitir esta información al interior de la célula.

La unión con el sustrato permisivo no es suficiente para que se produzca el desarrollo de las neuronas inmaduras. Algunos neuropéptidos, como la somatostatina, la colecistoquinina, la sustancia P o el péptido intestinal vasoactivo, parecen estar estrechamente relacionados con los fenómenos de elongación axónica y de interconexión celular (Hayashi 1992). Por otro lado, el NGF (factor de crecimiento nervioso), neurotransmisores como la serotonina, la dopamina o la acetilcolina, así como la interacción con células gliales, también parecen estar implicados en este proceso (Hatten y Mason 1986; Ivins y Pittman 1989; Vernadakis 1988). Los axones de larga proyección tienden a crecer juntos en un fascículo común. La fasciculación de los axones está favorecida por la presencia de N-CAM (molécula de adhesión celular neuronal) (Caviness 1989).

Durante la diferenciación neuronal se activan los procesos de síntesis de RNA y de proteínas, aumenta la actividad de ciertas enzimas tales como la acetilcolinesterasa, la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa, la tirosina hidroxilasa, la GABA transaminasa, etc. Asimismo

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

mo, aumenta la actividad de las enzimas de la glucólisis, del ciclo tricarboxílico y de la síntesis de lípidos (Meisami y Timiras 1982).

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

#### 1.2.4.1 GAP-43, proteína asociada al crecimiento

Durante los procesos de crecimiento neuronal, tanto durante el desarrollo neuronal como en procesos de regeneración, la expresión de GAP-43 es máxima y se encuentra limitada al sistema nervioso, siendo, así, considerada marcadora de la diferenciación axonal (Benowitz y Routtenberg 1997; Oestreicher y col. 1997; Skene 1989) ([esquema 9](#), ver más adelante). 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 y Routtenberg 1997).

La GAP-43 se localiza fundamentalmente en los axones en crecimiento y, sobre todo, en los conos de crecimiento uniéndose a la membrana mediante interacción con la F-actina, formando, así, la estructura interna de los axones (Oestreicher y col.

1997; Skene y Virág 1989). En el ratón, la GAP-43 alcanza su máxima expresión el día 4 de vida postnatal en el SNP y en las dos primeras semanas de vida postnatal en el SNC. A partir de este momento cae su expresión, aunque en ciertas poblaciones de neuronas se detecta la GAP-43 en estadios posteriores (Benowitz y Routtenberg 1997; Oestreicher y col. 1997). En la rata se ha descrito que el momento de máxima expresión de la GAP-43 sucede durante la primera semana postnatal (Dani, 1991; Velasco, 2003).

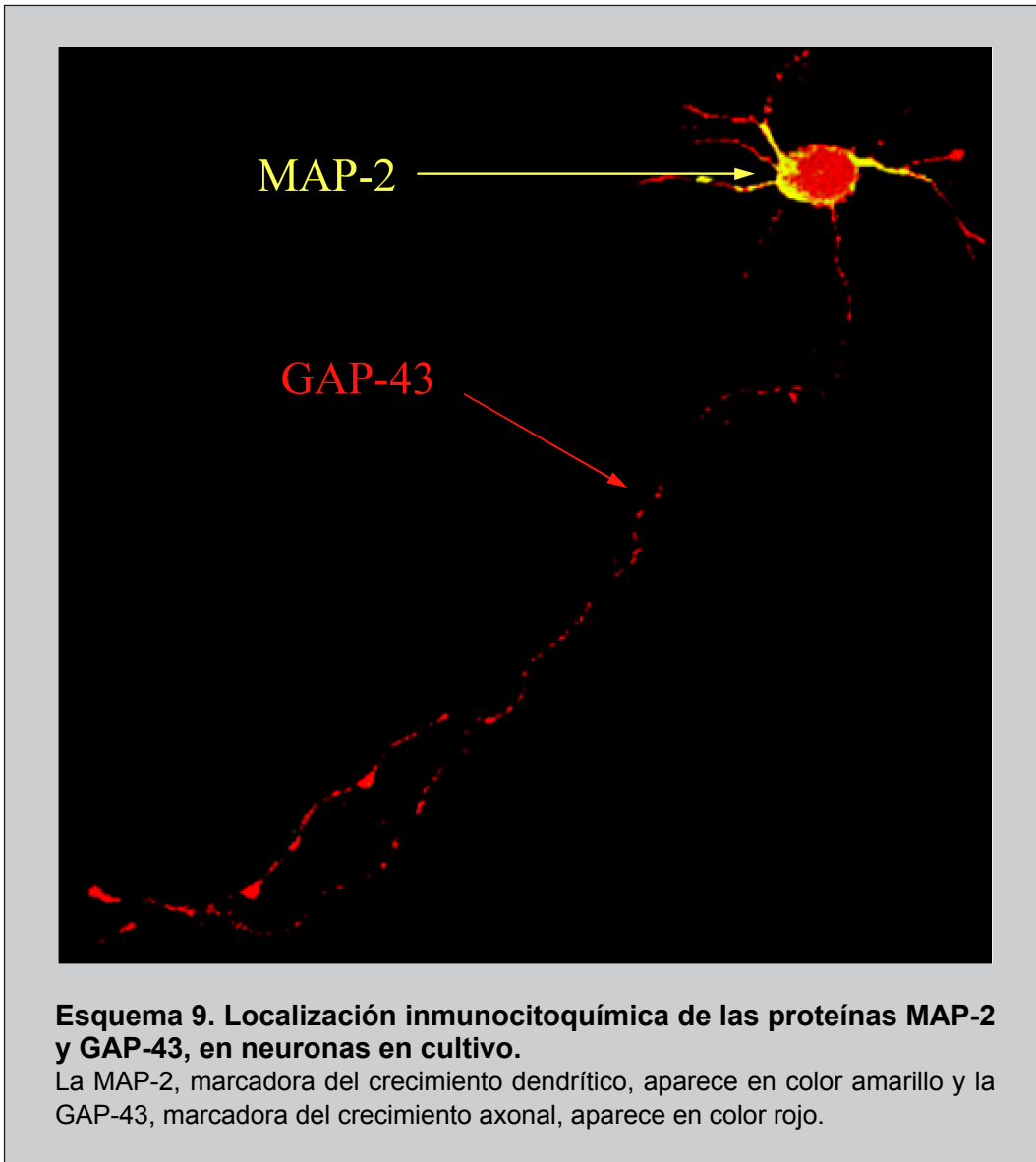
La expresión del gen de la GAP-43 está muy restringida en las células neurales. La regulación de la actividad del promotor de la GAP-43 está mediada por una serie de factores de transcripción, miembros de la familia bHLH. Estos factores de transcripción se unen a la caja E1, localizada en el promotor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

Una de las características estructurales más sorprendentes de la GAP-43 es su extrema hidrosolubilidad, hecho que no es habitual en una proteína asociada con membranas. Se sintetiza como proteína soluble y su asociación a la membrana probablemente está mediada por unión covalente de la región hidrofóbica del extremo amino-terminal a ácidos grasos. Esta región contiene un dominio activador de la proteína G. En la parte intermedia existe el denominado dominio IQ, compuesto por 12-15 aminoácidos, que constituye el sitio de unión a calmodulina. Además, en la parte intermedia existe un sitio de fosforilación para la proteína G, en la serina 41 que, a su vez, regula la unión de la GAP-43 a calmodulina. En el extremo carboxilo-terminal se localiza el motivo F, el cual interacciona con los componentes del citoesqueleto (Skene y Virág 1989).

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

### 1.2.4.2 MAP-2, proteína asociada a microtúbulos

Las proteínas MAP-2 se expresan en el sistema nervioso, siendo unas de las proteínas más abundantes en el cerebro (Olmsted 1986; Schoenfeld y Obar 1994). La MAP-2 tiene varias isoformas, formadas a partir de un único gen por splicing alternativo del pre-mRNA (Maccioni y Cambiazo 1995). Dentro del sistema nervioso, las MAP-2 de alto peso molecular, MAP-2a y MAP-2b (~300 kDa), se expresan específicamente en las dendritas de las neuronas (Schoenfeld y Obar 1994) y raramente en los axones, por lo que se pueden considerar proteínas marcadoras de la diferenciación dendrítica neuronal (Cáceres y col. 1984; Cáceres y col. 1986; Dinsmore y Solomon 1991) (esquema 9). Estas isoformas difieren en su patrón de expresión durante el desarrollo cerebral. En fases embrionarias y hasta el día 10 de vida postnatal, la





única MAP-2 de alto peso molecular que se expresa en el cerebro es la MAP-2b. La MAP-2a aparece en etapas más tardías del desarrollo, expresándose mayoritariamente en el cerebro adulto.

Todas las MAP-2 tienen, en la región carboxilo terminal, un dominio de unión a la tubulina y, además, una región rica en prolina. Se piensa que la región carboxilo-terminal de la molécula de MAP-2 está fuertemente unida a los microtúbulos, mientras que el resto de la molécula se proyecta fuera de la superficie de los microtúbulos como brazo, por lo que se le denomina “dominio de proyección” (Sánchez y col. 2000). Además de asociarse a los microtúbulos para estabilizarlos y promover su ensamblaje, la MAP-2 ejerce un importante papel en el crecimiento de las neuritas (Woolf 1998). Otras funciones de la MAP-2 se resumen en su participación en la morfogénesis neuronal, en la dinámica del citoesqueleto, en el empaquetamiento de los microtúbulos y en el tráfico de orgánulos en los axones y las dendritas (Dinsmore y Solomon 1991).

Los patrones de expresión diferencial de las isoformas de MAP-2 y sus mRNAs durante el desarrollo del sistema nervioso, pueden indicar una compleja regulación de su expresión, tanto a nivel transcripcional o post-transcripcional como traduccional (Sánchez y col. 2000). Hasta el momento, los mecanismos de regulación post-traduccional de MAP-2 son mucho mejor conocidos que la regulación de la expresión de la proteína a otros niveles.

La MAP-2 es modificada post-traduccionalmente en las neuronas durante el desarrollo, por fosforilación y desfosforilación provocadas por ciertas señales extracelulares (Avila y col. 1994). Estas modificaciones condicionan la capacidad de la MAP-2 para unirse a los microtúbulos y estabilizarlos. Se ha sugerido que la asociación de las MAPs con kinasas y fosfatasas puede ser esencial para su anclado al citoesqueleto, así como para su direccionamiento hacia compartimentos específicos neuronales, donde pueden desempeñar sus funciones específicas (Tsunoda y col. 1998). Es necesario un equilibrio kinasas/fosfatasas para el adecuado recambio y dinámica de los microtúbulos y, en consecuencia, para una función neural satisfactoria. Así una hiperfosforilación de las MAP-2 causa su liberación de los microtúbulos, provocando la retracción neurítica e, incluso, la muerte neuronal a largo plazo (Arias y

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

col. 1998). Entre las diversas proteínas kinasas que pueden fosforilar la MAP-2 están la proteína kinasa A (PKA), la proteína kinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII), la PKC y las proteínas kinasas dirigidas por prolina. La desfosforilación de la MAP-2 se lleva a cabo por diversas serina-treonina fosfatasas, tales como las PP1, 2A, 2B (calcineurina) y 2C. Estas fosfatasas están muy concentradas en cerebro y se encuentran asociadas al citoesqueleto. Se cree que las fosfatasas juegan un papel esencial en la regulación de la plasticidad neuronal y en la transmisión sináptica (Sánchez y col. 2000).

### 1.2.5 Sinaptogénesis

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

Entre los factores que pueden estimular la sinaptogénesis se encuentra la serotonina. En este sentido, se ha observado que algunos neurotransmisores, como el GABA y la serotonina, aumentan el desarrollo de neuropilos y de las sinapsis en neuronas en cultivo (Hamon y col. 1989; Madtes y Redburn 1983; Reisert y col. 1989). Asimismo, conviene señalar que, durante el establecimiento de las sinapsis, se produce un incremento en el metabolismo oxidativo cerebral y aumenta la síntesis de fosfolípidos y de colesterol (Bayer 1985; Meisami y Timiras 1982). El colesterol juega, aparentemente, un papel clave en la sinaptogénesis. Durante este proceso, en el que se requieren elevadas cantidades de colesterol, su síntesis en las neuronas decrece (Poirier 1994). Sin embargo, las células de la glía sintetizan y aportan a las neuronas el colesterol necesario. La disponibilidad de colesterol parece ser el factor limitante para el desarrollo de las sinapsis maduras. Esto explica el retraso en la producción de sinapsis en el SNC en espera de la diferenciación de la glía, así como los efectos patológicos que se manifiestan por alteraciones en la homeostasis del colesterol o las lipoproteínas (Mauch y col. 2001). Se cree que en la sinapsis existe, además, una im-

portante transferencia bidireccional de sustancias esenciales para la supervivencia y el normal funcionamiento de las células presinápticas y postsinápticas como, por ejemplo, el NGF (Cowan 1987).

### 1.2.6 Muerte neuronal

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

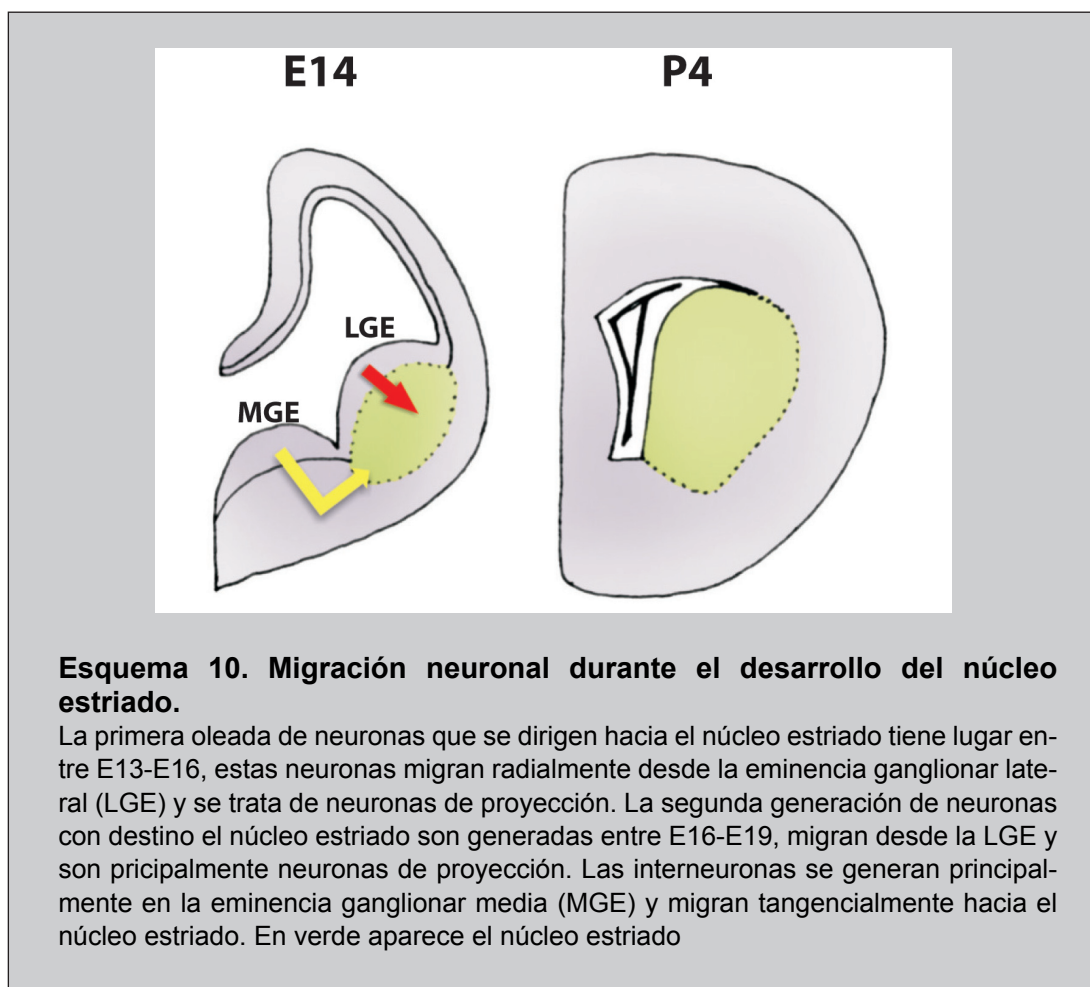
La muerte neuronal por apoptosis es frecuente durante el desarrollo del SNC, en que se genera un gran número de neuronas de las que apenas la mitad van a sobrevivir. Esta pérdida tan elevada de neuronas es común a todos los vertebrados y parece ser un mecanismo de adaptación durante el desarrollo del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

## 1.3 DESARROLLO DEL NÚCLEO ESTRIADO

El núcleo estriado se desarrolla a partir de las eminencias ganglionares localizadas en el telencefalo (Olsson y col. 1998). La eminencia ganglionar lateral (LGE) es la principal fuente de las neuronas estriatales (Campbell y col. 1995; Deacon y col. 1994) y contiene progenitores tanto de las neuronas GABAérgicas de proyección como de interneuronas estriatales que colocalizan con GABA y somatostatina. En la

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

LGE también se encuentran progenitores de las interneuronas destinadas al bulbo olfativo (Deacon y col. 1994; Stenman y col. 2003; Wichterle y col. 2001). La eminencia ganglionar medial (MGE) contiene progenitores de interneuronas destinadas al núcleo estriado, tanto colinérgicas como GABAérgicas, así como a la corteza cerebral, hipocampo y globus pallidus (Marin y Rubenstein 2001; Wichterle y col. 2001). La eminencia ganglionar caudal da lugar a gran diversidad de neuronas que migrarán al núcleo estriado caudal (Nery y col. 2002) (esquema 10). En este sentido, se ha descrito que las neuronas que suplen al estriado durante su formación migran tanto de forma radial como de forma tangencial (Hamasaki y col. 2003).



En el núcleo estriado, las fibras de la glía radial se originan en la zona ventricular de la LGE y proyectan al estriado con una orientación perpendicular a la superficie ventricular, marcando la ruta de migración de los precursores estriatales (de Carlos y col. 1996; Halliday y Cepko 1992; Kakita y Goldman 1999). Como los precursores neuronales de la LGE son la fuente primaria de neuronas de proyección

estriatales (Anderson y col. 1997; Olsson y col. 1998) se puede establecer que las neuronas de proyección generadas en la zona proliferativa periventricular de la LGE son destinadas al manto del núcleo estriado mediante migración radial.

En la migración tangencial podemos encontrarnos diferentes tipos de movimiento dependiendo del sustrato utilizado para la migración. En algunos casos, las neuronas migran empleando axones en crecimiento que les permiten llegar a su destino final. Mientras que en otros casos, las neuronas no siguen sustratos celulares y se dispersan de manera individual. La MGE es la mayor fuente de células que migran tangencialmente, de ella proceden las neuronas que poblarán la corteza cerebral, hipocampo, globos pallidus y núcleo estriado (Lavdas y col. 1999; Marin y Rubenstein 2001; Meyer y col. 1998). A pesar de que las interneuronas estriatales representan menos de un 10% de las neuronas estriatales, ejercen una importante influencia en la función del núcleo estriado (Gerfen 1992; Kawaguchi y col. 1995).

El núcleo estriado se puede dividir en dos compartimentos: los estriosomas y la matriz (Gerfen 1992; Graybiel y col. 1990), los cuales difieren en cuanto a marcadores neuroquímicos, conexiones y periodo de neurogénesis. Las neuronas de estos dos compartimentos aparecen durante dos estadios que no se superponen (van der Kooy y Fishell 1987). Las neuronas estriosomales se generan durante la primera oleada de neurogénesis (E13-16), en la región postmitótica de la LGE y constituirán el 15-20% de las neuronas del estriado en el adulto (Fishell y van der Kooy 1991; Lanca y col. 1986). Entre E16-20 se produce la segunda oleada de nuevas neuronas, generadas principalmente en la zona subventricular de la LGE y que migran al primordio estriatal separando las neuronas de los estriosomas en agregados (van der Kooy y Fishell 1987). Esta gran afluencia de células de la matriz continúa hasta el nacimiento haciendo que estas células comprendan el 80-85% del núcleo estriado adulto (Johnston y col. 1990). Estas neuronas provenientes de la segunda oleada de la neurogénesis rodean a las neuronas estriosomales de manera que, poco después del nacimiento, las neuronas de la matriz y estriosomas están totalmente segregadas (Fishell y van der Kooy 1991). Los mecanismos exactos que regulan la formación de los compartimentos del núcleo estriado se desconocen. Sin embargo, algunos estudios aportan evidencias sobre algunos factores que pueden estar implicados en el proceso, tales como Ebf-1, Dlx-1/2 y cadherina-8.

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

El desarrollo del núcleo estriado no termina a nivel embrionario, sino que la formación de conexiones, el establecimiento de circuitos y la maduración de las vías no se produce hasta las primeras etapas de la edad postnatal.

### 1.3.1 Organización del núcleo estriado

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales altamente interconectados entre sí que juegan un papel fundamental en funciones motoras, cognitivas y límbicas. Están constituidos por el núcleo estriado (núcleo cuadado y putamen), el *globus pallidus*, que contiene un segmento interno y uno externo, y el núcleo accumbens. El núcleo estriado es el núcleo integrador de la información que llega a los ganglios basales (Leegwater-Kim y Cha 2004). Existen otros dos núcleos asociados a los ganglios basales: el núcleo subtalámico y la sustancia negra que se divide en *pars compacta* y *pars reticulata* (Bolam y col. 2000; Parent y Hazrati 1995).

La entrada más importante de información a los ganglios basales proviene de la corteza cerebral y es el núcleo estriado el que recibe principalmente dichas aferencias. El núcleo estriado es el responsable de procesar e integrar toda la información que recibe, no sólo de la corteza, sino de otras estructuras tales como el tálamo, la sustancia negra *pars compacta* y otros núcleos del tronco encefálico. Una vez procesada la información, envía eferencias hacia el segmento interno del *globus pallidus* y la sustancia negra *pars reticulata*. Las proyecciones de los ganglios basales se dirigen otra vez al tálamo y después hacia la corteza cerebral, cerrando así el conocido circuito córtico-estriado-tálamo-cortical (Bolam y col. 2000; Gerfen 1992; Parent y Hazrati 1995).

En el núcleo estriado podemos encontrar:

**Neuronas de proyección.** Las neuronas de proyección representan aproximadamente el 90% de la población estriatal. Presentan una gran cantidad de espinas dendríticas y un largo axón que establece conexiones fuera del núcleo, debido a estas características también son conocidas como neuronas medianas espinosas. El neurotransmisor principal que emplean estas neuronas es el GABA (Ribak y col. 1979). Las dianas comunes de estas neuronas de proyección son el *globus pallidus* y la sus-

tancia negra. Dependiendo de la estructura a la que proyectan y del tipo de receptores de dopamina que presentan podemos distinguir neuronas estriatopalidales, que proyectan al segmento externo del globus pallidus y expresan encefalina y el receptor D2 de la dopamina, o con neuronas estriatonigrales que proyectan a la sustancia negra *pars reticulata* o al segmento interno del globus pallidus y expresan sustancia P, dinorfina y el receptor D1 de la dopamina (Gerfen y col. 1990).

**Interneuronas.** Las interneuronas representan cerca del 10% de las neuronas del estriado. Poseen un papel muy importante en el control de la excitabilidad de las neuronas estriatales de proyección. Existen cuatro tipos de interneuronas: colinérgicas, caracterizadas por un soma grande (20-50  $\mu\text{m}$  de diámetro) y por utilizar acetilcolina como neurotransmisor; GABAérgicas de tamaño algo mayor que el de las neuronas de proyección, expresan calcio parvalbúmina; GABAérgicas de tamaño mediano, contienen calretinina; interneuronas que coexpresan somatostatina, neuropéptido Y y óxido nítrico sintasa.

### 1.3.2 Morfología del núcleo estriado

Tal y como se ha mencionado, el estriado se dispone en una compleja organización en mosaico que se debe a sus conexiones neuroanatómicas y que hace que se determinen dos compartimentos:

**Estriosomas.** Los estriosomas están constituidos por agrupaciones de células que forman agregados. Se caracterizan por presentar una elevada expresión de receptores  $\mu$ -opiáceos (Pert y col. 1976), sustancia P (Chesselet y Robbins 1989), dinorfina (Haber y Watson 1985), neurotensina, son ricos en fibras inmunoreactivas para tirosina hidroxilasa y por presentar un marcaje muy débil para acetilcolinesterasa (Graybiel y Ragsdale 1978).

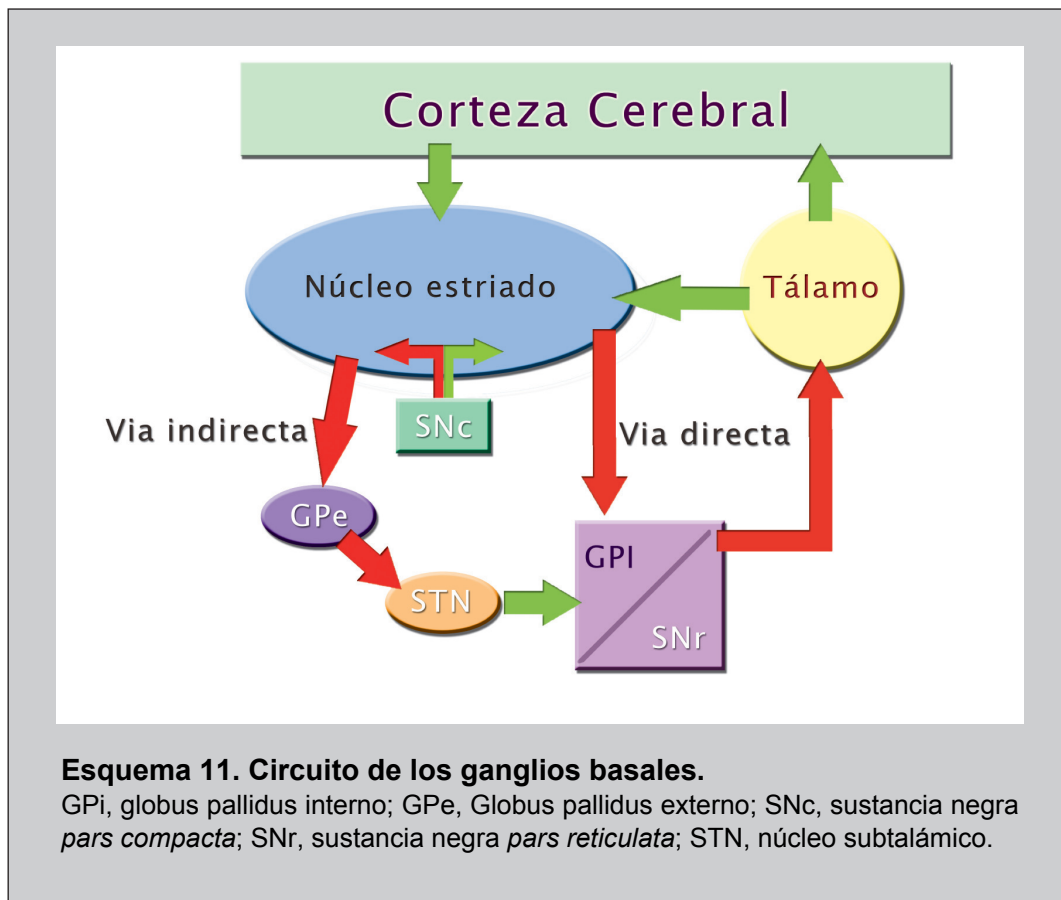
**Matriz.** La matriz se encuentra envolviendo las agrupaciones de células estriosomales. Se caracterizan por presentar un elevado marcaje para calbindina, acetilcolinesterasa (Graybiel y Ragsdale 1978) y por ser rica en fibras inmunoreactivas para la somatostatina (Gerfen y col. 1985).

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

Los estriosomas y la matriz también se pueden definir en base a la organización de sus aferencias y eferencias ([esquema 11](#)):

**Eferencias.** Las neuronas de los estriosomas contactan con las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* mientras que las neuronas de la matriz contactan con las neuronas GABAérgicas de la sustancia negra *pars reticulata* (Gerfen 1984; Gerfen y col. 1985).

**Aferencias.** Los terminales que llegan a la matriz provienen de las neuronas dopaminérgicas situadas de una manera continua en el área tegmental ventral y en el lado dorsal de la sustancia negra *pars compacta*. Los terminales dirigidos a los estriosomas provienen de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* y de las neuronas dopaminérgicas que se agrupan en islotes en la sustancia negra *pars reticulata*.





## 1.4 LA ALBÚMINA

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

La albúmina está constituida por 585 aminoácidos y tiene un peso molecular de 66,438 kDa. La estructura secundaria de la proteína se define por nueve  $\alpha$ -hélices, estabilizadas por 17 puentes disulfuro. La estructura tridimensional de la albúmina, definida por cristalografía, presenta forma de corazón con tres dominios homólogos (designados I, II y III), constituidos cada uno por dos subdominios de 3  $\alpha$ -hélices continuas en paralelo, enfrentándose un par de subdominios para formar un dominio (He y Carter 1992) (esquema 12). La albúmina tiene una estructura muy resistente y recupera con facilidad su conformación original, principalmente debido a los puentes disulfuro que le proporcionan la rigidez necesaria, especialmente en condiciones fisiológicas.



La función principal de la albúmina es la unión y transporte de ligandos, tanto endógenos como exógenos. Esto se debe, en gran parte, a la gran flexibilidad de la albúmina, que puede cambiar su conformación fácilmente. Las principales regiones de unión a ligandos se localizan en cavidades hidrofóbicas en los subdominios IIA y IIIA, que muestran una estructura química similar. De hecho, estudios recientes proponen la existencia de regiones en la molécula de albúmina totalmente inaccesibles al agua (Grdadolnik y Marechal 2005). La albúmina es capaz de unir fuertemente aniones orgánicos, como ácidos grasos de cadena larga y la bilirrubina. Sin embargo otras sustancias menos hidrófilas y de menor tamaño, como ácidos grasos de cadena media, ascorbato o triptófano, se unen a la albúmina de manera específica, pero con menor afinidad, lo cual favorece su intercambio.

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

### 1.4.1 La albúmina en el cerebro

El cerebro del neonato, al contrario que el del adulto, capta específicamente albúmina sérica durante el periodo postnatal, coincidiendo con la etapa de máximo desarrollo. Se ha descrito la presencia de altas concentraciones de albúmina en el cerebro y en líquido cefalorraquídeo durante los primeros días de vida postnatal (Dziegielewska y col. 1981b; Mollgard y Jacobsen 1984; Trojan y Uriel 1979). Tanto las neuronas (Fishman y col. 1990; Granda y col. 2003) como los astrocitos en cultivo (Juurlink y Devon 1990; Tabernero y col. 1999b) 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 líquido cefalorraquídeo (LCR). Este mecanismo es específico para la albúmina, puesto que modificaciones químicas de esta proteína impiden su transferencia al cerebro. Además, la albúmina de distintas especies es incapaz de alcanzar el LCR, indicando la existencia de un receptor específico para la albúmina en los capilares sanguíneos, que se expresa sólo durante el desarrollo cerebral (Habgood y col. 1992).

Se ha descrito un papel importante de la albúmina en células cerebrales, como es la regulación de la proliferación astrocítica o el control de los niveles intracelulares de calcio (Nadal y col. 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 y col. 2002a). Además, se ha descrito que la albúmina regula el metabolismo de células cerebrales (Tildon 1993; Vicario y Medina 1992). Una de las primeras observaciones relacionadas con el efecto de la albúmina en el desarrollo cerebral fue el efecto drástico que esta proteína muestra en la utilización del lactato por los astrocitos (Vicario y col. 1993). En este sentido, se observó que, en cultivos primarios de astrocitos, la albúmina aumenta significativamente la utilización de glucosa y lactato mediante la activación de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (Tabernero y col. 1999b). Este efecto es específico y dosis-dependiente de albúmina (alcanza un máximo a concentraciones del 1% (p/v)) y no es mimetizado por otras proteínas, como  $\gamma$ -globulinas, o por compuestos

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

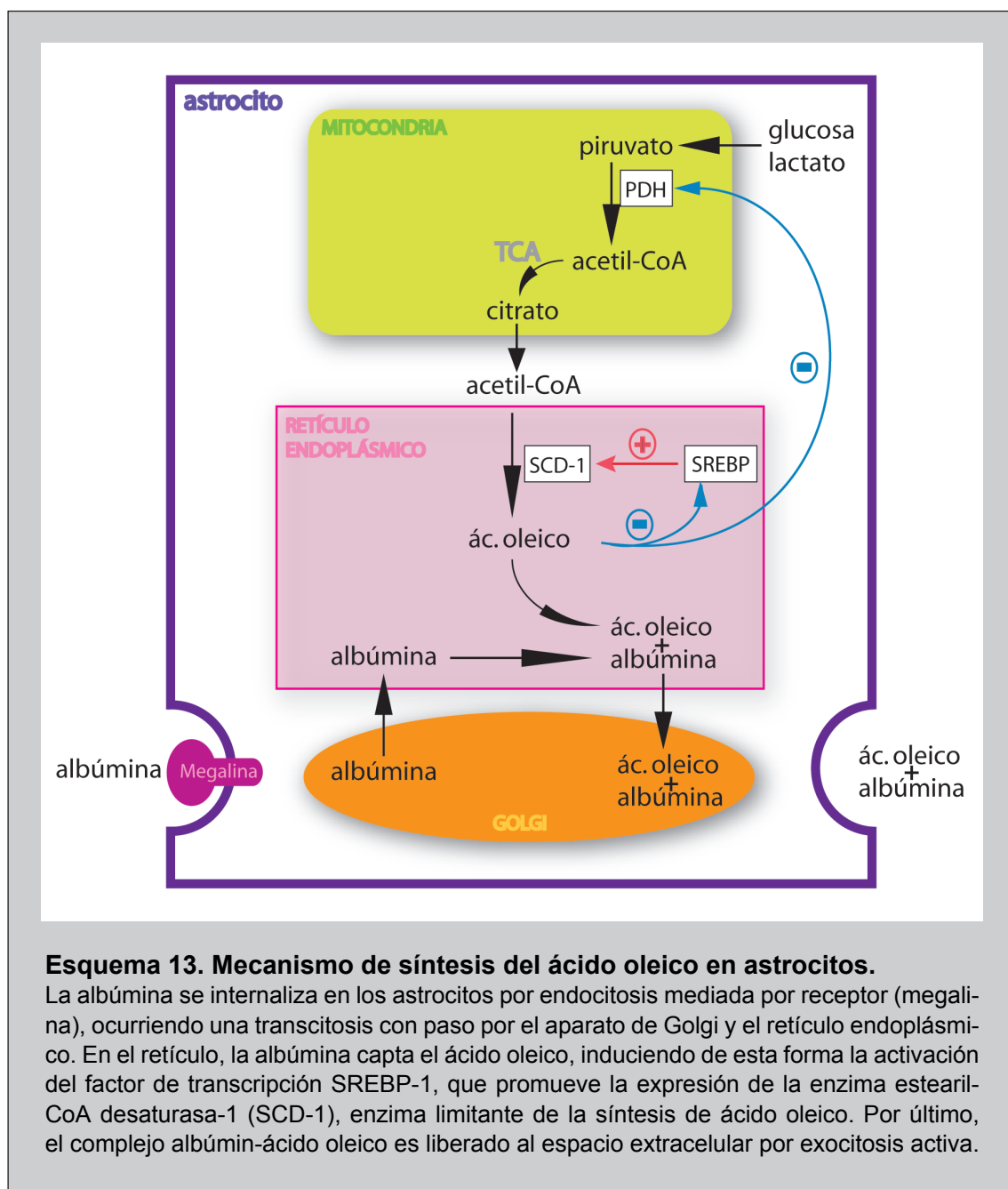
de masa molecular semejante, como el dextrano. Sin embargo, sólo aumenta discretamente otras vías metabólicas, tales como el ciclo tricarboxílico o el ciclo de las pentosas fosfato, indicando que ejerce su efecto específicamente sobre la reacción catalizada por la PDH (Tabernero y col. 1999b). Además, el aumento de la actividad de la PDH promovido por la albúmina es neutralizado por ácidos grasos, sugiriendo que la albúmina aumenta la actividad de la PDH por captación de ácidos grasos o de sus derivados acil-CoA (Tabernero y col., 1999).

Dado que la presencia de la albúmina en el cerebro se encuentra regulada en el desarrollo, se ha sugerido que esta proteína pudiera jugar un papel importante en la diferenciación neuronal. Se ha descrito que, en astrocitos, la albúmina aumenta específicamente la biosíntesis del factor neurotrófico ácido oleico, a partir de lactato, glucosa y 3-hidroxibutirato, de una forma dosis-dependiente (Tabernero y col. 2001). El ácido oleico, o *cis*-9-octadecenoico (18:1c $\Delta$ 9), es un ácido graso formado por 18 átomos de carbono con una insaturación en posición *cis* en  $\Delta$ 9, introducida por una reacción de oxidación catalizada por la estearil-CoA 9-desaturasa-1 (SCD-1), la enzima limitante en la síntesis de los ácidos grasos monoinsaturados. La síntesis del ácido oleico promovida por la albúmina en astrocitos se detalla en el [esquema 13](#).

#### 1.4.2 La albúmina y el factor neurotrófico ácido oleico

El ácido oleico, sintetizado y liberado por los astrocitos en respuesta a la albúmina, actúa como factor neurotrófico, induciendo la diferenciación neuronal. Ésta se caracteriza morfológicamente por el agrupamiento neuronal seguido del crecimiento de las neuritas, que terminan diferenciándose en dendritas o axones y, molecularmente, por el aumento de la expresión de las proteínas marcadoras de diferenciación axonal, GAP-43, y dendrítica, MAP-2 (Rodríguez-Rodríguez y col. 2004; Tabernero y col. 2001). El efecto neurotrófico del ácido oleico se ha verificado tanto en cultivos de neuronas en presencia del complejo albúmina-ácido oleico como en co-cultivos de astrocitos y neuronas en presencia de albúmina. La presencia de ácido oleico transforma el cultivo de neuronas de tal manera que las neuronas se disponen siguiendo los patrones que se observan *in vivo*. En este sentido, se ha observado que los somas neuronales se agrupan formando estructuras que se asemejan a la materia gris y prolongan sus axones hasta contactar con las colonias de neuronas adyacentes, de-

jando un espacio equivalente a la materia blanca en el SNC (Taberner y col. 2001). El efecto causado por el ácido oleico (18:1 $\Delta$ 9) sobre la expresión de la MAP-2 y de la GAP-43 no se observa en presencia de otros ácidos grasos estructuralmente parecidos, tales como el ácido eláídico (18:1 $\Delta$ 9) y el ácido palmítico (16:0), lo que demuestra la importancia del doble enlace en cis para que el efecto del ácido graso sea específico (Taberner y col. 2001).



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

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 y col. 2003; Rodríguez-Rodríguez y col. 2004; Tabernero y col. 2001). 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 y col. 1992). Por otra parte, es bien conocido que ciertos factores neurotróficos, como el NGF, activan la PKC y esto induce la expresión de la GAP-43 a través de la estabilización de su mRNA (Perrone-Bizzozero y col. 1993). Asimismo, la PKC colocaliza con la F-actina del citoesqueleto durante el crecimiento de las neuritas e induce el desarrollo de las mismas en células de neuroblastoma (Zeidman y col. 1999).

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

expresión del factor neurogénico NeuroD2 inducido por el ácido oleico (Granda y col. 2003; Rodríguez-Rodríguez y col. 2004).

Recientemente en nuestro laboratorio hemos descrito que el receptor neuronal del ácido oleico implicado en el proceso de diferenciación es el factor de transcripción PPAR $\alpha$  (receptor  $\alpha$  activado por proliferadores de peroxisomas) (Bento-Abreu y col. 2007). El ácido oleico ha sido descrito como un ligando natural de la familia de receptores PPAR (Gottlicher y col. 1992). A su vez, se debe mencionar que la actividad del PPAR $\alpha$  puede estar regulada por PKC a través de residuos fosforilables puesto que la inhibición de la actividad de PKC induce una disminución en la actividad transcripcional del PPAR $\alpha$  (Blanquart, 2004).

### 1.4.3 Relevancia clínica de la albúmina

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

#### 1.4.4 Captación de la albúmina

En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio observamos que la albúmina era internalizada mediante estructuras vesiculares mediadas por un receptor glicoproteico (Tabernerero y col., 2002a). En trabajos posteriores hemos descrito que el receptor glicoproteico del que se trataba era la megalina (Bento-Abreu y col. 2008). Recientemente hemos descubierto que la internalización de la albúmina en astrocitos se lleva a cabo mediante caveolas (Bento-Abreu y col., no publicado).

La megalina (o LRP-2/gp330) es una glicoproteína monomérica de 600 kDa y constituye un receptor multiligando de albúmina, lactoferrina, retinol, transcobalamina, proteína de unión de la vitamina D, apolipoproteínas B, J, E y H, lipoproteína lipasa, insulina, hormona paratiroidea, mioglobina, calcio, que se expresa principalmente en células polarizadas epiteliales, en la superficie apical de la membrana (Kounnas y col. 1994).

En el SNC, la megalina se detecta en el neuroepitelio del tubo neural y en la notocorda a partir del día E11. En el día E13, la megalina está presente en el diencéfalo ventral, en la columna vertebral ventral, en la zona ventral del hipocampo y en el plexo coroideo. En el día E15, la expresión de la megalina empieza a restringirse, limitándose al plexo coroideo, zona ventricular de la vesícula ventral lateral, columna vertebral y regiones ventriculares del tercero y cuarto ventrículos (Assemat y col. 2005). Se ha descrito que la megalina en el plexo coroideo del cerebro adulto tiene un papel importante en la neuroprotección al promover la eliminación del  $\beta$ -amiloide (Carro y col. 2005; Deane y col. 2004; Tanzi y Bertram 2005; Zlokovic y col. 1996).

### 1.5. BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO OLEICO

#### 1.5.1 Localización, estructura y mecanismo de acción de la SCD

La estearil-CoA desaturasa (SCD) es la enzima limitante en la síntesis de los ácidos grasos monoinsaturados. Estos ácidos grasos son los principales constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares.



La localización de la SCD difiere según el organismo. Así, en plantas es citosólica (Shanklin y Somerville 1991), mientras que en mamíferos es extremadamente hidrofóbica y se halla intrínsecamente unida a la membrana microsomal del retículo endoplasmático (Strittmatter y Enoch 1978). La SCD se caracterizó en 1960, por Strittmatter y col. (Strittmatter y col. 1974), que la aislaron de microsomas de hígado de rata. Posteriormente, Thiede y col. (Thiede y col. 1986) determinaron su secuencia y Mihara (Mihara 1990), tras realizar un escrutinio en una genoteca de rata utilizando como sonda la región codificadora de la SCD, describió dos isoformas distintas: SCD-1 y SCD-2, localizadas en distintos genes. Estos dos genes son similares estructuralmente y contienen 5 exones y 6 intrones distribuidos a lo largo de 15 kb.

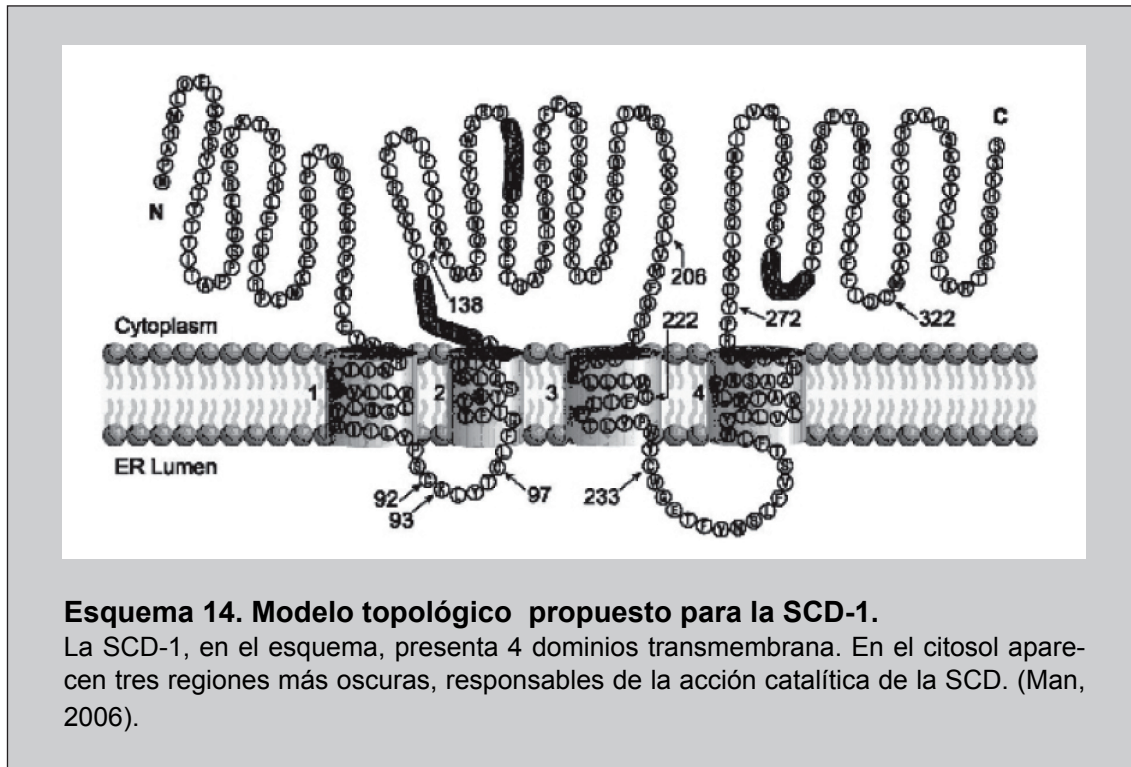
En el genoma del ratón se han caracterizado 4 isoformas de la SCD: SCD-1, SCD-2 (Ntambi y col. 1988; Kaestner y col. 1989) SCD-3 (Zheng y col. 2001) y SCD-4 (Miyazaki y col. 2003). La expresión de la SCD-3 está restringida a la piel del ratón específicamente a las glándulas sebáceas y la SCD-4 es una isoforma específica de corazón. En el hombre solamente se han caracterizado dos isoformas, hSCD1 y hSCD5 (Zhang y col. 2005; Beiraghi y col. 2003). Los genes que codifican las isoformas de ratón se localizan agrupados en el cromosoma 19 (Tabor y col. 1998; Zheng y col. 2001), mientras que en el hombre el gen de la SCD se cree que se encuentra localizado en el cromosoma 10.

Las regiones codificadoras de las isoformas de la SCD en la rata, el ratón y el hombre son muy similares; aproximadamente el 80% de las secuencias de nucleótidos son idénticas. Las cadenas polipeptídicas también están altamente conservadas.

La secuencia codificadora de la rata contiene 1074 pb, que codifican 358 aminoácidos y dan lugar a un polipéptido de 41,4 kDa. Estudiando su secuencia se identificó que el 62% de los aminoácidos eran hidrofóbicos (Thiede y col. 1986). Estos mismos análisis indicaron que esta enzima contiene hasta 3 largos dominios hidrofóbicos que le permiten atravesar la bicapa lipídica dos veces (Shanklin y col. 1994) (esquema 14). El análisis de la secuencia de aminoácidos de diferentes desaturasas de mamíferos, hongos, insectos, plantas superiores y cianobacterias ha revelado 3 regiones, muy conservadas, que contienen hasta 8 residuos de histidina.

Las neuronas del estriado son la diana del efecto neurotrófico del ácido oleico sintetizado por zona subventricular durante el desarrollo postnatal del cerebro

Para investigar el papel funcional de estos residuos, Shanklin y col. (1994) realizaron una serie de experimentos que consistieron en mutaciones puntuales. Los resultados obtenidos muestran que estos residuos son esenciales para la función catalítica, ya que unen el átomo de hierro que contiene la enzima.



La regulación de la SCD en el sistema nervioso periférico está destinada a la síntesis de mielina (Garbay y col. 1998). Durante el desarrollo postnatal del ratón la actividad de la SCD en homogenados del nervio ciático es alta y la proporción de ácido oleico aumenta durante las tres primeras semanas del desarrollo. Sin embargo, este aumento de la actividad de la SCD y de los niveles de ácido oleico no ocurre en ratones que tienen alterada la síntesis de mielina (Garbay y col. 1998). El ácido oleico es el principal ácido graso del sistema nervioso periférico, comprendiendo entre el 35 y el 45% de los ácidos grasos del nervio ciático. Una alteración en la expresión de la SCD en el sistema nervioso periférico puede dar lugar a una desmielinización y subsecuentes alteraciones neurológicas.

# PLAN DE TRABAJO



De acuerdo con las consideraciones descritas en la Introducción, el Plan de Trabajo quedó establecido como sigue:

- 1.- Estudio de los niveles de ácido oleico libre en el cerebro durante el desarrollo postnatal.
- 2.- Estudio de la región o regiones del cerebro en las que se localiza la enzima limitante en la síntesis de ácido oleico, la estearil-CoA desaturasa-1, SCD-1.
- 3.- Estudio del papel que ejerce la estearil-CoA desaturasa-1 en el desarrollo postnatal del cerebro.



# MATERIAL Y MÉTODOS





## 3.1 MATERIAL

### 3.1.1 Especie ensayada y condiciones del animalario

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

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

Se emplearon fetos a término para la preparación de los cultivos organotípicos y de los explantes, neonatos de 1 día de vida postnatal para la preparación del cultivo primario de astrocitos y animales de distintas edades para la realización de los experimentos *in vivo*.

Los anestésicos utilizados fueron ketamina (Rompun®, Bayer) y xilacina (Imalgene® 500, Merial Laboratorios). Los animales se trataron según la normativa española RD 223/88 y la normativa europea 86/609/ECC.

### 3.1.2 Medios instrumentales

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

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

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

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

burgo, Alemania) y una centrifuga Eppendorf, modelo Centrifuge 5702.

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

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

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

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

Las células se sembraron en placas estériles procedentes de las casas comerciales Nunc (Nunclon, Roskilde, Dinamarca) y TPP (Trasadingen, Suiza).

Las células se mantuvieron en cultivo en el incubador de CO<sub>2</sub> modelo Galaxy (RS Biotech, Northants, Reino Unido).

Los insertos empleados en los cultivos organotípicos tenían un diámetro de poro de 0,4 µm y provenían de la casa Millipore Ibérica.

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

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

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

El espectrofotómetro que se ha utilizado es de la marca Hitachi (Tokio, Japón).

Las cubetas utilizadas son de plástico, de 1 mL de capacidad y 1 cm de paso de luz (Elkay, Boston, U.S.A.) o de cuarzo, de 1 mL de capacidad y 1 cm de paso de luz (Hellma, Mulheim, Alemania).

Para los análisis de transferencia tipo “Western” se utilizó un sistema de electroforesis vertical y un sistema de electrotransferencia modelo “Mini Trans-Blot Transfer Cell” conectado a una fuente de alimentación modelo “PowerPac 300” de Bio-Rad

(Hercules, U.S.A.)

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

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

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

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

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

Para la fijación de los tejidos se empleó una bomba de perfusión modelo Mini-plus 3 M312, Gilson (Villiers-le-Bel, Francia).

El criostato utilizado para la microsección de cerebros fue el modelo CM3050S de Leica (Wetzlar, Alemania).

Los cortes coronales utilizados en el cultivo de organotípicos se obtuvieron mediante el “tissue chopper” modelo McIlwain Tissue Chopper de Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd. (Surrey, Reino Unido).

El microscopio empleado en el proceso de obtención del tejido para los cultivos organotípicos y de explantes fue el modelo MSZ800 de Nikon (Barcelona, España).

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

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

El sistema HPLC utilizado en el análisis de ácidos grasos se compone de un módulo inyector y un módulo de distribución de solventes modelo 125, System Gold. El detector ultravioleta “diode array” es el modelo 168, System Gold. El aparato proviene de la firma comercial Beckman Instruments.

La fase estacionaria que permitió la separación de los ácidos grasos es una columna de fase reversa, de 4,6 mm x 250 mm, con partículas de sílica C-18 de 5 µm de diámetro, modelo Ultrasphere-ODS de Scharlau.

El computador que integraba la señal proveniente del sistema de HPLC es un Dell Optiplex Gs (Barcelona, España).

Las incubaciones para la hibridación *in situ* se llevaron a cabo en un horno de hibridación modelo RPN2510/RPN2512 (Amersham Pharmacy Biotech, Barcelona, España).

El “crosslinking”, o unión covalente del RNA a la membrana mediante radiación ultravioleta, se llevó a cabo utilizando un dispositivo comercializado por Stratagene, UV-stratalinker modelo 2400 (Stratagene, La Jolla, U.S.A.).

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

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

### 3.1.3 Productos

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

#### 3.1.3.1 Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares

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

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

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

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

La citosina- $\beta$ -arabinofuranósido empleada en los cultivos de astrocitos procedía de Sigma.

### 3.1.3.2 Productos utilizados para la preparación de los cultivos tisulares

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

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

El colágeno empleado para encastrar los explantes fue adquirido en BD Biosciencias (San Jose, CA, U.S.A.).

El MEM utilizado para la solución de polimerización de la estructura de colágeno procedía de Invitrogen.

### 3.1.3.3 Productos utilizados para la preparación de la albúmina libre de ácidos grasos

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

Los filtros (0,22  $\mu\text{m}$ ) utilizados para la esterilización 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.

### 3.1.3.4 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 ditioneitol (DTT) y la enzima transcriptasa inversa (SuperScriptII Reverse Transcriptase) utilizados en la RT, procedían de Invitrogen.

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

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

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

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

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

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

### 3.1.3.5 Productos empleados para el silenciamiento génico

Los RNAs de interferencia de cadena corta (small interfering RNA, siRNA) fueron adquiridos en Ambion para el caso de *Gapdh* (Cambridgeshire, Reino Unido o Austin, Texas, U.S.A.) o Gene Link (Hawthorne, Nueva York, U.S.A.).

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

### 3.1.3.6 Productos utilizados para el análisis de las proteínas

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

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

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

Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Bio-Rad).

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

El anticuerpo monoclonal de ratón contra GAP-43, el anticuerpo monoclonal de ratón contra MAP-2 y el anticuerpo monoclonal de ratón contra GFAP se adquirieron en Sigma.

El anticuerpo monoclonal de ratón contra TUJ-1 se adquirió en ABR (Golden, CO, USA).

El anticuerpo monoclonal de conejo contra la albúmina y el anticuerpo policlonal de conejo contra BLBP se adquirieron en Chemicon (Temecula, CA, U.S.A.).

El anticuerpo policlonal de oveja contra megalina fue donado por el Dr. P.J. Verroust (Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, Paris, Francia).

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

El suero de cabra fue administrado por 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, U.S.A.).

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

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

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

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

Los anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor488 o AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de ratón, conejo u oveja fueron suministrados por Molecular Probes (Invitrogen).

### **3.1.3.7 Productos empleados para el análisis de los ácidos grasos**

Los disolventes orgánicos, metanol, cloroformo, n-hexano y acetonitrilo, empleados en la extracción de ácidos grasos y el  $\text{KHCO}_3$ , empleado en el proceso de derivatización, se adquirieron en Merck.

El antioxidante de ácidos grasos BHT (2,6-di-ter-butil-4-metilfenol), el ácido graso que sirvió de estándar interno, ácido margárico (ácido heptaenoico), así como el ácido oleico y el ácido palmítico, utilizados como patrones, procedían de Sigma.

El producto derivatizante de los ácidos grasos, PBPB (2,4-dibromoacetofenona), y el catalizador, 18-crown-6 (1,4,7,10,13,16-hexaxociclooctadecano), pertenecía a la casa Sigma.

### **3.1.3.8 Productos empleados para la obtención de la sonda de estearil-CoA desaturasa-1**

El vector p-GEM-T Easy lo proporcionó la firma Promega (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España)

El isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) y el 5-bromo-4-cloro-3-idolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal), empleados en la selección de clones, se adquirieron en la casa comercial Eppendorff AG (Hamburgo, Alemania).

Los kit utilizados para la selección de clones y la amplicación del plásmido procedían de Mo Bio Laboratories y Promega, respectivamente.

Las enzimas de restricción se adquirieron en Promega.

Para marcar las sondas se utilizó el kit de marcaje DIG-HIG-Prime de Roche Diagnostic, S.L.

Las columnas empleadas para la purificación de la sonda fueron suministradas por Bio-Rad.

### **3.1.3.9 Productos empleados para la comprobación de marcaje de la sonda con digoxigenina**

La membrana de nylon, el reactivo de bloqueo y el sustrato quimioluminiscente (CPD-Star) pertenecían a las casa comercial Roche Diagnostic, S.L.

### **3.1.3.10 Productos empleados para la hibridación *in situ***

La sacarosa para proteger los cerebros fue adquirida en Merck.

Los cerebros se encastraron en OCT, “optimal cutting temperature” que fue suministrado por Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, U.S.A.).



Para la solución de acetilación se utilizó trietanolamina y ácido clorhídrico procedente de Merck.

El triton-X-100 para la permeabilización del tejido provino de la casa Sigma.

La formamida, el sulfato de dextrano, la solución Denhardt y el tRNA utilizados para la solución de hibridación fueron suministrados por Sigma.

El anticuerpo de oveja, antidigoxigenina unido a fosfatasa alcalina, y la solución de coloración NBT/BCIP (cloruro de tetrazolio nitro-azul/5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato) procedían de Roche Diagnostic S.L..

El anticuerpo monoclonal de ratón contra digoxigenina fue adquirido en Abcam.

El SSC (tampón citrato sódico) y el PBS (tampón fosfato salino) libre de RNAsa empleados en los lavados son de la casa Sigma.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Preparación de los cultivos celulares

#### 3.2.1.1 Preparación del cultivo primario de astrocitos

Los cultivos de astrocitos se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero y col. (Tabernero 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.

Los animales se limpiaron con etanol al 70%, se decapitaron y se extrajeron los cerebros, de los que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Los cerebros se colocaron en una placa petri que contenía solución "A" (EBSS pH 7,2 suplementado con DNasa tipo I 20 µg/mL y albúmina (fracción V) 3 µg/mL). La solución EBSS, o de Earle, 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, D-Glucosa, 14 mM; pH 7,2. El tejido se disgregó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g . El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos a 37°C, en solución

“B” (EBSS pH 7,2 suplementado con tripsina 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DNAsa tipo I 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y albúmina (Fracción V) 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posteriormente, se detuvo la tripsinización añadiendo al tejido disgregado DMEM suplementado con FBS al 10% (v/v). Finalizada la tripsinización se centrifugó el tejido durante 5 minutos a 500 x g, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el tejido en la solución A y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada. Se recogió el sobrenadante y se repitió dos veces más el tratamiento anterior. Se reunieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM suplementado con 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 se mezcló con azul de tripano al 0,2% (v/v) para la determinación de la viabilidad celular y del número de células.

A continuación, se sembraron las células en medio de cultivo, en placas petri recubiertas con poli-L-lisina (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), a una densidad de 1,0 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> y se colocaron en un incubador a 37°C, con un 5% CO<sub>2</sub>. Al tercer día se añadió citosina  $\beta$ -arabinofuranósido 10  $\mu\text{M}$ , que se mantuvo durante 48 horas con el fin de evitar la proliferación de la microglía y de las células del linaje O-2A (Tabernero y col. 1996). Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana con medio de cultivo. En estas condiciones se obtienen cultivos de astrocitos de tipo-1 de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico anti-GFAP (Tabernero y col. 1996). En todos los experimentos se utilizaron astrocitos cultivados entre 14 y 28 días *in vitro* (14-28 DIV).

### 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. Para la extracción de los fetos se procedió a la dislocación cervical de la rata gestante y posteriormente a la decapitación de los fetos. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad.

Los cerebros se extrajeron de la cavidad craneal y se mantuvieron en una solución de PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, a un pH 7,4) con glucosa al 5%. Posteriormente se retiraron las meninges con la ayuda de una lupa y los cerebros se colocaron en una placa petri con medio L-15. Todo este proceso se realizó a 4°C. Posteriormente los cerebros se cortaron en rodajas coronales de un grosor de 350 µm empleando un “tissue chopper”. Se separaron las rodajas y se transfirieron a unos insertos estériles de membrana con un poro de 0,4 µm que se colocaron en placas de 56 cm<sup>2</sup>. Se cultivaron a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub>, entre 12 y 72 horas.

### 3.2.2.2 Preparación del cultivo de explantes de la zona subventricular

En los cultivos de explantes se procedió de forma similar que para los cultivos organotípicos. Una vez obtenidas las rodajas coronales de cerebro se disecó la zona subventricular de la región estriada de los ventrículos laterales. Ésta a su vez se subdividió en bloques de aproximadamente 0,4 mm<sup>3</sup> (de Castro 1999; Hu 1999).

Posteriormente, los bloques, fueron preincubados durante 6 horas en una solución de silenciamiento o fueron directamente sembrados sin preincubación. Para ello, los bloques fueron embebidos en una matriz 3D de colágeno I de cola de rata. La solución de colágeno empleada para formar la matriz 3D contenía colágeno al 85%, bicarbonato sódico al 10% y MEM 10X al 5% y se prepara a 4°C. Dicha solución se extendió sobre la base de pocillos de 1,9 cm<sup>2</sup> y se esperó a su polimerización a temperatura ambiente. Posteriormente, los explantes se dispusieron sobre la capa polimerizada y se cubrieron con más colágeno. Una vez finalizada la polimerización, se añadió el medio de cultivo y se incubaron a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>, entre 12 y 72 horas.

### 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, previamente dializada en solución de 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, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, preparado en tampón fosfato sódico 10,8 mM pH 7,6).

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

### **3.2.4 Tratamientos empleados en los cultivos**

#### **3.2.4.1 Tratamientos en astrocitos**

Los astrocitos fueron cultivados en DMEM con FBS a los 14 DIV se retiró el medio y se añadió DMEM sin FBS. Después las células se lavaron con DMEM y se incubaron en DMEM en presencia o ausencia de albúmina al 2% durante 6 horas.

#### **3.2.4.2 Tratamientos en cultivos de explantes y organotípicos de rodajas de cerebro**

Los explantes y las rodajas fueron cultivados en medio definido (DMEM-F12 suplementado con piruvato sódico 1mM, apotransferrina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , L-glutamato 2,5 mM, insulina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , penicilina G 50 U/mL estreptomycin 37,5 U/mL, pH 7,2) suplementado con albúmina al 2% en presencia o ausencia de ácido oleico 50  $\mu\text{M}$ . Las incubaciones se llevaron a cabo con una duración de entre 24 y 72 horas.

### **3.2.5 RT-PCR**

#### **3.2.5.1 Extracción y cuantificación del RNA total**

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

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

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

### 3.2.5.2 Retrotranscripción (RT)

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

### 3.2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del cDNA del gen de interés por PCR, se utilizó la polimerasa de DNA Taq. La mezcla de reacción consistió en 2 µL de cDNA molde, 0,4 mM de una pareja de cebadores específicos, 0,2 mM de una mezcla de desoxirribonu-

cleótidos (dNTPs), 1 U de la polimerasa de 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 5 minutos de desnaturalización, seguidos de ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), anillamiento (30 segundos) y extensión (90 segundos a 72°C) y por una extensión final de 10 minutos a 72°C. El número de ciclos, la temperatura de anillamiento y la secuencia de los cebadores utilizados para cada gen de interés se especifican en la Tabla 1.

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

Gen diana (ref.)	Cebadores	Tamaño amplicón	Temperatura anillamiento
<b><i><math>\beta</math>-actina</i></b> <b>(NM-031144)</b>	5'- gagcacctgtgctgctcaccgagg 5'- gtggtggtgaagctgtagccacgct	300	60°C
<b><i>Scd-1</i></b> <b>(NM_139192)</b>	5'- gtctgagccagcaatctcaaagttcagaac 5'- gtacagtattatgagaaagctttgatcatg	416	66°C

### 3.2.5.4 Electroforesis de DNA

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

### 3.2.6 Transfección del siRNA

Para inhibir la expresión de las proteínas de interés, las células se transfectaron con siRNAs. Tanto en astrocitos como en explantes y organotípicos se silenció la expresión de la estearil-CoA desaturasa-1. Para ello los siRNAs, de cadena doble, se utilizaron a una concentración final de 50 nM en el caso de los astrocitos, o 60 nM en el caso de los explantes y organotípicos. Las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina 2000, siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizándose en los astrocitos 2,5  $\mu$ L/mL y 3 $\mu$ L/mL en explantes y organotípicos.

Los explantes y organotípicos, se incubaron en la solución de transfección antes de la siembra durante 6 horas a 37°C. Posteriormente se sembraron, con medio de transfección, en presencia o en ausencia de albúmina al 2% o albúmina al 2% más ácido oleico 50 µM durante 72 horas.

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

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

Para la optimización de las condiciones de transfección de siRNA en astrocitos, en explantes y en organotípicos, las células se transfectaron con distintas concentraciones de un siRNA validado contra *Gapdh* (25, 50 y 75 nM para astrocitos, 60 y 90 nM para explantes y organotípicos) y con distintas cantidades del agente de transfección (1, 2 ó 3 µL Lipofectamina 2000/mL medio de cultivo). Para silenciar SCD-1 se probaron 3 secuencias diferentes nombradas *Scd-1* (1), (2) y (3). Las secuencias de los siRNA (cadena sentido 5'→3') se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los siRNA

Gen diana	Cadena sentido (5'-3')	Cadena antisentido (5'-3')
<b><i>Scd-1</i> (1)</b>	CGCACGGUGUGGUUUGUAAtt	UUACAAACCACACCGUGCGtt
<b><i>Scd-1</i> (2)</b>	GAAAGAGUCUUA AUGUUAAtt	UUAACA UUAAGACUCUUUCtt
<b><i>Scd-1</i> (3)</b>	UUCUUUCUGUGUUA AUUGAtt	UCAAUUAACACAGAAAGAAAtt
<b><i>Gapdh</i></b>	GGUCAUCCAUGACAACUUUtt	AAAGUUGUCAUGGAUGACctt

### 3.2.7 Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo *Western*

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

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

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

Posteriormente se prepararon los geles para la electroforesis que fueron de poliacrilamida, de un grosor de 1,5 mm, compuestos por un gel de separación (10% de poliacrilamida para todas las proteínas analizadas) y por un gel de concentración (4% de poliacrilamida). El gel de separación estaba compuesto por Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), acrilamida/Bis al 10% (p/v), 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).



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

A continuación, se realizó la electroforesis en la cual se empleó un tampón 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 (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, a voltaje constante (entre 60 y 110V, dependiendo de las proteínas a separar) y durante el tiempo considerado conveniente para separar las proteínas de interés.

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

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

Para detectar las proteínas en la membrana, se incubó con el anticuerpo primario contra la proteína de interés 1-2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón contra GAP-43 (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo monoclonal de ratón contra MAP-2 (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo monoclonal de ratón contra TUJ-1 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-2 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución compuesta por FBS al 10% (v/v), azida sódica 0,02% (p/v) y lisina 0,1 M (denominada solución de anticuerpos).

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

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente, luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada por exposición a una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, en condiciones de exposición subsaturante. Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía mediante un programa de análisis de imagen.

### 3.2.8 Análisis de los ácidos grasos

#### 3.2.8.1 Extracción de los ácidos grasos

Para la determinación de los ácidos grasos por HPLC se siguió el método de Bilgh y Dyer (Bligh y Dyer 1959) con algunas modificaciones.

Tras la decapitación de los animales a diferentes días de vida postnatal se extrajeron los cerebros y se realizaron varios lavados en PBS durante 2 horas. A continuación los cerebros se congelaron mediante nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Para la determinación de ácidos grasos libres en el cerebro se homogenizó 1 g de tejido en 1,6 mL de PBS y se añadió a las muestras un antioxidante, BHT a una concentración de 0,125 mg/mL, y como estándar interno hemos empleado, ácido

margárico a 125  $\mu$ M.

Para la extracción de ácidos grasos se añadieron 2 mL de metanol y 1 mL de cloroformo, se agitaron hasta conseguir una sola fase. Luego se añadieron 1 mL de cloroformo y 2 mL de PBS 10x. Se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos. La fase orgánica se transfirió a un nuevo tubo y se evaporó bajo corriente de N<sub>2</sub>.

Posteriormente, al residuo resultante de la evaporación de la fase orgánica se añadieron 2 mL de n-hexano y 1 mL de H<sub>2</sub>O. Se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos. La fase orgánica se transfirió a un nuevo tubo y se evaporó bajo corriente de N<sub>2</sub>.

### 3.2.8.2 Derivatización de los ácidos grasos

El método de separación e identificación de ácidos grasos mediante HPLC está basado en el descrito por Puttmann (1993). Consiste en la separación de los ésteres de ácidos grasos derivatizados después de la reacción con 4-bromofenacil bromuro (PBPB).

Para la derivatización de los ácidos grasos, se redisolvió el extracto seco en 500  $\mu$ L de acetonitrilo y se añadieron 6  $\mu$ L de solución de derivatización (69,5 mg de PBPB, 6,6 mg de 18-crown-6, 0,2 g de KHCO<sub>3</sub>, 5 mL acetonitrilo). Se mantuvo la mezcla a 70°C en un bloque térmico para el calentamiento de tubos en seco. A los 30 minutos se centrifugó a 2000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se evaporó bajo corriente de N<sub>2</sub>.

### 3.2.8.3 Método cromatográfico

Una vez derivatizado, el extracto se redisolvió en 100  $\mu$ L de acetonitrilo y se cromatografió durante 40 minutos por HPLC, en una columna de sílica en fase reversa C18 mantenida entre 4 y 10°C, utilizando como fase móvil un gradiente de elución de 85% de acetonitrilo/15% de H<sub>2</sub>O en el minuto 0 y hasta un 100% de acetonitrilo a los 15 minutos, a un flujo de 1,5 mL/min. El eluyente se hizo pasar a través de

un detector UV “diode array”, fijado a una longitud de onda de 252 nm. Las señales se enviaron a un computador donde se integraron.

### 3.2.8.4 Cuantificación de las áreas cromatográficas

Para evitar las posibles variaciones en la eficiencia de extracción de los ácidos grasos, durante el paso por la columna cromatográfica o por el detector de UV-Vis, utilizamos un estándar interno no presente en el organismo, el ácido margárico (17:0). El estándar interno es un componente que no está presente en la muestra a analizar y se añade a una concentración conocida. El ácido margárico eluye a diferente tiempo que el resto de los analitos y se detecta de una forma similar a la del resto de los analitos. La razón entre las áreas obtenidas del estándar interno y del analito nos permite estimar la concentración de este último.

Las concentraciones finales indicadas en los resultados están referidas al volumen del cerebro en el día de obtención de cada muestra.

### 3.2.9 Obtención y preparación de los cortes histológicos

#### 3.2.9.1 Fijación del tejido

Los animales se anestesiaron con una solución compuesta por ketamina (120 µg/g de peso corporal) y xilazina (10 µg/g de peso corporal) en solución salina. El efecto de la anestesia se comprobó por la ausencia del reflejo parpebral. Los animales se perfundieron a través de la aorta ascendente con una bomba peristáltica con un flujo de 3 mL/min. Inicialmente se lavó el árbol vascular con solución salina durante 1 min, previa inyección intracardiaca de 3 U.I. de heparina sódica. La perfusión se continuó con solución fijadora (paraformaldehído al 4% en PBS) durante 15 min.

Posteriormente se extrajeron los cerebros y se lavaron en PBS para eliminar el exceso de fijador, y se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% (p/v) en PBS en agitación a 4°C hasta que se hundieron. Posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido encastrados en OCT y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

### 3.2.9.2 Obtención de los cortes histológicos

Los bloques de cerebro encastrados en OCT se cortaron en un criostato a una temperatura aproximada de  $-22^{\circ}\text{C}$ , en secciones de  $40\ \mu\text{m}$  de grosor en planos coronales. Las secciones se recogieron sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Las secciones se distribuyeron en 6 series consecutivas y fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### 3.2.10 Inmunofluorescencia

El tejido en cultivo se fijó con paraformaldehído al 4% en PBS, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, tanto el tejido en cultivo como los cortes coronales de cerebro se incubaron con el anticuerpo primario a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 12 horas. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón contra GAP-43 ( $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo monoclonal de ratón contra MAP-2 ( $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo monoclonal de ratón contra TUJ-1 ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo policlonal de conejo contra BLBP ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo policlonal de oveja contra megalina (1:1000), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 ( $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-2 ( $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo policlonal de conejo contra albúmina ( $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), anticuerpo monoclonal de ratón contra GFAP ( $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los anticuerpos primarios se prepararon en PBS con suero de cabra al 1% y triton-X-100 al 1%.

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

Finalmente, el DNA nuclear se tiñó con DAPI ( $2,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Las preparaciones se montaron utilizando un agente

preservador de la fluorescencia. Entre cada paso se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno, a temperatura ambiente.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal o con un microscopio de fluorescencia invertido conectado a una video-cámara digital, obteniéndose imágenes confocales o de fluorescencia.

### 3.2.11 Obtención de la sonda de *Scd-1* utilizada en la hibridación *in situ*

Para la obtención de la sonda de *Scd-1* se extrajo RNA de tejido hepático de rata, posteriormente se realizó la reacción de la transcripción reversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos procesos se llevaron a cabo según se detalla en el capítulo 3.2.5.

A continuación, el fragmento de cDNA de *Scd-1* obtenido se insertó en el plásmido pGEM-T Easy Vector de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones de la ligación fueron las siguientes: 200 ng de cDNA, 125 ng del vector pGEM-T, 3 U de ligasa T4 y 1  $\mu$ L de tampón de ligasa T4. Se mezclaron suavemente y se incubaron toda la noche a 4°C

El resultado de la ligación se utilizó para la transformación de bacterias con el objetivo de obtener mayor cantidad de DNA plasmídico. Para ello se mezclaron 2  $\mu$ L de la reacción de ligación y 50  $\mu$ L de células competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Esta mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo.

Posteriormente, se sometió a la mezcla a un choque de térmico durante 45 segundos a 42°C. Inmediatamente después se introdujo en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 950  $\mu$ L de medio SOC (Bacto-tryptona 2%, extracto de levaduras 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, glucosa 20 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10mM, 24,65 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mM) y se incubó 1 hora a 37 °C en agitación (150 rpm).

Después se sembraron 100  $\mu$ L del cultivo en placas de agar con LB (Bacto™-tryptona 1% (w/v), extracto de levaduras 0,5% (w/v), NaCl 0,5% (w/v)) y ampicilina a 100  $\mu$ g/mL.

Para la selección de colonias añadimos previamente a la placa IPTG al 20 % y X-Gal al 2 %. Las placas se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Se seleccionaron las colonias blancas. Cuando el inserto se introduce adecuadamente en la posición de clonaje interrumpe la secuencia codificante de la  $\beta$ -galactosidasa, lo que evita la reacción de coloración azul que produce la  $\beta$ -galactosidasa al actuar sobre el IPTG y el X-Gal y, por tanto, se producen colonias blancas.

Para confirmar los clones que habían incorporado correctamente la secuencia, incubamos una pequeña cantidad de cada clon en 5 mL de medio LB y ampicilina (100  $\mu$ g/mL), durante 12 horas, a 37°C, en agitación. A continuación se tomó 1 mL de cada cultivo, se centrifugó durante 1 minuto a 10000 x g y se descartó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió en 50  $\mu$ L de solución de suspensión (Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, EDTA 10 mM, RNasa A 100  $\mu$ g/mL). Posteriormente las células se lisaron en 100  $\mu$ L de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Esta disolución se mezcló mediante inversión y se añadieron 325  $\mu$ L de solución de neutralización (acetato potásico 1,32 M). Se volvió a invertir y se centrifugó 1 minuto a 10000 x g.

El sobrenadante se pasó a través de una columna provista de una membrana de sílice, a la que se añadieron 300  $\mu$ L de solución de lavado (acetato potásico 80 mM, EDTA 40  $\mu$ M, Tris-HCl (pH 7,5) 8,3 mM). Posteriormente la columna se centrifugó 1 minuto a 10000 x g y a continuación se añadieron 50  $\mu$ L de solución de elución (Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, EDTA 1mM), para recuperar el DNA plasmídico retenido en la columna.

Finalmente se digirió el DNA plasmídico con la enzima de restricción *EcoR I* y se analizó el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % comprobando que el inserto se había incorporado a la estructura del DNA plasmídico.

### 3.2.11.1 Amplificación y marcaje de la secuencia de RNA de SCD-1

Las sondas, sentido y antisentido, utilizadas en la hibridación *in situ* fueron de RNA y se sintetizaron con SP6 RNA polimerasa y con T7 RNA polimerasa, respectivamente.

Previamente se linearizó el plásmido, Para ello se utilizó 1µg de plásmido y se incubó a 37°C durante 2 horas en presencia de la enzima de restricción, *Apa I* o *Sal I*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el plásmido linearizado, se procedió a la amplificación y al marcaje de la sonda mediante el kit de marcaje de la casa comercial Roche. El plásmido digerido con *Apa I* se utilizó para amplificar la sonda con la RNA polimerasa que reconocía SP6. Y para el plásmido digerido por *Sal I* se utilizó la T7 RNA polimerasa. En este proceso se emplearon 1 µg de plásmido digerido, inhibidor de RNasa 2 U/µL, mezcla de ribonucleótidos en la cual la uridina está marcada con digoxigenina a una concentración final de 50 mM, SP6 o T7 RNA polimerasa 4 U/µL, 20% (v/v) buffer de transcripción 10x, 50% (v/v) agua libre de RNasas. La reacción transcurrió a 37°C durante 2 horas, momento en el que se añadió EDTA a una concentración final de 20 mM para detener la reacción. Los nucleótidos no incorporados se separaron de la sonda por un sistema de cromatografía en columna.

### 3.2.11.2 Dot blot

La calidad de la amplificación y marcaje de la sonda se verificó visualmente mediante un “dot-blot”, que consiste en colocar una gota de la sonda marcada en diluciones crecientes sobre una membrana de nylon. Tras realizar la unión covalente del RNA a la membrana mediante radiación ultravioleta, se bloqueó con una solución de reactivo bloqueante comercial (Roche) al 10% en un horno de hibridación, en agitación, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. A continuación, se añadió el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1:20000) y se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana dos veces con tampón de lavado (150 mM NaCl, 100 mM ácido maleico pH 7,5, 0,3 %Tween 20) durante 15 minutos.

El anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia. Para ello, se equilibró la membrana con tampón de detección (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, preparado en agua ultrapura a un pH 9,5), durante 2 minutos en agitación suave. Posteriormente, la membrana se incubó con el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (1:100), a 37°C. La detección de los ácidos nucleicos hibridados se llevó a cabo exponiendo esta membrana a una película de autorradiografía, que detecta la señal quimioluminiscente.



### 3.2.12 Hibridación *in situ*

Las secciones coronales de cerebro se fijaron en paraformaldehído al 4%, durante 10 minutos, seguido de 3 lavados de 10 min cada uno en PBS. A continuación, se incubaron durante 10min en una solución de acetilación compuesta por 1,5% de trietanolamina, 150 mM de HCl, 0,25% de anhídrido acético. Posteriormente, los cortes se permeabilizaron con triton-X-100 al 1% en PBS durante 30 min. Se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. A continuación, se incubaron en un medio de prehibridación (NaCl 270 mM, Tris-HCl 10 mM, Tris Base 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, EDTA a 5 mM, 50% (v/v) de formamida, 10% (v/v) de sulfato de dextrano, tRNA a 1 mg/mL, solución de Denhardt a 1X) durante 3 horas a 70°C.

Transcurrido ese tiempo, se realizó el proceso de hibridación a una temperatura de 70°C durante 10 h en el que se añadió, a la solución de prehibridación, la sonda marcada con digoxigenina previamente desnaturalizada mediante calentamiento a 80°C durante 5 minutos y seguidamente enfriada en hielo.

Después se lavó 1 hora con SSC 0,2x a 70°C y, posteriormente, 5 minutos con SSC 0,2x a temperatura ambiente. Se equilibró durante 5 minutos en tampón B1 (Tri-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1%) para favorecer la incubación con el anticuerpo anti-digoxigenina-AP. A continuación, el anticuerpo se diluyó 1:3000 en una disolución compuesta por el tampón B1 con suero de cabra inactivado por calor (T<sup>a</sup> 55°C) al 1% durante 12 horas a temperatura ambiente.

El exceso de anticuerpo se retiró con 3 lavados de 10 minutos en tampón B1. Posteriormente el tejido se equilibró a un pH 9,5 mediante el tampón B2 (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Tween 0,1%) que favorecía el correcto funcionamiento de las fosfatasa. Se incubó 2 veces durante 10 minutos cada vez. Una vez equilibrado el pH, se incubó en tampón B3 (10 mL de tampón B2 y 200 µL de la solución comercial NBT/BCIP) a temperatura ambiente, en oscuridad y durante un tiempo aproximado de 7 horas, momento en el que se pudo visualizar a través del microscopio el marcaje positivo de la sonda sobre el tejido. La reacción se paró definitivamente realizando varios lavados con PBS. Finalmente las preparaciones se montaron usando un agente preservador del tejido.

### 3.2.13 Análisis estadístico

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

# RESULTADOS



## 4.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO OLEICO EN EL CEREBRO POR HPLC

La albúmina es una proteína sérica que se encuentra presente en el cerebro durante el desarrollo (véase introducción). Esta proteína es capaz de regular el metabolismo de importantes sustratos para el desarrollo cerebral, tales como la glucosa, el lactato, el 3-hidroxibutirato y la glutamina (Tabernero y col. 1999a; Vicario y col. 1993). En nuestro laboratorio comprobamos que el efecto que lleva a cabo la albúmina sobre el metabolismo de los astrocitos tiene como consecuencia un aumento en la síntesis y exportación del ácido oleico (Tabernero y col. 2001), siendo este proceso dosis-dependiente. Teniendo en cuenta que la albúmina alcanza altas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo durante los primeros días de vida postnatal, comparadas con las observadas en el adulto, (Dziegielewska y col. 1981a; Laborda y col. 1989; Saunders y Mollgard 1984) nos pareció importante la determinación de la concentración de ácido oleico libre en el cerebro en esta etapa.

### 4.1.1 Puesta a punto del método para el análisis de ácidos grasos por HPLC

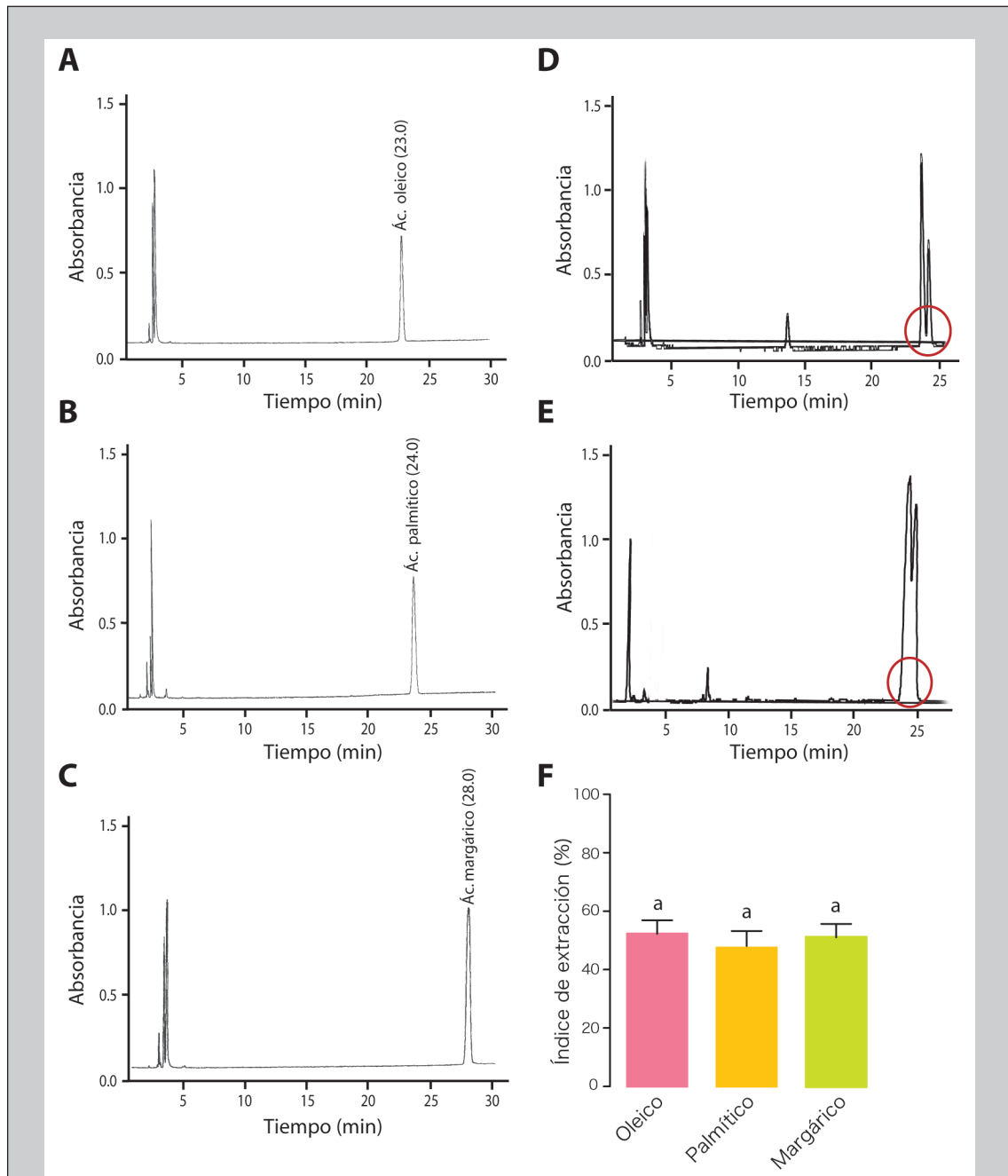
Para la determinación de los ácidos grasos utilizamos un protocolo constituido por tres apartados: extracción de ácidos grasos, derivatización de los mismos y cromatografía por HPLC. Para la extracción de los ácidos grasos libres empleamos el método descrito por Bligh (Bligh y Dyer 1959). Este método se caracteriza por el uso de diferentes solventes orgánicos y acuosos. Los ácidos grasos no contienen estructuras cromóforas, ni fluorescentes, por lo que la detección en el rango del UV-visible requiere su derivatización con un agente cromóforo. Los cromóforos más utilizados en el caso de los ácidos grasos son los fenilésteres. Los dos fenilésteres con mejor coeficiente de extinción y límite de detección en el rango del UV son la  $\alpha$ -bromoacetofenona y el *p*-bromofenacilbromuro. Debido a la interferencia de las especies no reactantes producidas por la  $\alpha$ -bromoacetofenona y a que estas especies afectan a la estabilidad de los fenilésteres, nos decantamos por el *p*-bromofenacilbromuro que no presenta estas desventajas. El método utilizado para la derivatización fue el descrito por Puttmann (Puttmann y col. 1993), (véase Material y Métodos).

Tradicionalmente la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía en capa fina (TLC) unida a la cromatografía de gases se han utilizado para la cuantificación de ácidos grasos. Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ofrece las ventajas de la rapidez, resolución, alta sensibilidad y especificidad. Otra gran ventaja del HPLC frente a GC es la baja temperatura durante el análisis, con lo que se reduce el riesgo de isomerización de los ácidos grasos insaturados.

Elegidos los métodos de extracción, derivatización y sistema cromatográfico, realizamos el estudio de los tiempos de retención del ácido oleico (18:1) y del ácido palmítico (16:0), así como el de un ácido graso utilizado como estándar interno, el ácido margárico (17:0). El ácido oleico y el ácido palmítico están presentes en el cerebro, sin embargo, el ácido margárico es un ácido graso que no está presente en mamíferos. En este sentido, disolvimos cada uno de ellos, por separado, en metanol, los derivatizamos, como se describe en Material y Métodos, y los cromatografiamos por HPLC utilizando como fase estacionaria, una columna de cromasil C-18, y como fase móvil, acetonitrilo/agua a un gradiente que va desde 85:15 a tiempo 0 hasta 100:00 a los 15 minutos, a un flujo de 1,5 mL/min.

Dada la escasa diferencia entre el tiempo de retención del ácido oleico y del ácido palmítico se preparó una mezcla de ácido oleico, ácido palmítico y ácido margárico, los cuales se derivatizaron y se cromatografiaron a diferentes temperaturas, de manera que, cuando la temperatura de la columna fue entre 4 y 10°C la separación de los picos fue satisfactoria (figura 1D). Sin embargo cuando se realizó a 25°C no se resolvió adecuadamente (figura 1F).

Los tiempos de retención fueron de 23 min, de 24 min y de 28 min para el ácido oleico, el ácido palmítico y el ácido margárico, respectivamente figura 1A-C, cuando la columna se encontró entre 4 y 10°C y a un flujo de la fase móvil de 1,5 mL/min.



**Figura 1. Recuperación de los ácidos grasos en el proceso de extracción y separación según la temperatura de la fase estacionaria.**

Tiempo de elución de los patrones de ácido oleico (A), ácido palmitico (B) y de ácido margárico (C). Resolución de los picos de ácido oleico y ácido palmitico según la temperatura de la columna. Cromatogramas representativos obtenidos cuando la temperatura de la fase estacionaria fue de 4-10°C (D) o de 25°C (E) de la fase estacionaria. Recuperación de los ácidos grasos en el proceso de extracción Bligh y Dyer (1959) (F). La recuperación se cuantificó comparando el área que mostraban los ácidos grasos, ácido oleico, ácido palmitico y ácido margárico, presentes en una mezcla con albúmina con respecto al área que mostraban los mismos ácidos grasos preparados independientemente y a la misma concentración que en la mezcla sin someter al proceso de extracción. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de, al menos, cuatro experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas;  $p < 0,01$  (One-way ANOVA seguido del post-test Tukey, nivel de significatividad mayor 95%).

### 4.1.2 Recuperación de los ácidos grasos con el método de extracción de Bligh

Teniendo en cuenta que el proceso de extracción de los ácidos grasos podría no ser eficaz al 100%, nos propusimos estudiar el índice de recuperación de los mismos tras el proceso. Para ello partimos de una disolución de albúmina al 2% en presencia de ácido oleico 10  $\mu\text{M}$ , ácido palmítico 10  $\mu\text{M}$  y ácido margárico 10  $\mu\text{M}$ , la sometimos al proceso de extracción del método de Bligh y la cromatografiamos. Posteriormente, el área se comparó con la de los estándares de dichos ácidos grasos preparados independientemente a la misma concentración, en ausencia de albúmina y sin someter al procesor de extracción.

Como se puede observar en la [figura 1F](#) obtuvimos un índice de recuperación de aproximadamente el 52% para el ácido oleico, 47% para el ácido palmítico y el 50% para el ácido margárico, resultando unas diferencias de extracción no significativas estadísticamente.

### 4.1.3 Evolución de la concentración de ácido oleico en cerebro durante el desarrollo postnatal

Una vez contrastada la validez de la extracción, separación y análisis de los ácidos grasos, decidimos determinar los niveles de ácido oleico durante el desarrollo postnatal del cerebro.

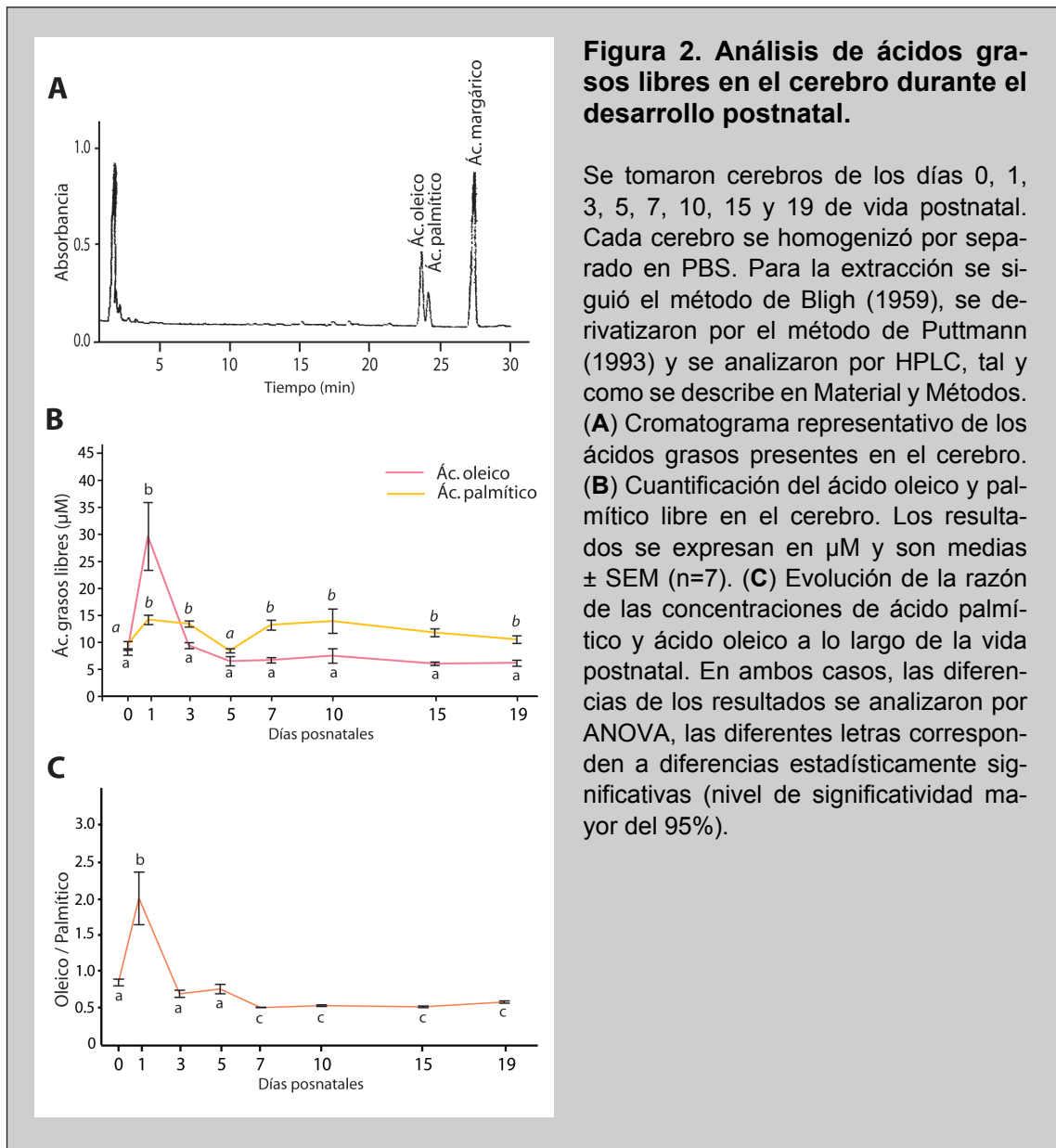
Para conocer los niveles de ácido oleico se recogieron cerebros de rata de los siguientes días de vida postnatal: 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 y 19. Se lavaron varias veces durante 30 minutos en PBS, se homogenizó cada cerebro y se extrajeron los ácidos grasos como se describe en Material y Métodos.

El análisis de los ácidos grasos en el cerebro denotó la presencia de ácido oleico, así como la de otros ácidos grasos, entre los que se encuentra el ácido palmítico (16:0) ([figura 2A](#)). Las concentraciones de ácido oleico y ácido palmítico, correspondientes a los diferentes días de vida postnatal, muestran que el ácido oleico presenta un aumento muy significativo de su concentración en el cerebro en el día 1 tras el

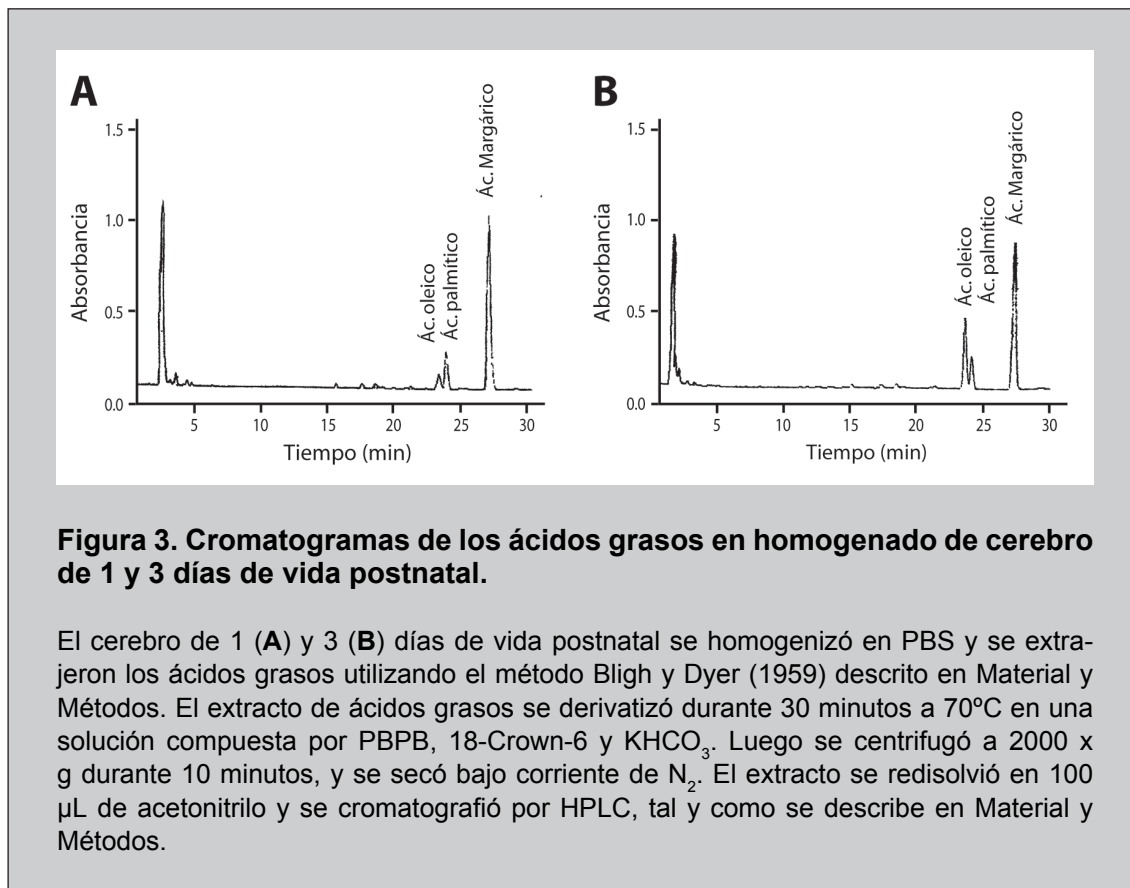


nacimiento. Asimismo, la concentración de ácido oleico el día 1 fue 3 veces mayor al día 0 y al día 3. Por el contrario, el ácido palmítico muestra una concentración muy similar durante todo el desarrollo postnatal a excepción del día 0 y del día 5 donde presenta una disminución cercana al 50% en su concentración [figura 2B](#).

La [figura 2C](#) revela que la razón ácido oleico/ácido palmítico es casi tres veces mayor el día 1 postnatal que el día 0, y casi cuatro veces mayor comparada con el resto de los días.



En la [figura 3](#) podemos ver dos cromatogramas representativos, en los que se observa una mayor concentración de ácido oleico en el día 1 ([figura 3A](#)) comparado con el día 3 ([figura 3B](#)).



## 4.2 LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA RESPONSABLE DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDO OLEICO EN EL CEREBRO

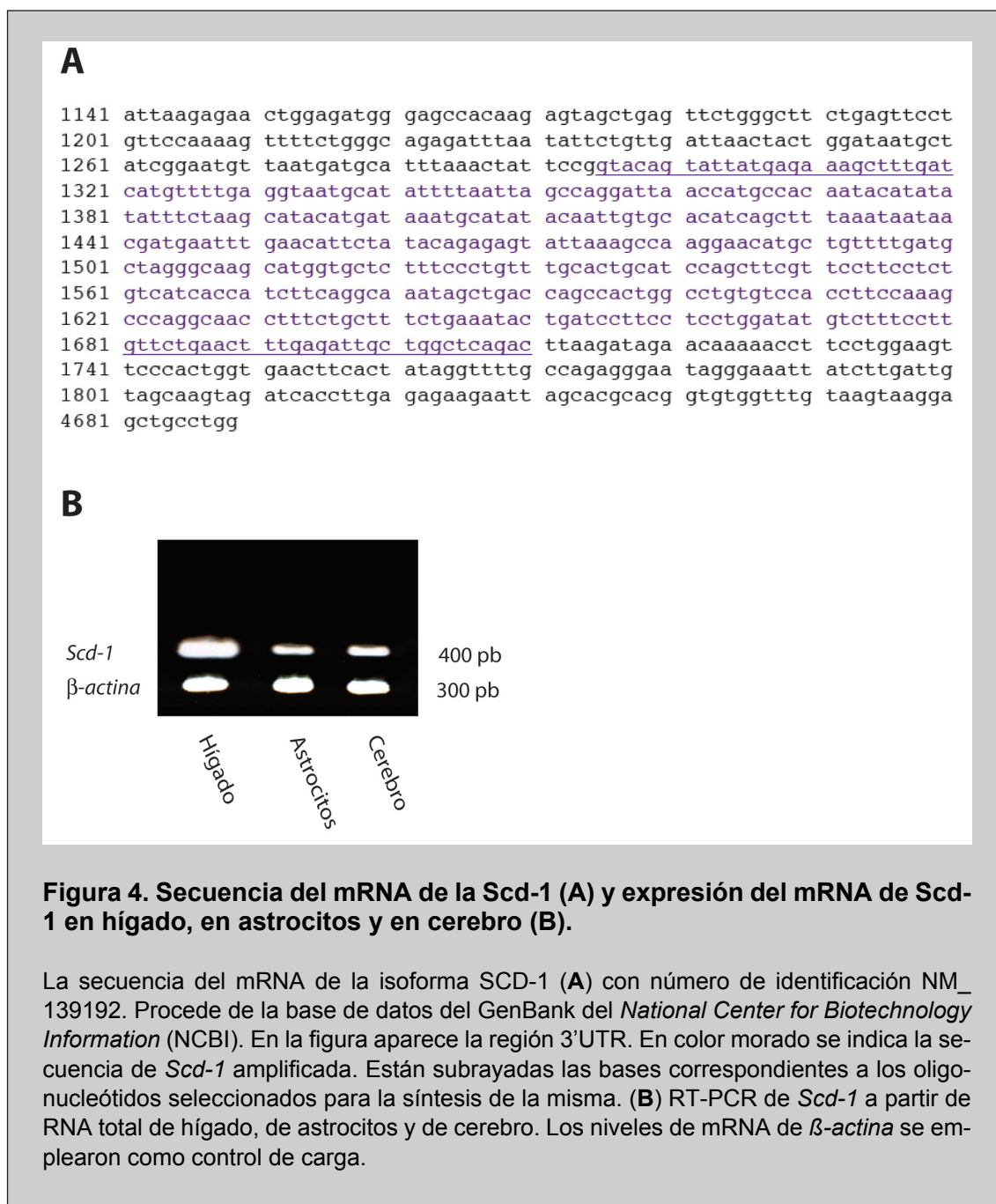
La enzima clave en la regulación de la síntesis de ácido oleico es la estearil-CoA desaturasa (SCD). Esta enzima está encargada de introducir el doble enlace en posición *cis* en el carbono 9 del ácido esteárico (Enoch y col. 1976). En trabajos previos de nuestro laboratorio se comprobó que la albúmina inducía específicamente la isoforma 1 de la SCD en astrocitos (Tabernero y col. 2002b). Así mismo, pudimos comprobar que esta enzima presentaba un aumento de su expresión durante los primeros días de vida postnatal (Velasco y col. 2003). Debido a estos antecedentes y al aumento en la concentración de ácido oleico que se observa en el cerebro en esta etapa, nuestro siguiente objetivo fue localizar la región del cerebro en la cual se producía la síntesis de ácido oleico y por ello analizamos la expresión de la enzima limitante de este proceso, la SCD-1.

### 4.2.1 Construcción de una sonda para la localización de la estearil-CoA desaturasa-1

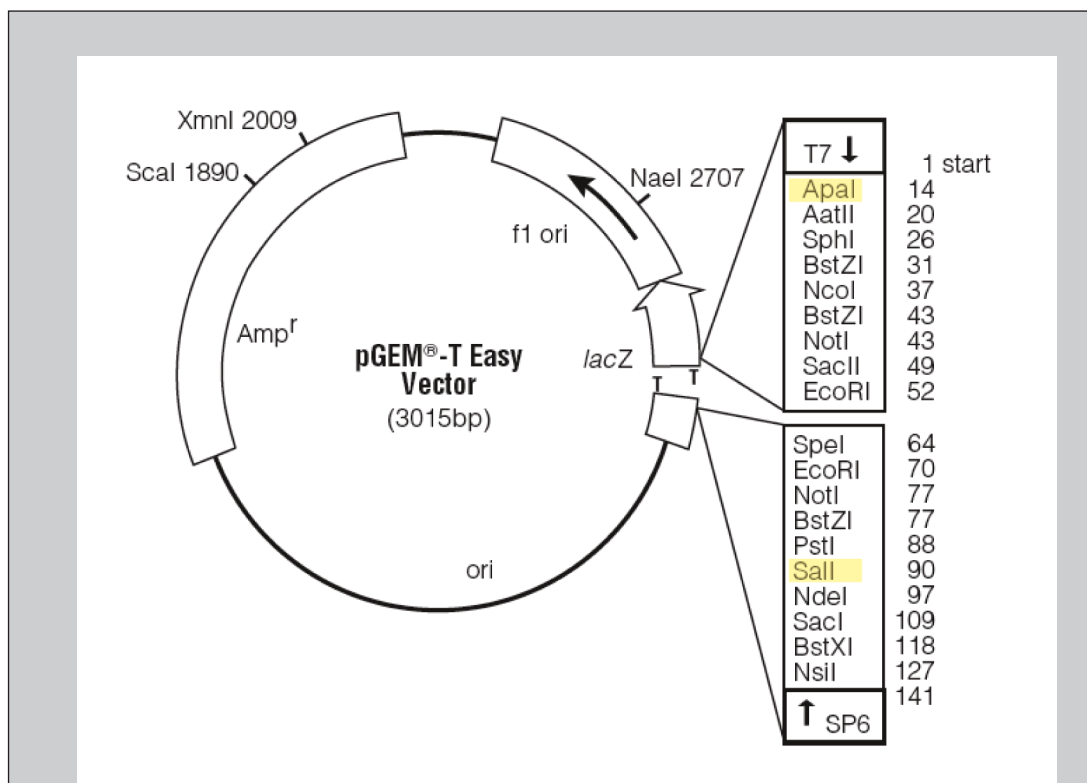
La estearil-CoA desaturasa (SCD) posee dos isoformas en el genoma de la rata, SCD-1 y SCD-2. Como ya hemos mencionado antes, la responsable de la síntesis de ácido oleico, en cultivo de astrocitos, es la SCD-1. Ante la falta de un anticuerpo comercial específico y fiable para la determinación de la SCD-1, decidimos construir una sonda específica de RNA para localizar el mRNA de la SCD-1 por hibridación *in situ*.

La secuencia de mRNA que codifica la isoforma SCD-1 está localizada en la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y su número de identificación es NM\_139192. Las secuencias que codifican para las dos isoformas, SCD-1 y SCD-2, presentan un 89% de homología. Sin embargo, la secuencia que codifica la región 3'UTR de estas isoformas es diferente. Por tanto, decidimos elaborar una sonda específica para la SCD-1 localizada en esta región del mRNA.

Utilizando oligonucleótidos específicos (subrayado en la [figura 4A](#)) que sirvieron como cebadores en la reacción de RT-PCR, en la que se empleó como molde una muestra de RNA total de hígado, se sintetizó la secuencia de cDNA que nos serviría de molde para la síntesis de la sonda de RNA de SCD-1. El producto obtenido de la reacción de síntesis fue de aproximadamente 400 pb tanto en hígado, en cerebro como en astrocitos ([figura 4B](#)) y de acuerdo al tamaño teórico de 416 pb esperado ([figura 4A](#)).



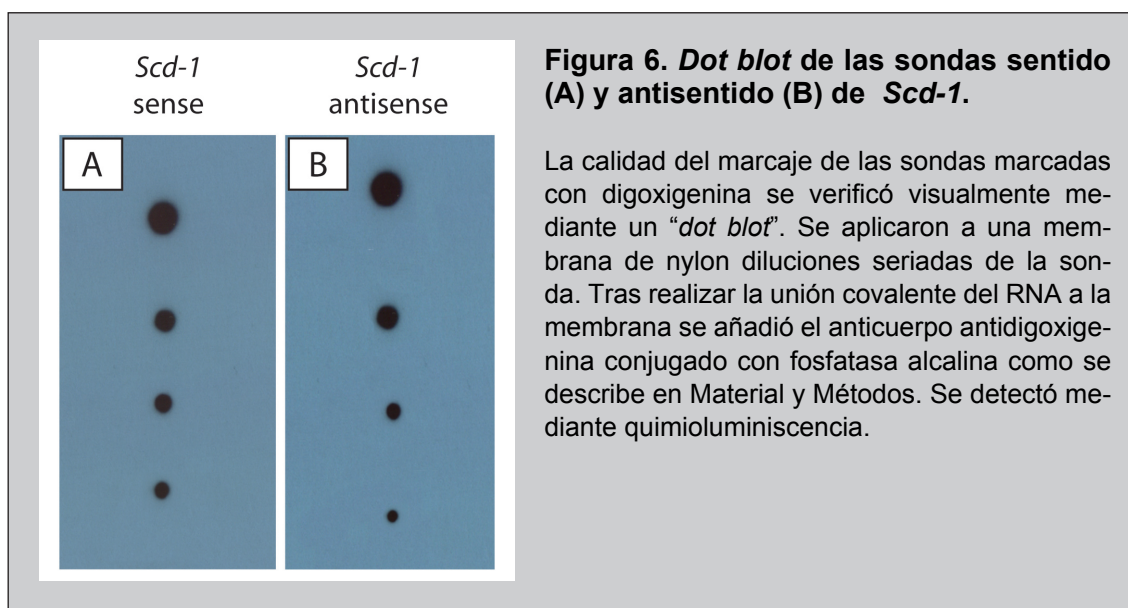
Para la síntesis de la sonda se utilizó como vector el plásmido pGEM-T Easy (figura 5) que contiene una región de clonaje flanqueada a ambos lados por los sitios de iniciación de la transcripción de las polimerasas T7 y SP6 de RNA. Posteriormente el plásmido se amplificó mediante transformación bacteriana, utilizando la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Esta cepa transformada se sembró en placas de agar con medio LB más ampicilina y en presencia de IPTG y X-Gal y se cultivaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se seleccionaron las colonias blancas, las cuales poseían nuestro inserto, y se crecieron en volúmenes mayores de medio de cultivo. Todo este proceso se llevó a cabo tal y como se describe en Material y Métodos.



**Figura 5. Plásmido pGEM-T Easy empleado para la clonación de la secuencia de cDNA de *Scd-1*.**

En el plásmido pGEM-T Easy se clonó la secuencia de *Scd-1* mediante transformación bacteriana utilizando la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. En color amarillo aparecen las enzimas de restricción empleadas para la síntesis de las sondas sentido y antisentido de *Scd-1*.

Una vez obtenida la suficiente cantidad de plásmido, sintetizamos la sonda de RNA empleando las polimerasas T7 y SP6 de RNA, de esta manera obtuvimos la sonda sentido y la antisentido de RNA de *Scd-1*. Este proceso lo utilizamos, a su vez, para marcar la sonda con digoxigenina, la cual nos permitirá su identificación en la hibridación *in situ*. Para comprobar el marcaje de la sonda con digoxigenina, se realizó la técnica de *dot blot* (descrita en Material y Métodos). En la [figura 6](#) se puede observar que las diferentes concentraciones de sonda, sentido y antisentido, están marcadas suficientemente a juzgar por su visualización en el revelado.

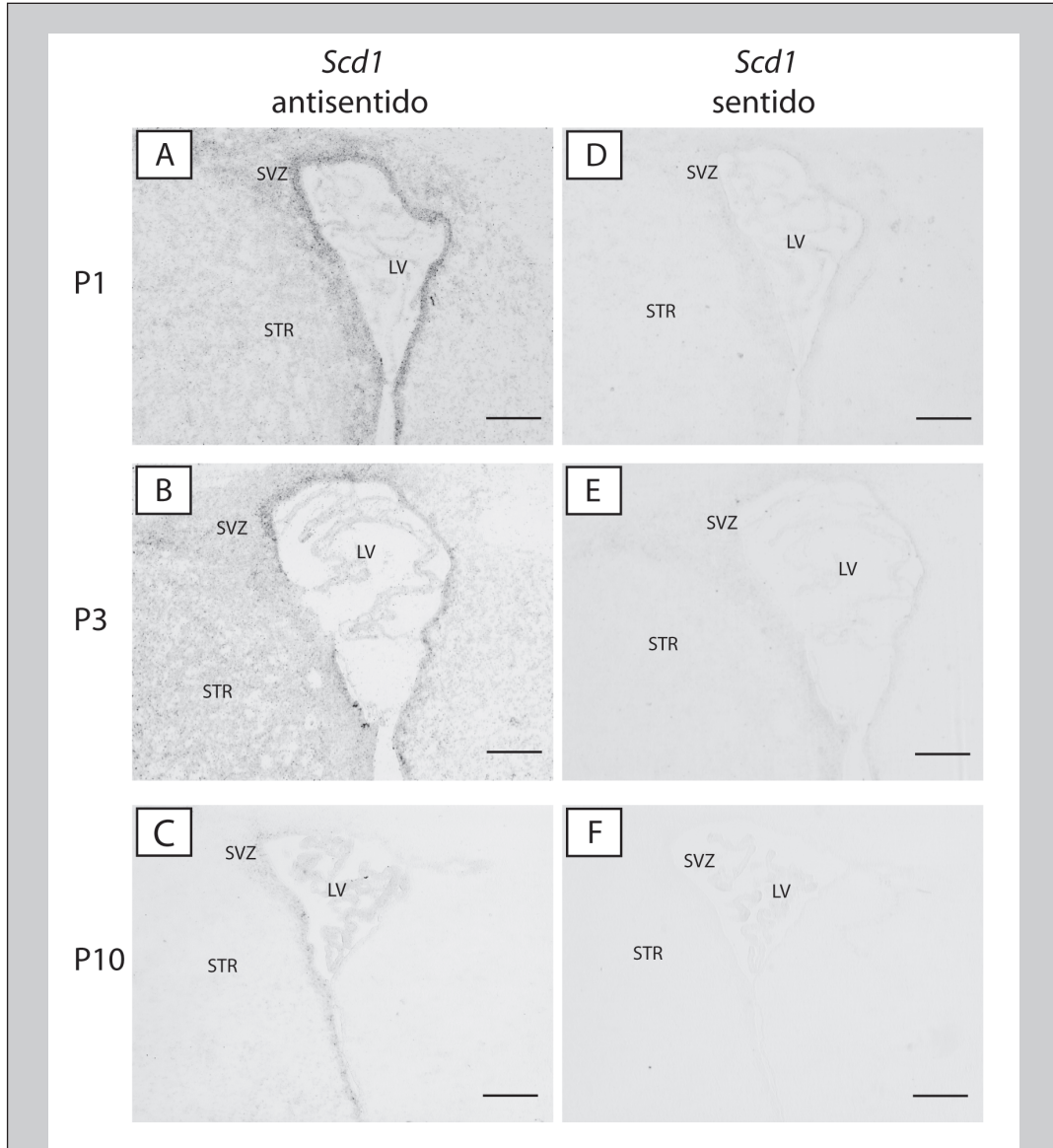


#### 4.2.2 Localización del mRNA de la estearil-CoA desaturasa-1 en el cerebro

Una vez realizada la sonda, decidimos investigar cual era la región o regiones del cerebro en las que se localiza la SCD-1. Para ello se fijaron cerebros de animales de 1, 3 y 10 días de vida postnatal mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 30% y se cortaron en secciones coronales de 20  $\mu\text{m}$  con la ayuda de un criostato.

A continuación, procedimos a realizar la hibridación *in situ* con el fin de analizar la distribución espacio-temporal del mRNA de la SCD-1. Nuestros resultados revelaron que a P1 el nivel de mRNA de la SCD-1 era alto y estaba confinado en las células que rodean los ventrículos laterales del cerebro, incluyendo la SVZ ([figura 7A](#)). A P3, los niveles son menores y se detecta todavía en la zona subventricular, especialmente en la zona de unión de las regiones del palio y del subpalio ([figura 7B](#)).

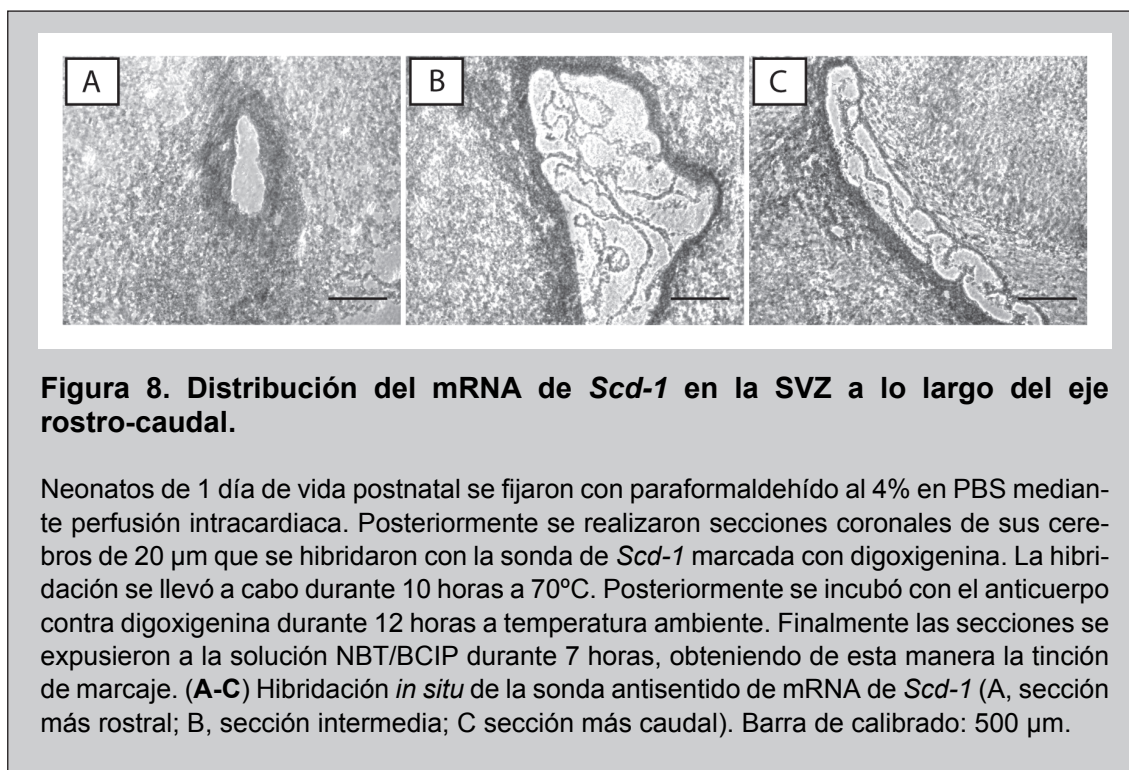
Por el contrario, a P10, el marcaje es prácticamente indetectable, a excepción de una leve señal en la SVZ de la región colindante con el estriado (figura 7C). Como control negativo se empleó la sonda sentido del RNA de la SCD-1 (figura 7D-F), no observándose marcaje en ninguno de los tres días.



**Figura 7. Distribución espacio-temporal del mRNA de la *Scd-1* en la SVZ durante el desarrollo postnatal.**

Neonatos de 1, 3 y 10 días se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS mediante perfusión intracardiaca. Posteriormente se realizaron secciones coronales de sus cerebros de 20  $\mu\text{m}$  que se hibridaron con la sonda de *Scd-1* marcada con digoxigenina. La hibridación se llevó a cabo durante 12 horas a 70°C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo contra digoxigenina durante 10 horas a temperatura ambiente. Finalmente las secciones se expusieron a la solución NBT/BCIP durante 7 horas, obteniendo de esta manera la tinción de marcaje. (A-C) Hibridación *in situ* de la sonda antisentido de mRNA de *Scd-1*. (D-F) Control negativo de la hibridación *in situ* de *Scd-1* realizado con la sonda sentido de mRNA. Abreviaturas: LV, ventrículo lateral; STR, estriado; SVZ, zona subventricular. Barra de calibrado: 500  $\mu\text{m}$ .

Así mismo, también pudimos comprobar la presencia de la SCD-1 a lo largo del eje rostro-caudal circundando el ventrículo (figura 8), siendo, en el extremo más caudal, la tinción más fuerte en el lateral estriado de la SVZ (figura 8C).



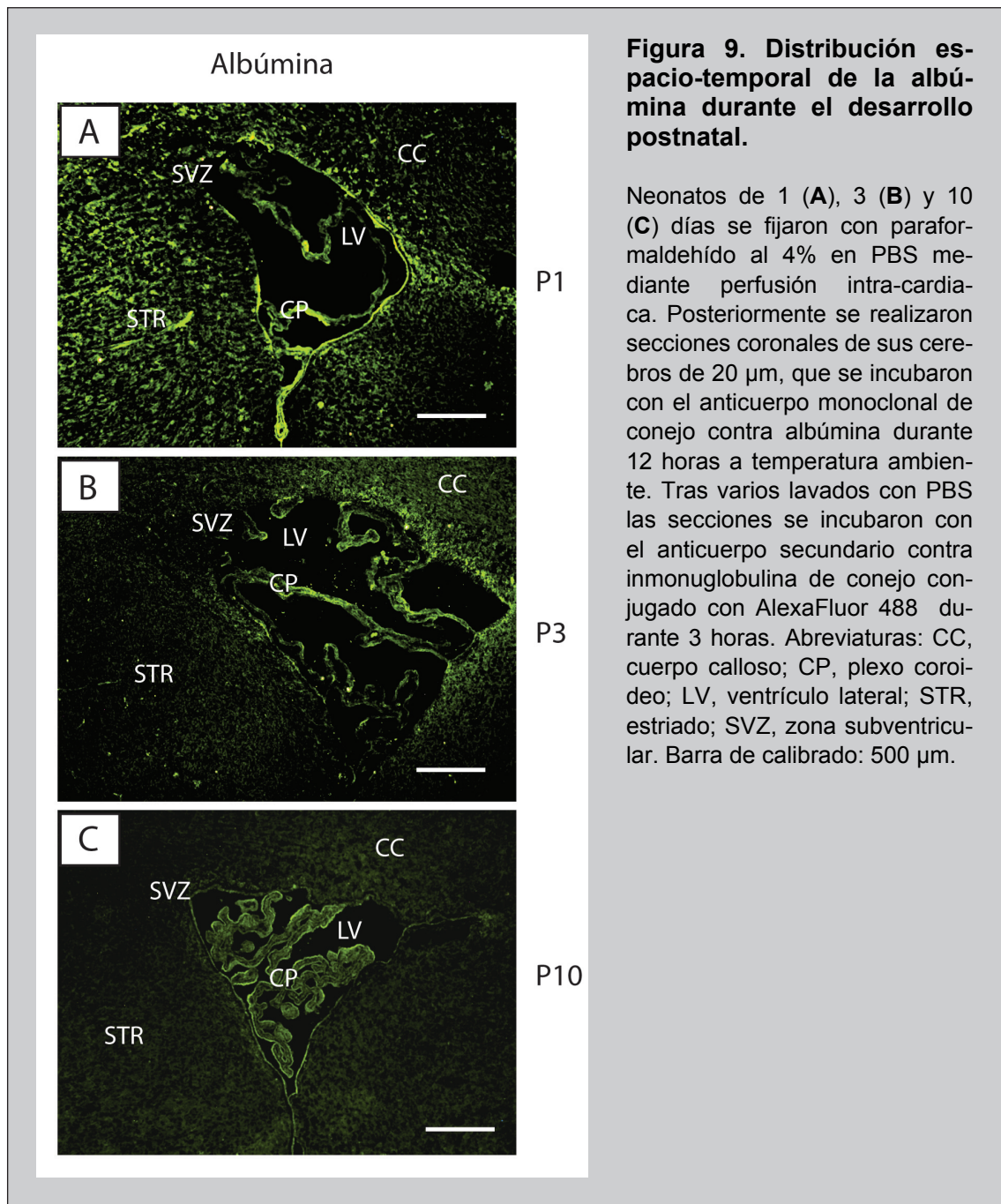
#### 4.2.3 Relación espacio-temporal de la SCD-1 con la albúmina

La albúmina es una proteína sérica que en circunstancias normales no está presente en el cerebro adulto pero que durante el desarrollo se localiza en el líquido cefalorraquídeo (Dziegielewska y col. 1981a) y en la masa cerebral (Velasco y col., 2001). Dicha proteína regula la síntesis de ácido oleico en astrocitos activando el factor de transcripción SREBP, el cual induce la SCD-1, con el consiguiente aumento de la síntesis de ácido oleico (Tabernero y col. 2002b).

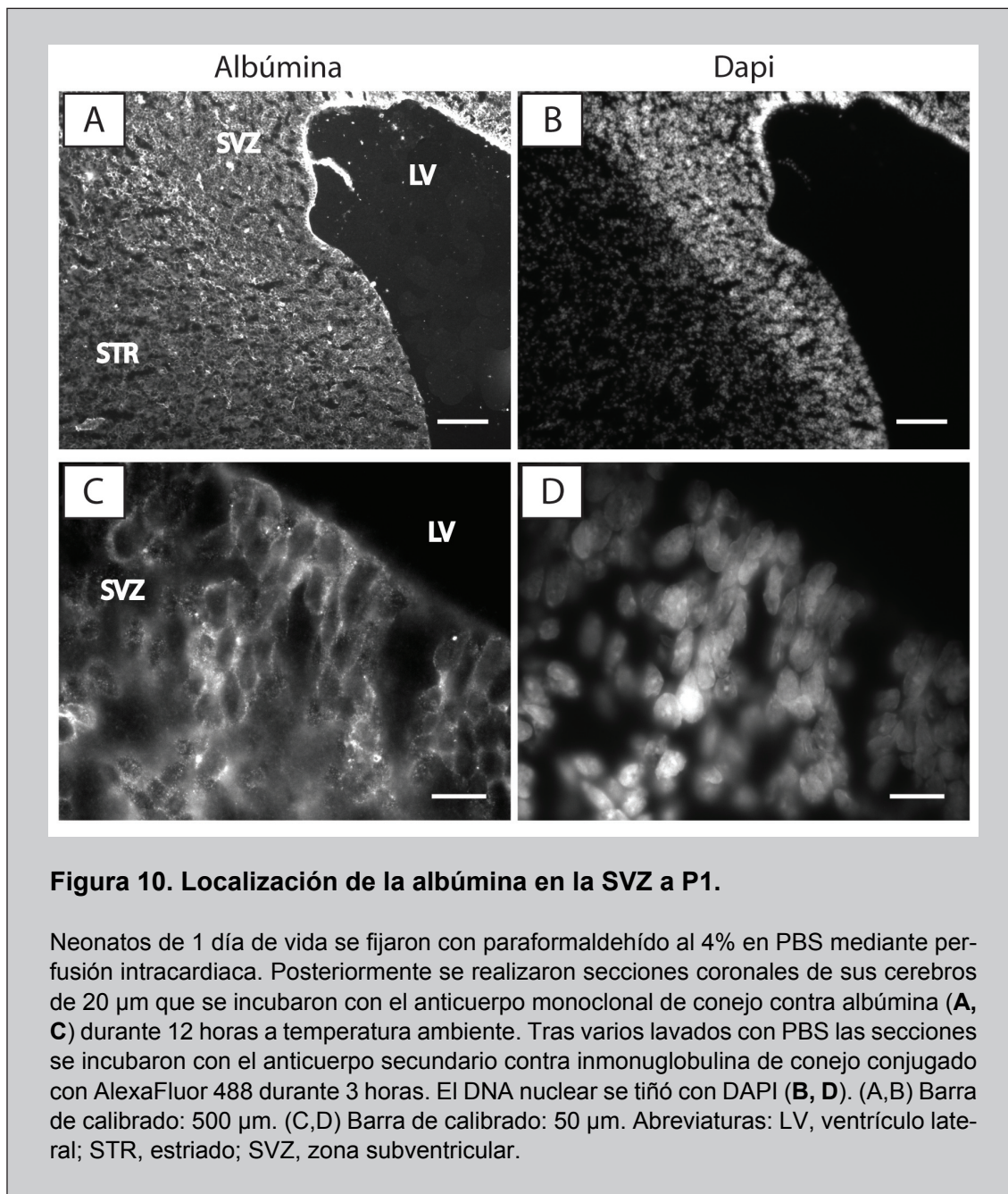
Con objeto de estudiar el lugar en el que se localiza la albúmina en el cerebro en desarrollo realizamos inmunohistoquímicas de albúmina sobre cortes coronales a diferentes edades. Para ello se emplearon animales de 1, 3 y 10 días de vida y se fijaron mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, los cerebros se crioprotegieron con sacarosa al 30% y, finalmente, se cortaron en secciones coronales de 20 µm con la ayuda de un criostato. Las secciones se recogieron sobre portaobjetos recubiertos de polilisina.



Los resultados revelaron (figura 9) la presencia de la albúmina a P1 (fig. 9A) en el plexo coroideo, en la SVZ, en el cuerpo caloso y en el estriado. A P3, (fig. 9B) la albúmina en el cerebro ha descendido en gran medida, siendo evidente su presencia en plexo coroideo y en la región circundante al ventrículo. Sin embargo, a P10 (fig. 9C), la albúmina queda recluida en el plexo coroideo y a una única línea de células rodeando el ventrículo.



Dado nuestro interés por estudiar la relación de la albúmina con la SCD-1, tomamos microfotografías de mayor detalle de la SVZ, región donde se expresa dicha enzima, [figura 10](#). Así, en la [figura 10A](#), se muestra la amplia presencia de albúmina en las células que conforman la SVZ, observándose que ésta parece penetrar desde la luz ventricular hacia el interior del parénquima [figura 10C](#).



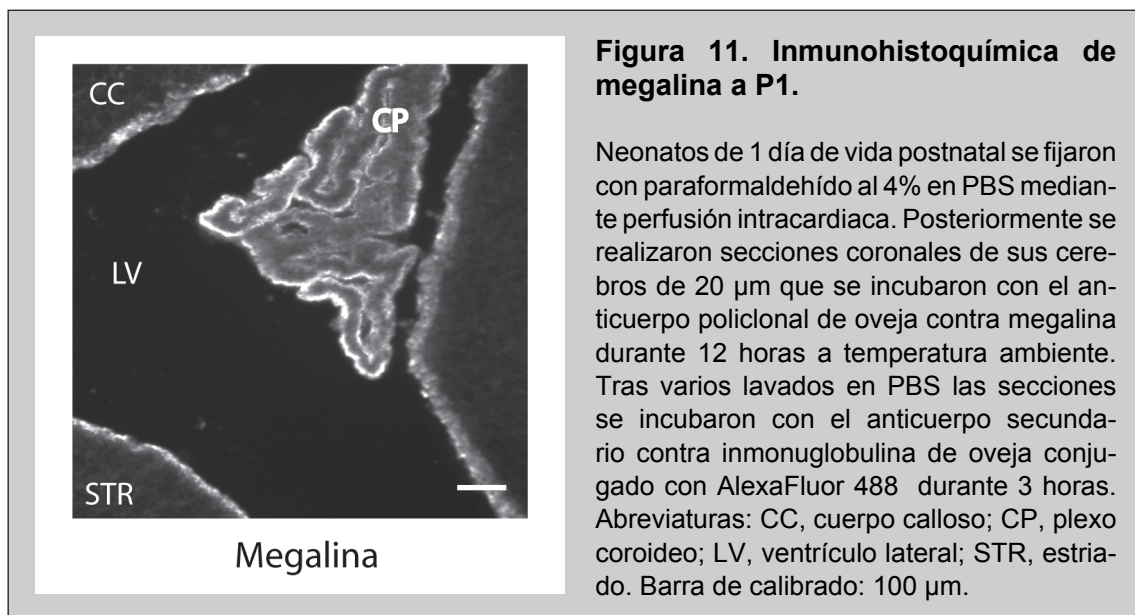
**Figura 10. Localización de la albúmina en la SVZ a P1.**

Neonatos de 1 día de vida se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS mediante perfusión intracardiaca. Posteriormente se realizaron secciones coronales de sus cerebros de 20  $\mu\text{m}$  que se incubaron con el anticuerpo monoclonal de conejo contra albúmina (A, C) durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmonoglobulina de conejo conjugado con AlexaFluor 488 durante 3 horas. El DNA nuclear se tiñó con DAPI (B, D). (A,B) Barra de calibrado: 500  $\mu\text{m}$ . (C,D) Barra de calibrado: 50  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas: LV, ventrículo lateral; STR, estriado; SVZ, zona subventricular.

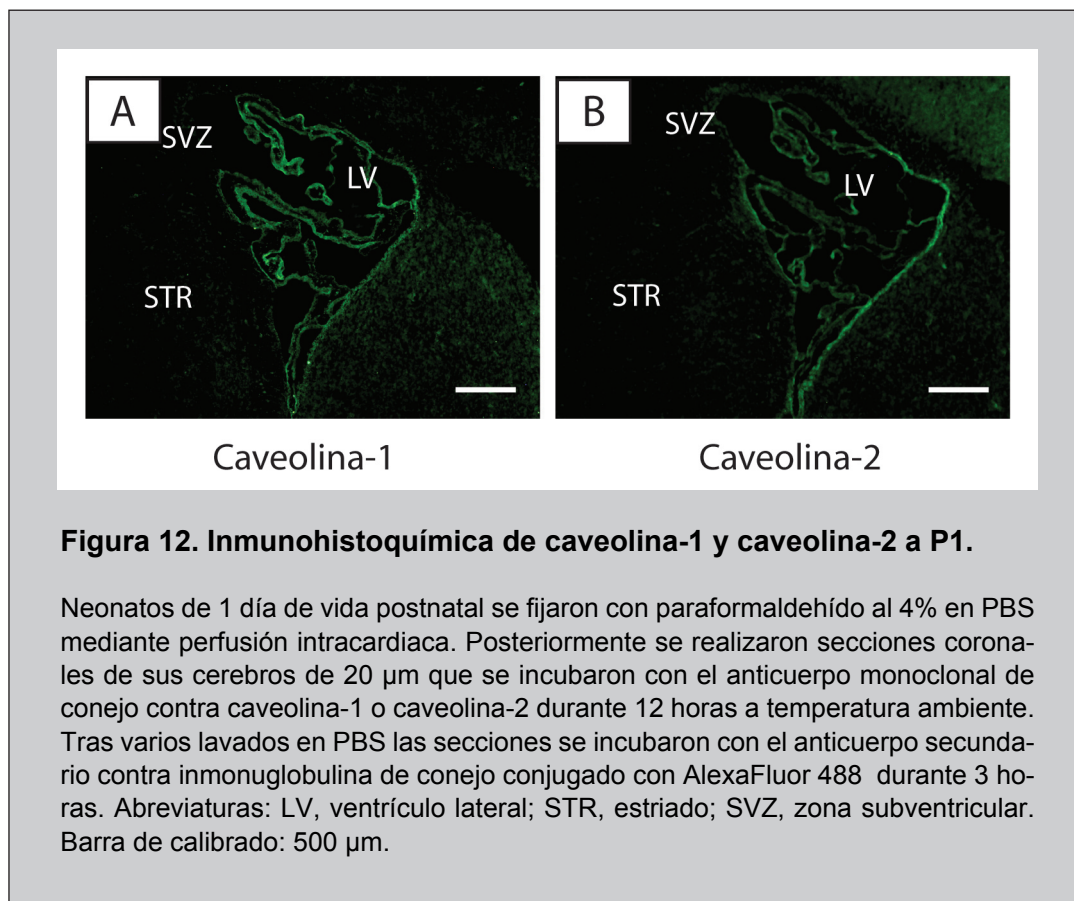
#### 4.2.4 Distribución espacio-temporal del receptor de la albúmina, la megalina, y las proteínas implicadas en su internalización, caveolina-1 y caveolina-2, en el cerebro durante el desarrollo postnatal

En trabajos recientes en nuestro laboratorio, hemos descrito que el receptor de la albúmina en los astrocitos, células que sintetizan el ácido oleico *in vitro*, es la megalina (Bento-Abreu y col. 2008) y su endocitosis se lleva a cabo de forma caveolina dependiente (Bento-Abreu y col., enviado para su publicación). Para explicar que la albúmina sólo se encuentra presente en el cerebro durante el desarrollo se propuso un sistema de transporte específico desde la sangre hasta el cerebro, que sólo es activo durante el desarrollo postnatal (Habgood y col. 1992; Ohsugi y col. 1992).

Para estudiar la localización del receptor de la albúmina, megalina, en el cerebro realizamos una inmunohistoquímica de megalina en cortes coronales de neonatos. Los resultados muestran que la megalina se expresa, tanto en el plexo coroideo como alrededor del ventrículo, [figura 11](#).



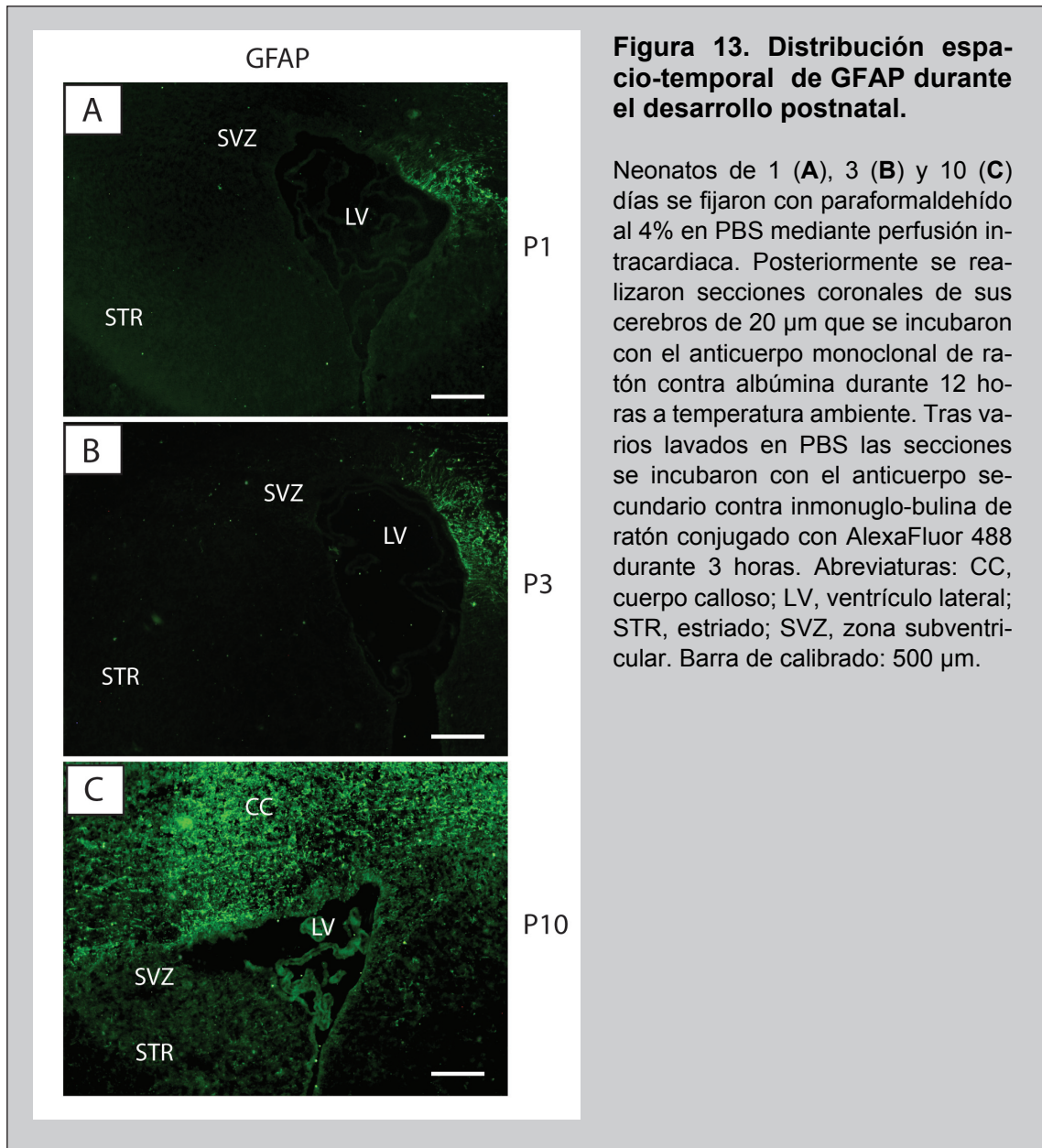
De la misma manera procedimos para analizar la expresión de la caveolina-1 y de la caveolina-2, ya que ambas proteínas participan en la internalización de la albúmina en el astrocito. La [figura 12](#) revela la presencia de caveolina-1 y caveolina-2 en el plexo coroideo y en las células que rodean el ventrículo.



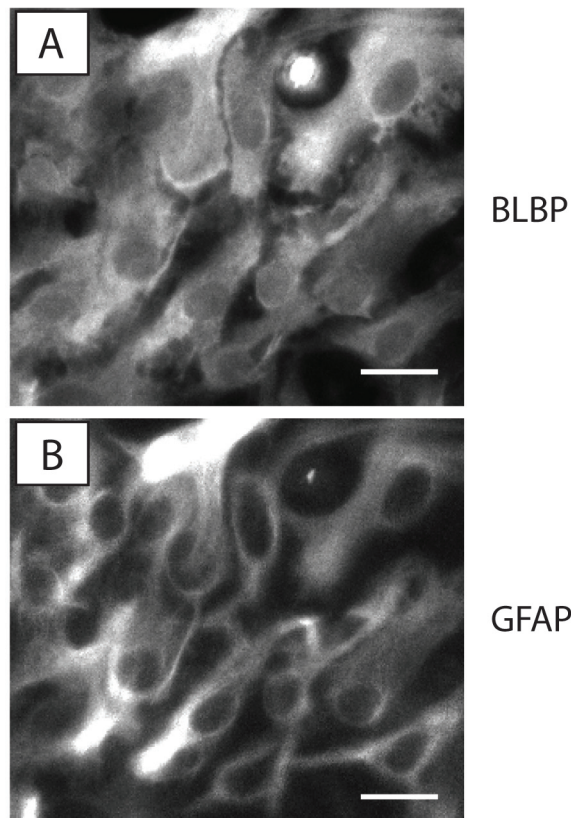
#### 4.2.5 Estudio del fenotipo de las células que rodean al ventrículo durante el desarrollo postnatal

En nuestro laboratorio describimos que la presencia de albúmina en cultivo de astrocitos, previa endocitosis, induce la síntesis de ácido oleico que es liberado al medio extracelular formando el complejo albúmina-ácido oleico (Tabernero y col. 2002b).

Teniendo en cuenta estos precedentes nos propusimos estudiar si estas células guardaban una relación espacio-temporal con la expresión de la enzima sintetizadora del ácido oleico, la SCD-1. Para ello, realizamos inmunohistoquímicas contra GFAP, proteína característica de astrocitos, en cortes coronales a diferentes edades postnatales, 1, 3 y 10 días. Los resultados revelan que las células GFAP positivas no están relacionadas con la presencia de mRNA de SCD-1 [figura 13](#), ya que la región de expresión de GFAP no coincide con la de SCD-1 ([figura 7](#)).

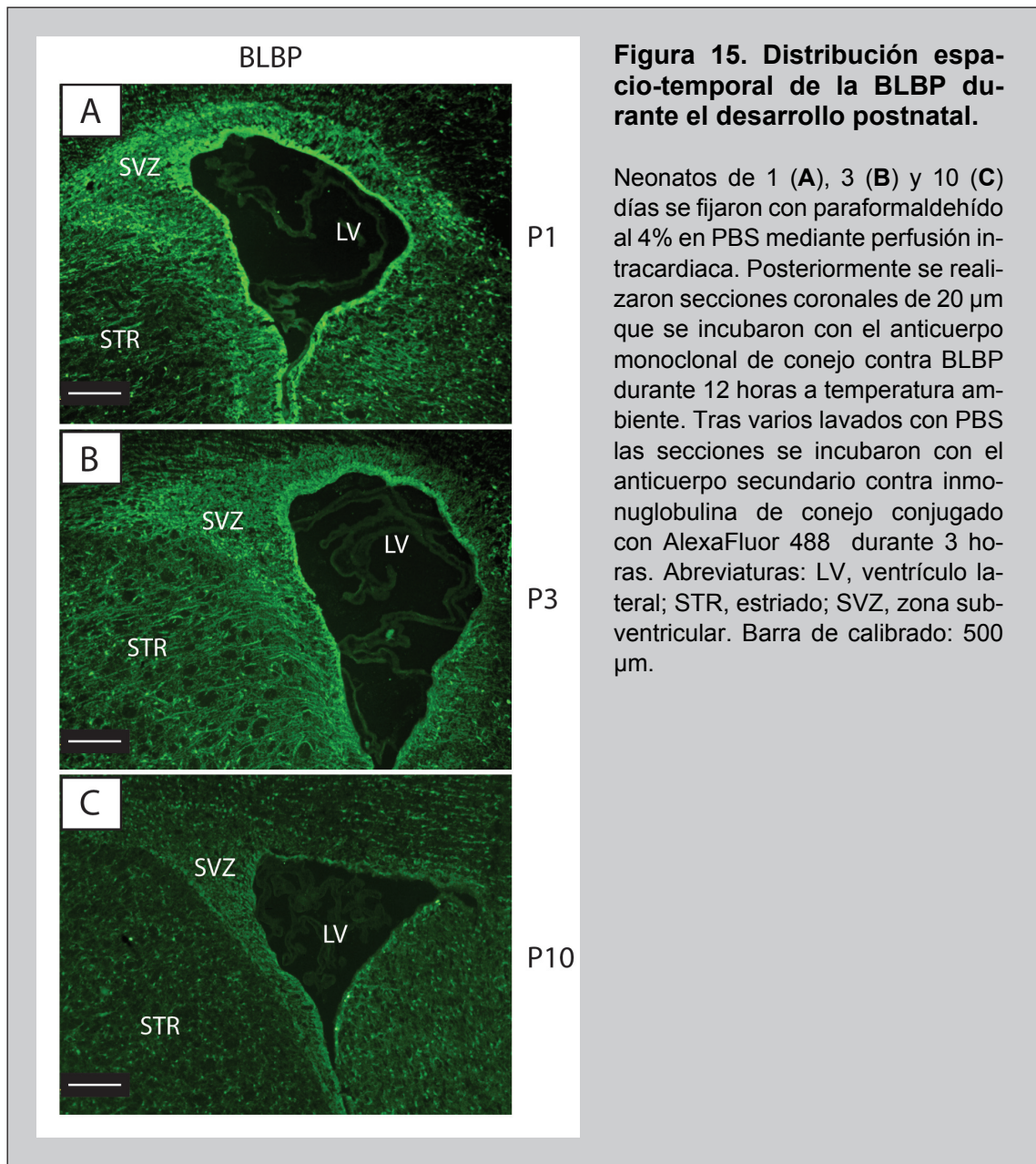


En los cultivos primarios de astrocitos las células, además de GFAP, expresan BLBP, [figura 14](#). Dado que el cerebro del neonato se encuentra en pleno proceso de maduración, decidimos realizar inmunohistoquímicas contra BLBP, proteína característica de la glía radial, precursora de astrocitos y neuronas. Para ello, se emplearon, cortes coronales de 1, 3 y 10 días postnatales. Las imágenes muestran ([figura 15](#)) como las células que rodean el ventrículo presentan una elevada expresión de BLBP a P1, también patente a P3. Sin embargo a P10, el patrón de expresión de esta proteína ya no se caracteriza por marcar las células que rodean el ventrículo, sino que aparece más dispersa por el parénquima cerebral.

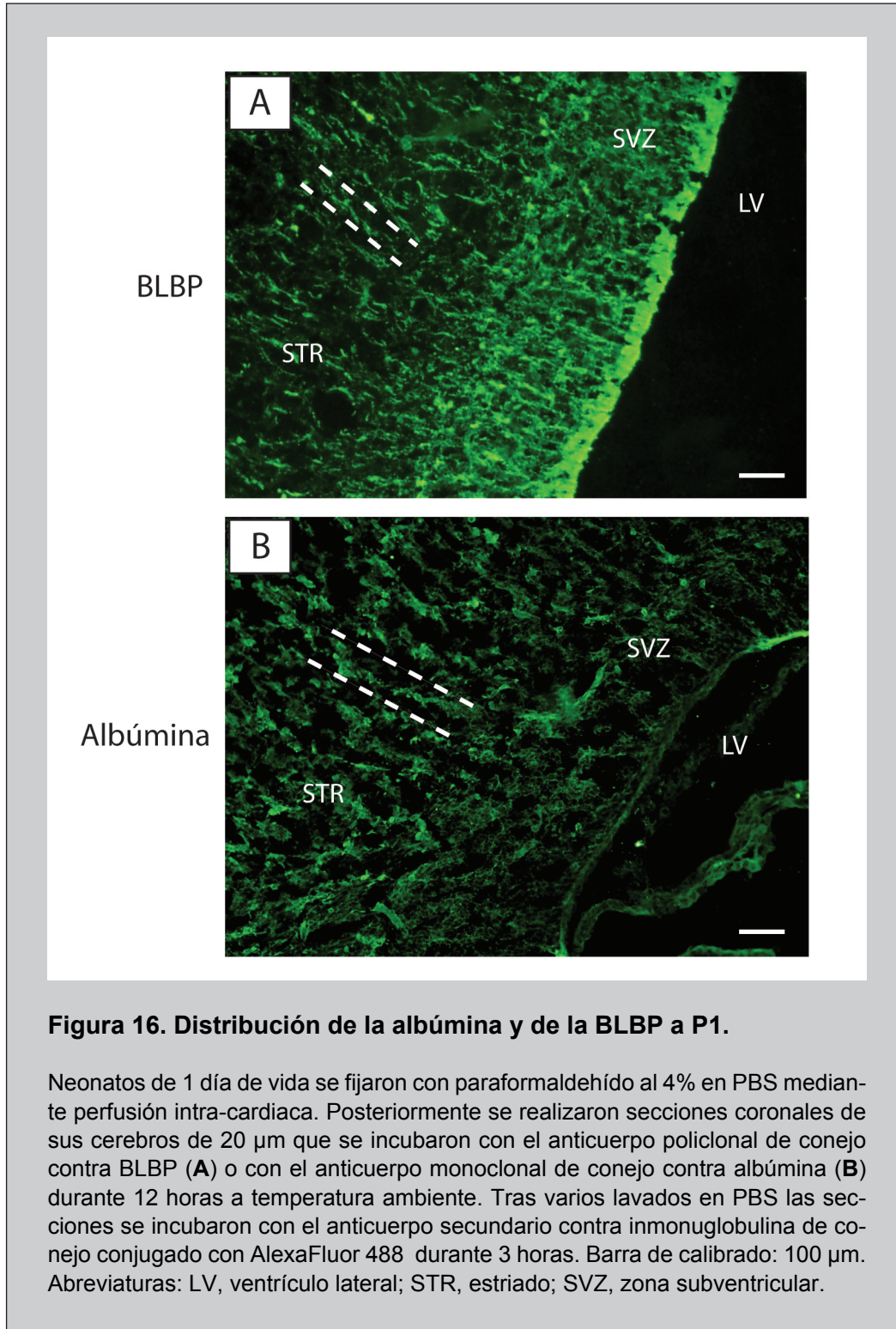


**Figura 14. Co-expresión de BLBP y GFAP en cultivo de astrocitos a 14 DIV.**

Inmunocitoquímica de BLBP (A) y GFAP (B), realizada en células de un cultivo primario de astrocitos cultivadas 14 DIV. Barra de calibrado: 25  $\mu$ m.



Observando con más detalle las imágenes tomadas de inmunofluorescencias de albúmina y de BLBP, podemos comprobar que ambas proteínas dibujan un perfil similar, en el cual, en las proximidades del ventrículo parecen disponerse en hileras perpendiculares al mismo, (ver líneas discontinuas en la [figura 16](#)).





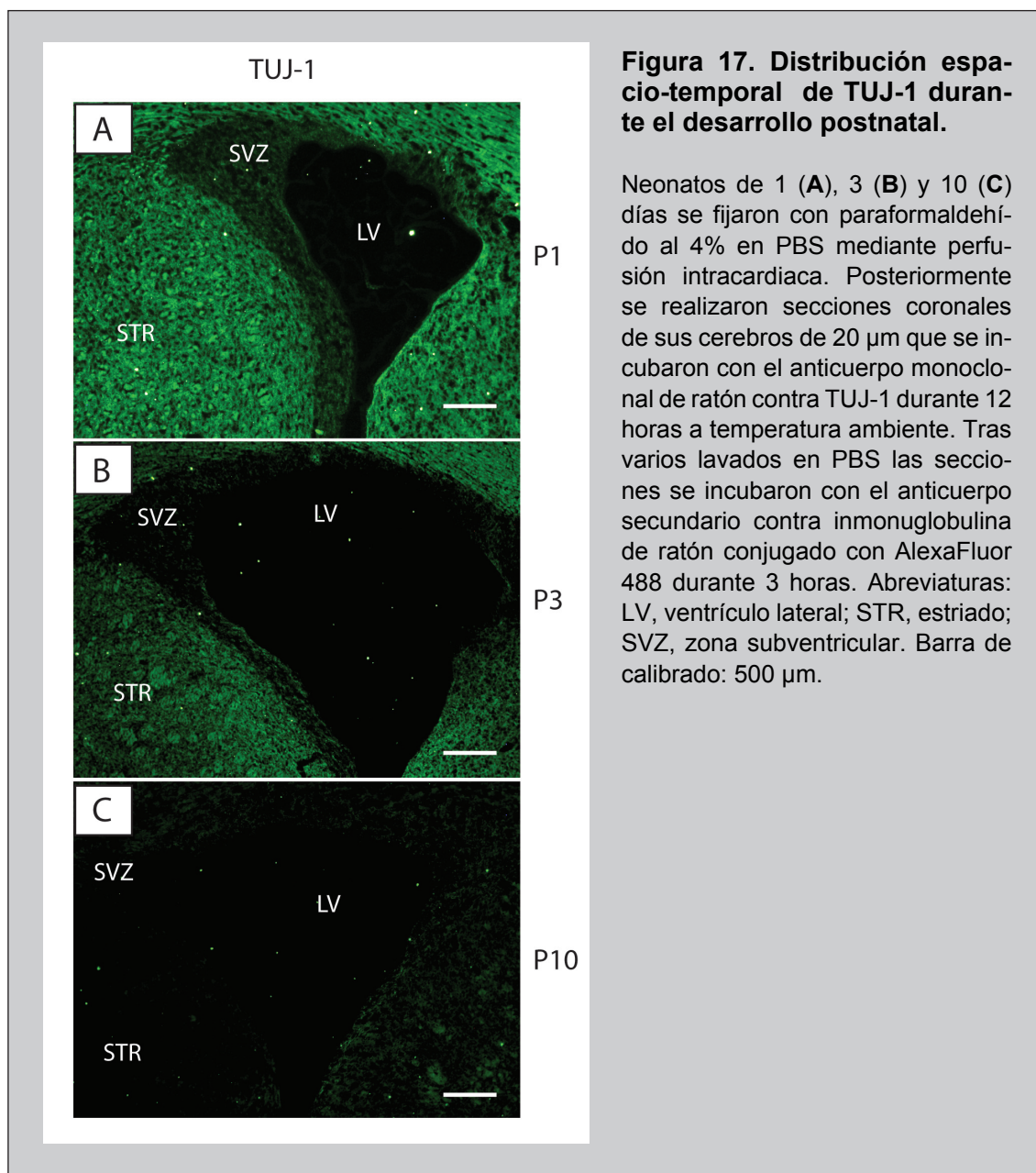
## 4.3 DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE TUJ-1, GAP-43 Y MAP-2 DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

En trabajos previos en nuestro laboratorio, se observó que el ácido oleico sintetizado por los astrocitos, en respuesta a la albúmina, es captado por las neuronas, donde induce el crecimiento axonal y dendrítico (Tabernero y col. 2001). Dado que nosotros hemos mostrado la expresión del mRNA de la enzima sintetizadora del ácido oleico, la SCD-1, en la SVZ en los primeros días de vida postnatal, quisimos estudiar el desarrollo neuronal que acontece en ese momento.

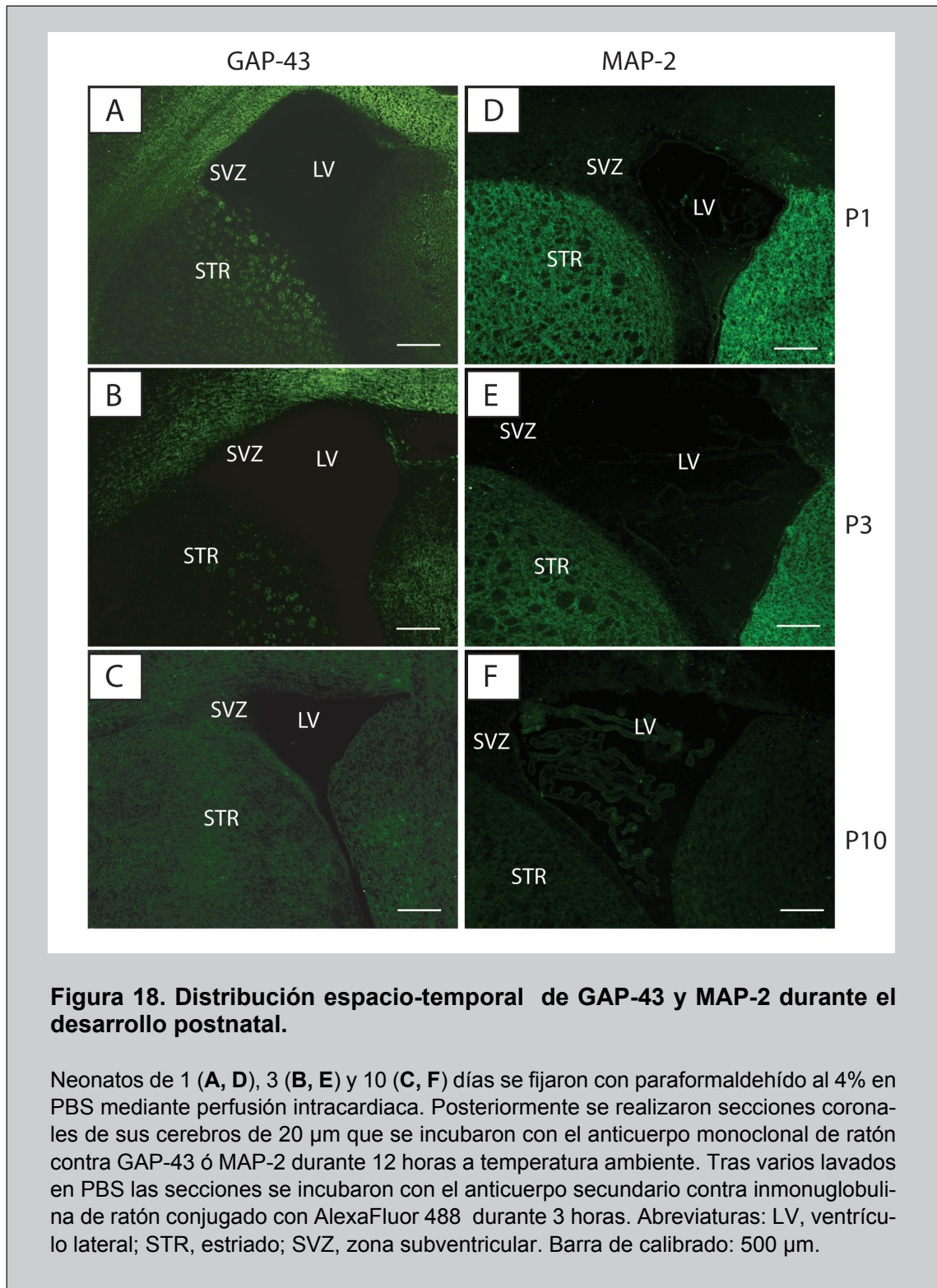
Para ello se realizaron, inmunohistoquímicas en cortes coronales de cerebro a 1, 3 y 10 días de vida postnatal que se fijaron mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4%.

En primer lugar realizamos una tinción contra un marcador específico de neuronas, tal como TUJ-1, que nos permitió la identificación de neuronas inmaduras situadas, durante este periodo, en las proximidades de la SVZ. Como se puede observar en la [figura 17](#), la fluorescencia correspondiente a TUJ-1 está presente tanto en el estriado, en el septum, y en el cuerpo calloso, así como en menor medida en SVZ, tanto a día 1 como a día 3. La fluorescencia aparece más alta el primer día de vida postnatal, disminuyendo al tercer día y siendo prácticamente indetectable en el día 10.

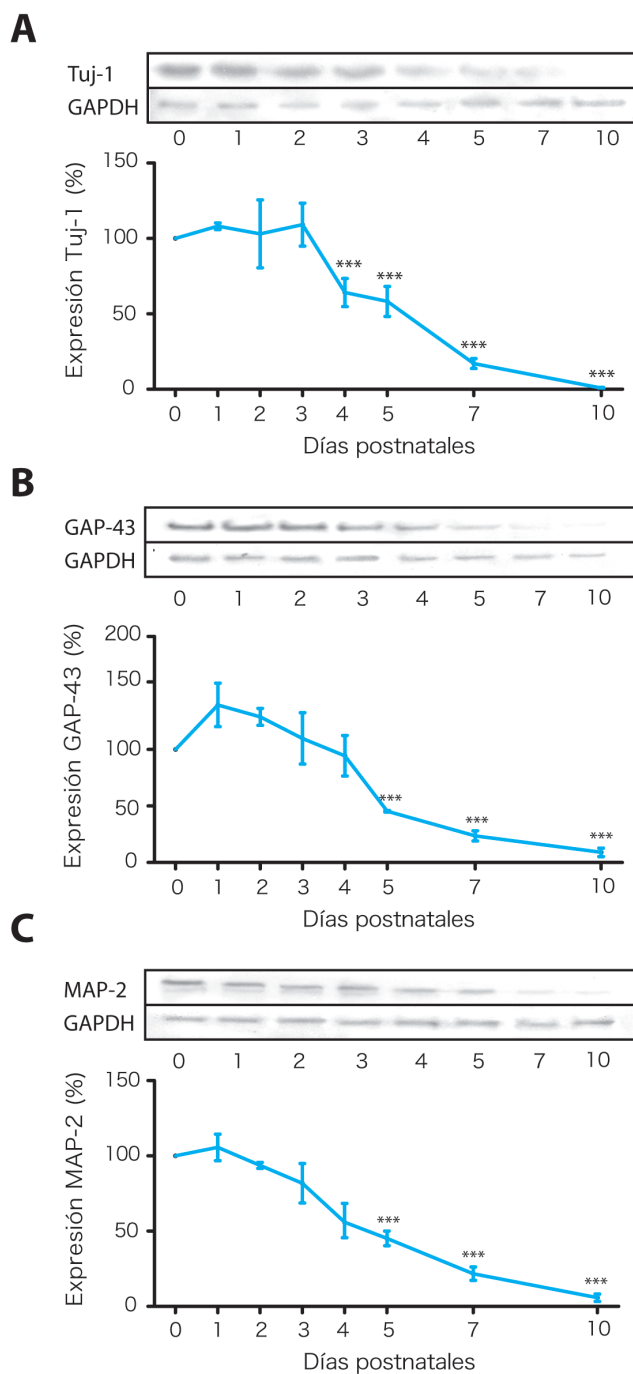
Teniendo en cuenta estos datos quisimos estudiar el patrón que presenta tanto la proteína marcadora de crecimiento dendrítico, MAP-2, como la de crecimiento axonal, GAP-43. De hecho, trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que estas proteínas se inducen en cultivo primario de neuronas por el ácido oleico (Rodríguez-Rodríguez y col. 2004; Tabernero y col. 2001).



La figura 18 muestra como a P1 y P3 los marcajes de MAP-2 y GAP-43 permanecen altos, siguiendo un patrón similar en el área observada, a excepción del cuerpo caloso, donde sólo es perceptible el marcaje por GAP-43. Sin embargo a P10 la fluorescencia correspondiente tanto a MAP-2 como a GAP-43 disminuye drásticamente hasta ser imperceptible.



Así mismo, los Western blot de estas proteínas, TUJ-1, MAP-2, GAP-43, realizados a partir de cerebros recogidos a los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 10 de vida postnatal, mostraron un resultado similar [figura 19](#). Así la expresión de TUJ-1 disminuye significativamente a P4 respecto al momento del nacimiento ([figura 19A](#)), mientras que MAP-2 y GAP-43 lo hacen a partir del día 5 ([figura 19B y C](#)).

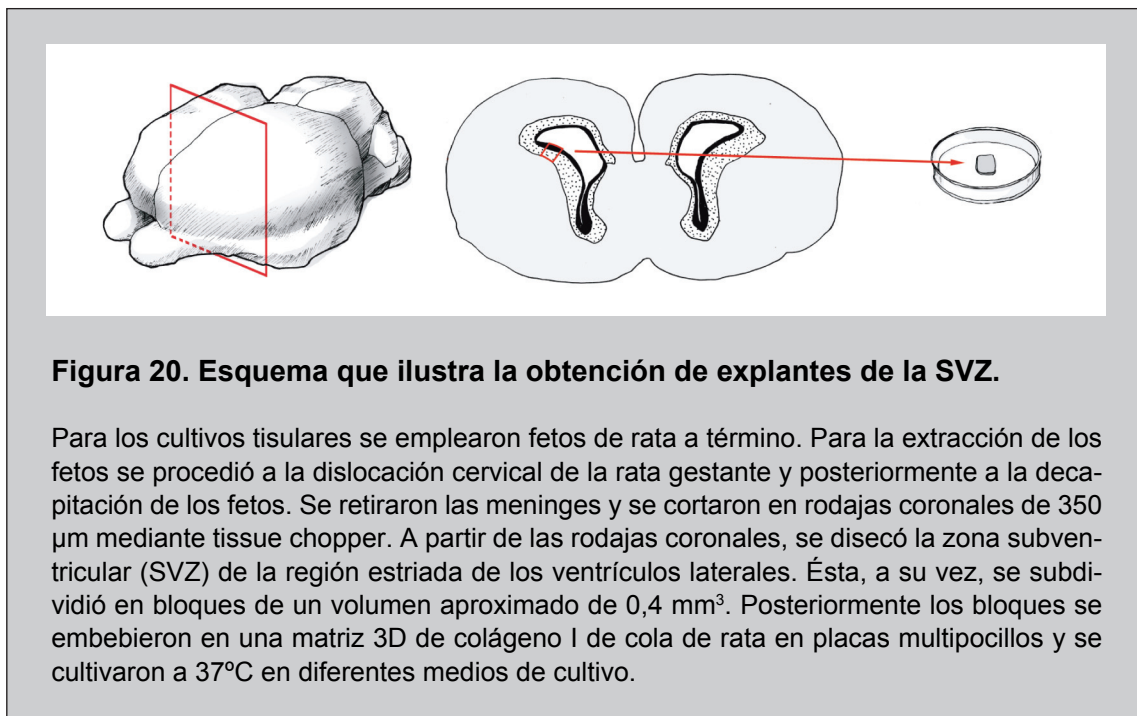


**Figura 19. Expresión de TUJ-1, GAP-43 y MAP-2 en cerebro durante el desarrollo postnatal.**

Los cerebros de rata de distintos días de vida postnatal se recogieron y se lavaron en PBS. A continuación, se extrajeron las proteínas para analizar la presencia de TUJ-1 (A), MAP-2 (B) y GAP-43 (B) mediante análisis de transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Las membranas se escanearon y se cuantificaron las bandas mediante un programa de análisis de imagen. Los valores se normalizaron contra GAPDH, se expresan como porcentaje respecto a la banda más intensa obtenida el día diez de vida postnatal con respecto a cada una de las proteínas y sus valores son medias  $\pm$  SEM, de al menos, tres experimentos independientes. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , cuando se compara con los controles mediante test *t* de Student.

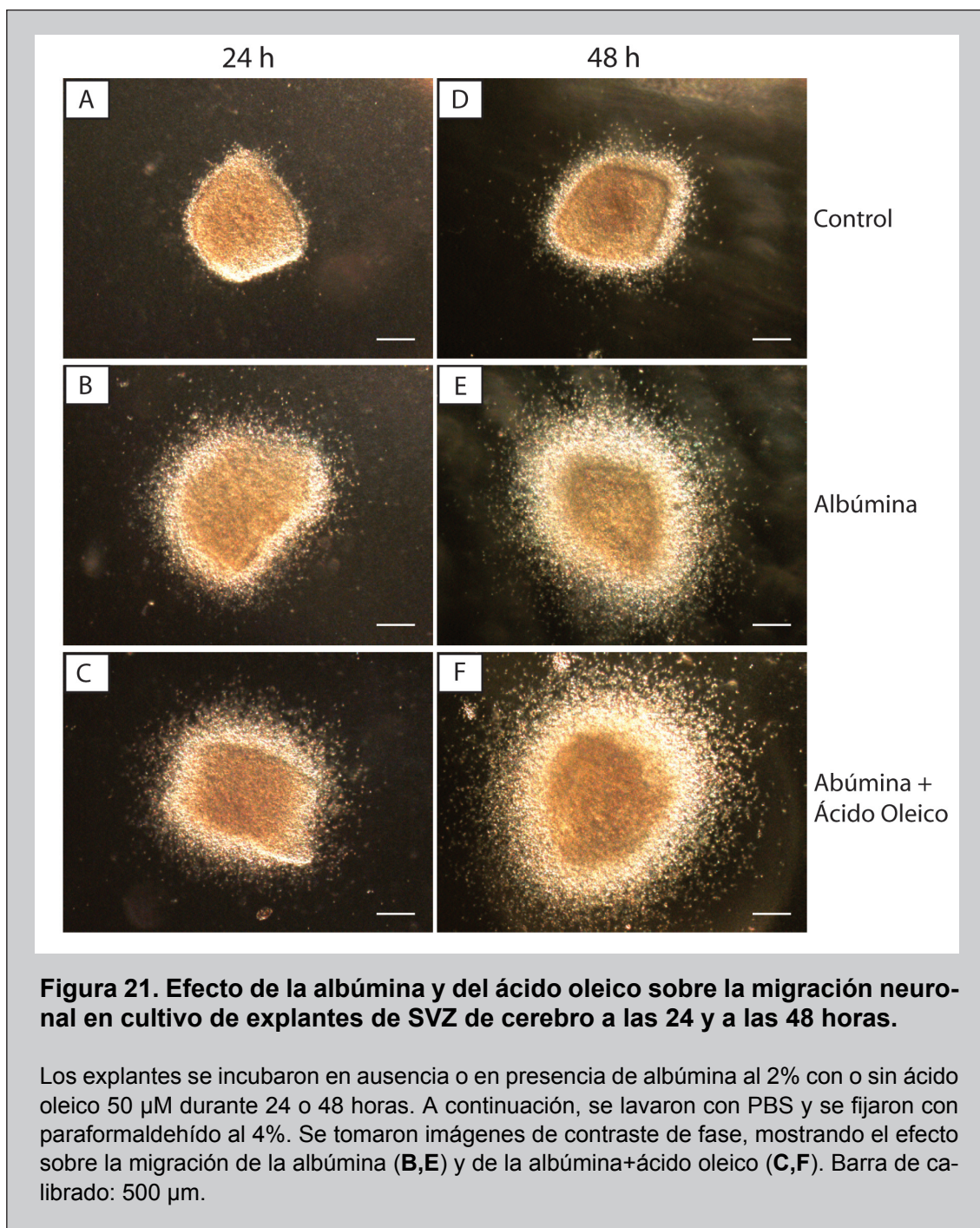
## 4.4 ESTUDIO DEL PAPEL DE LA SCD-1 EN LAS CÉLULAS DE LA SVZ

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, en los que se muestra que la SCD-1 y la albúmina se encuentran presentes en la SVZ durante el desarrollo postnatal temprano y los trabajos descritos en nuestro laboratorio, en los que la inducción de SCD-1 por la albúmina conlleva a la síntesis de ácido oleico y éste actúa como factor neurotrófico en el cultivo primario de neuronas, quisimos estudiar qué efecto podía ejercer la albúmina en las células de la SVZ. Para ello empleamos explantes de la SVZ que obtuvimos como se ilustra en la [figura 20](#).



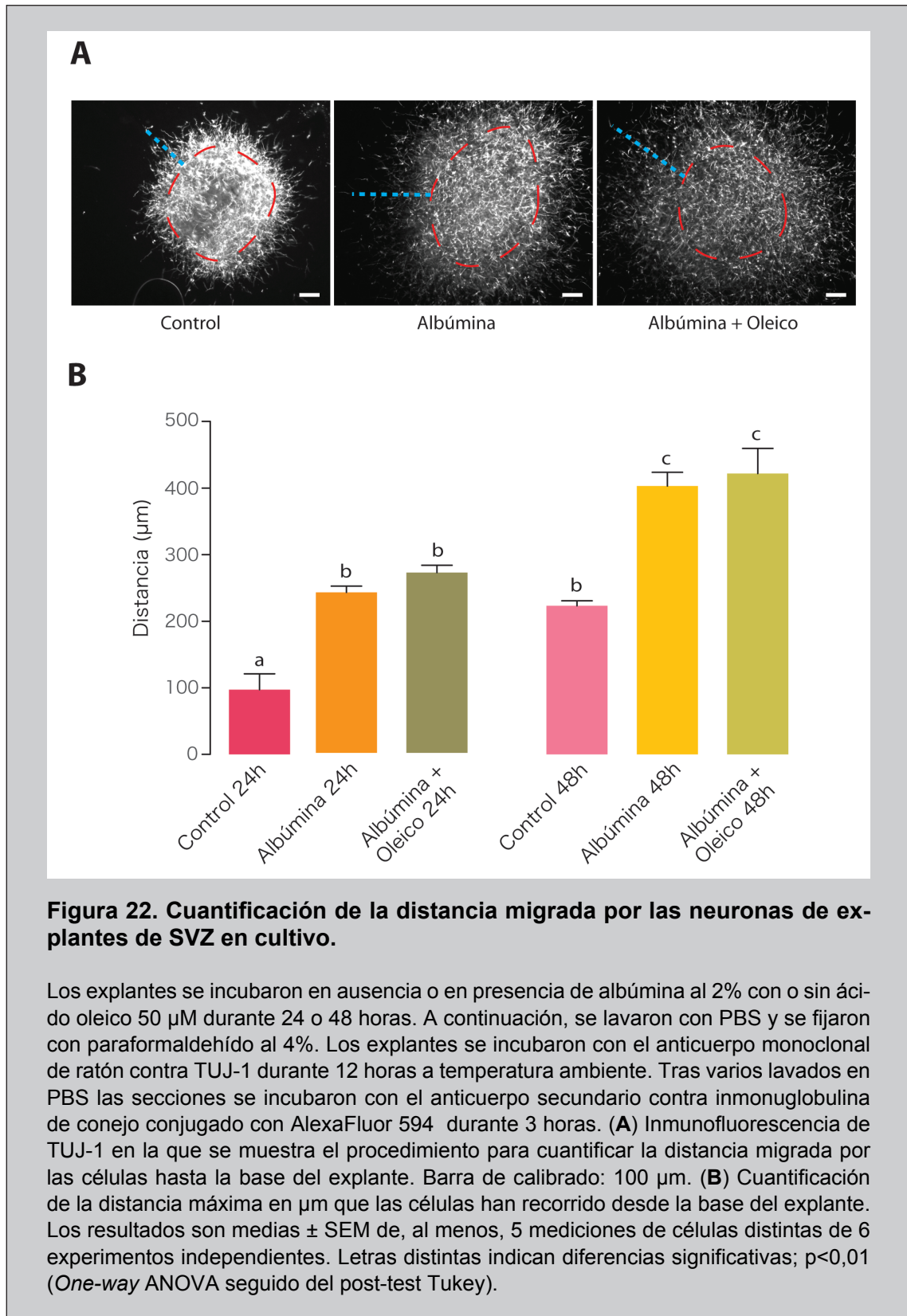
### 4.4.1 Efecto de la albúmina en las células de la SVZ

Los explantes de la SVZ, obtenidos de fetos a término, se cultivaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu\text{M}$ , a 37°C. Transcurridas 24 y 48 horas de cultivo tomamos fotografías de los explantes. La [figura 21](#) muestra las células que abandonan el explante a las 24 horas ([figura 21A-C](#)) y a las 48 horas ([figura 21D-F](#)). Se observa que los halos producidos por las células que han abandonado el explante en las condiciones albúmina y albúmina + ácido oleico son mayores que los observados en la situación control, tanto a las 24 horas como a las 48 horas.



Para cuantificar las diferencias que existen entre las tres condiciones, medimos la distancia máxima a la que habían migrado las células en la situación control, en presencia de albúmina y de albúmina + ácido oleico (figura 22A). Los resultados de la cuantificación (figura 22B) indican que, en presencia de albúmina durante 24 horas, las células migran un 150% más que en el control. Durante el mismo periodo de tiempo, la distancia a la que han migrado las células en presencia de albúmina + ácido oleico es levemente superior pero no estadísticamente diferente de la observada con la albúmina sola. Sin embargo, a las 48 horas, las diferencias observadas

entre la distancia total recorrida por las células, tanto en presencia de albúmina como de albúmina + ácido oleico, con respecto a la situación control fueron alrededor de un 90% mayor y, por consiguiente, menores que las observadas a las 24 horas (figura 22B).



#### 4.4.2 Silenciamiento de la SCD-1 en las células de la SVZ

Con objeto de saber si el efecto de la albúmina en el proceso de migración estaba mediado por el ácido oleico que puedan estar sintetizando silenciamos la enzima reguladora de su síntesis, SCD-1. Para ello empleamos la técnica de siRNA mediante la transfección con Lipofectamina.

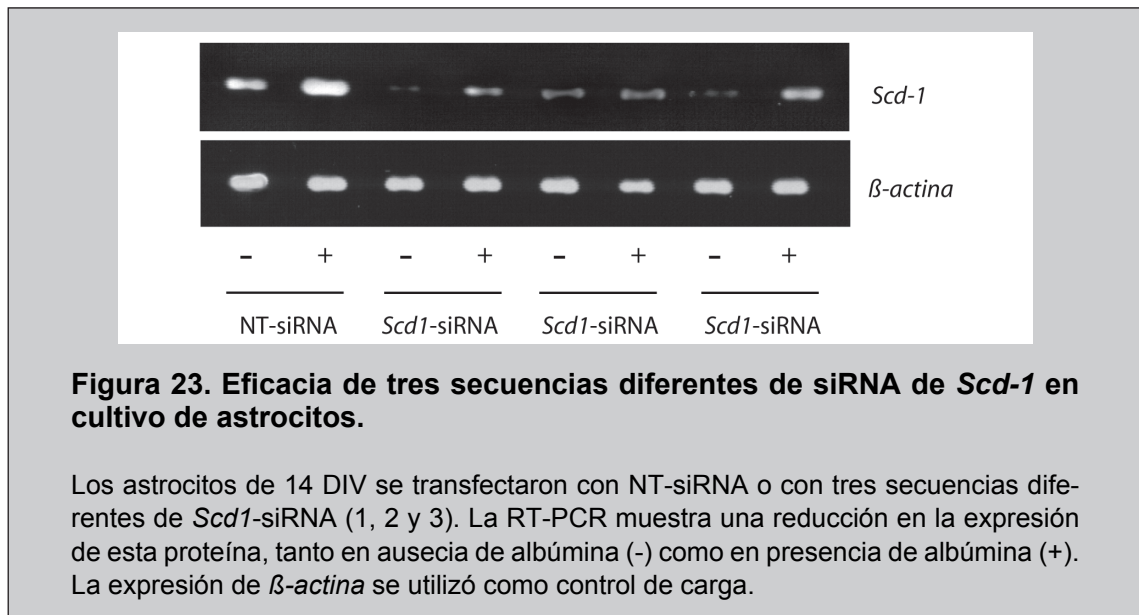
##### 4.4.2.1 Optimización de las condiciones de transfección de siRNA en los cultivos de explantes de la SVZ

En primer lugar, seleccionamos la secuencia de siRNA de *Scd-1* más efectiva para el silenciamiento. Para ello, empleamos astrocitos en cultivo primario, ya que es un modelo en el que tenemos estandarizado el silenciamiento proteico mediante RNA de interferencia en el laboratorio, y, posteriormente, optimizamos las condiciones de transfección de siRNA en los cultivos de explantes de SVZ.

Así, los astrocitos se transfectaron con una concentración 50 nM de siRNA (*Scd1*-siRNA) de cada una las tres secuencias y como agente de transfección se empleó Lipofectamina 2000 (2  $\mu$ L/mL de medio de cultivo). Como control se utilizó siRNA sin gen diana (NT-siRNA). Los niveles de mRNA de la SCD-1 se analizaron por RT-PCR. Los resultados muestran una fuerte reducción en los niveles de mRNA de la SCD-1 cuando se transfectó con las secuencias 1 y 3, y de menor grado con la secuencia 2 en ausencia de albúmina (figura 23). Por consiguiente la secuencia empleada para los experimentos de silenciamiento de la SCD-1 fue la secuencia 1.

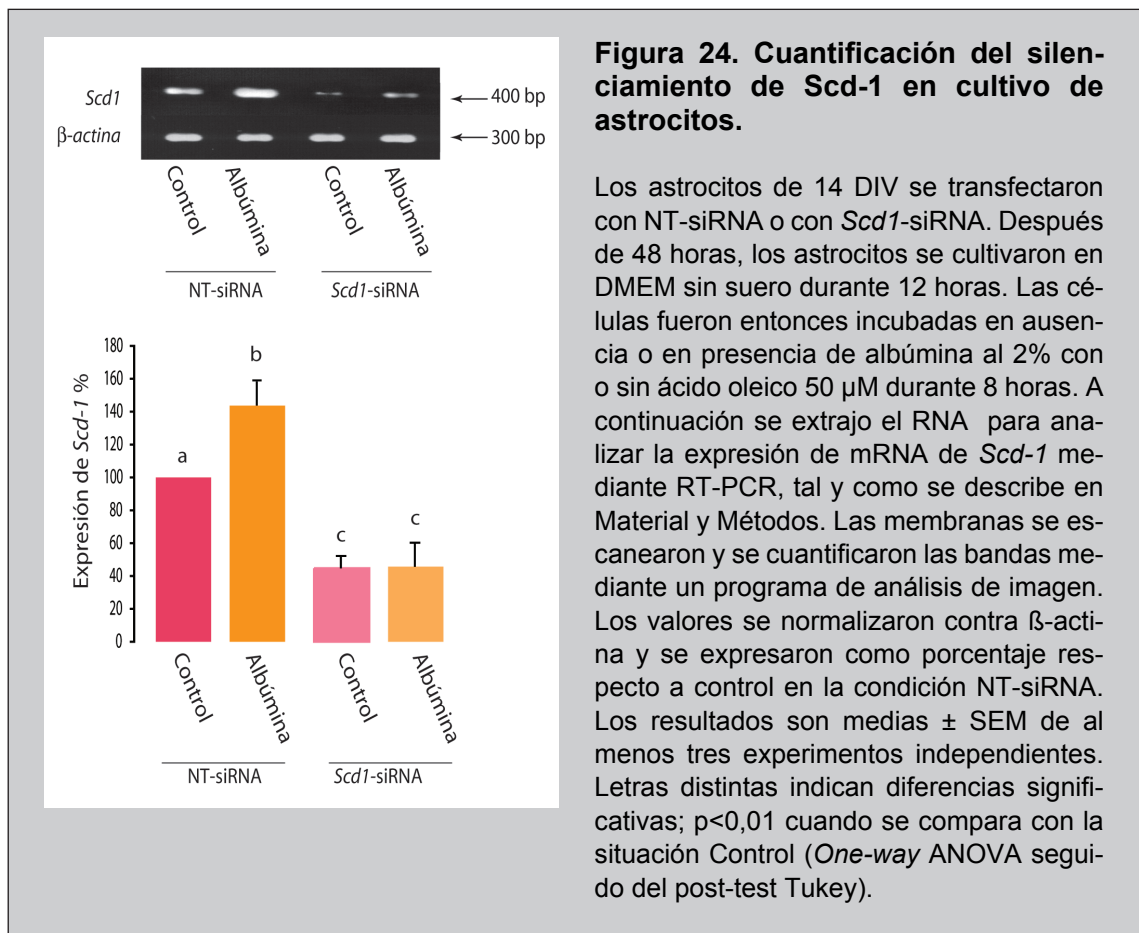
El índice de silenciamiento de la enzima fue aproximadamente del 58% respecto a la situación control (figura 24). Además, es importante resaltar que la presencia de albúmina en el cultivo primario de astrocitos produce un incremento en los niveles del mRNA de la SCD-1 en la situación en la que la enzima no se encuentra silenciada. Por tanto, si comparamos los niveles de mRNA de la SCD-1 de los astrocitos sin silenciar con los astrocitos silenciados, en presencia de albúmina, podemos observar que se produce una reducción de 4 veces en el mRNA de la SCD-1 cuando la enzima está silenciada (figura 24).





**Figura 23. Eficacia de tres secuencias diferentes de siRNA de *Scd-1* en cultivo de astrocitos.**

Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con tres secuencias diferentes de *Scd1*-siRNA (1, 2 y 3). La RT-PCR muestra una reducción en la expresión de esta proteína, tanto en ausencia de albúmina (-) como en presencia de albúmina (+). La expresión de *β-actina* se utilizó como control de carga.

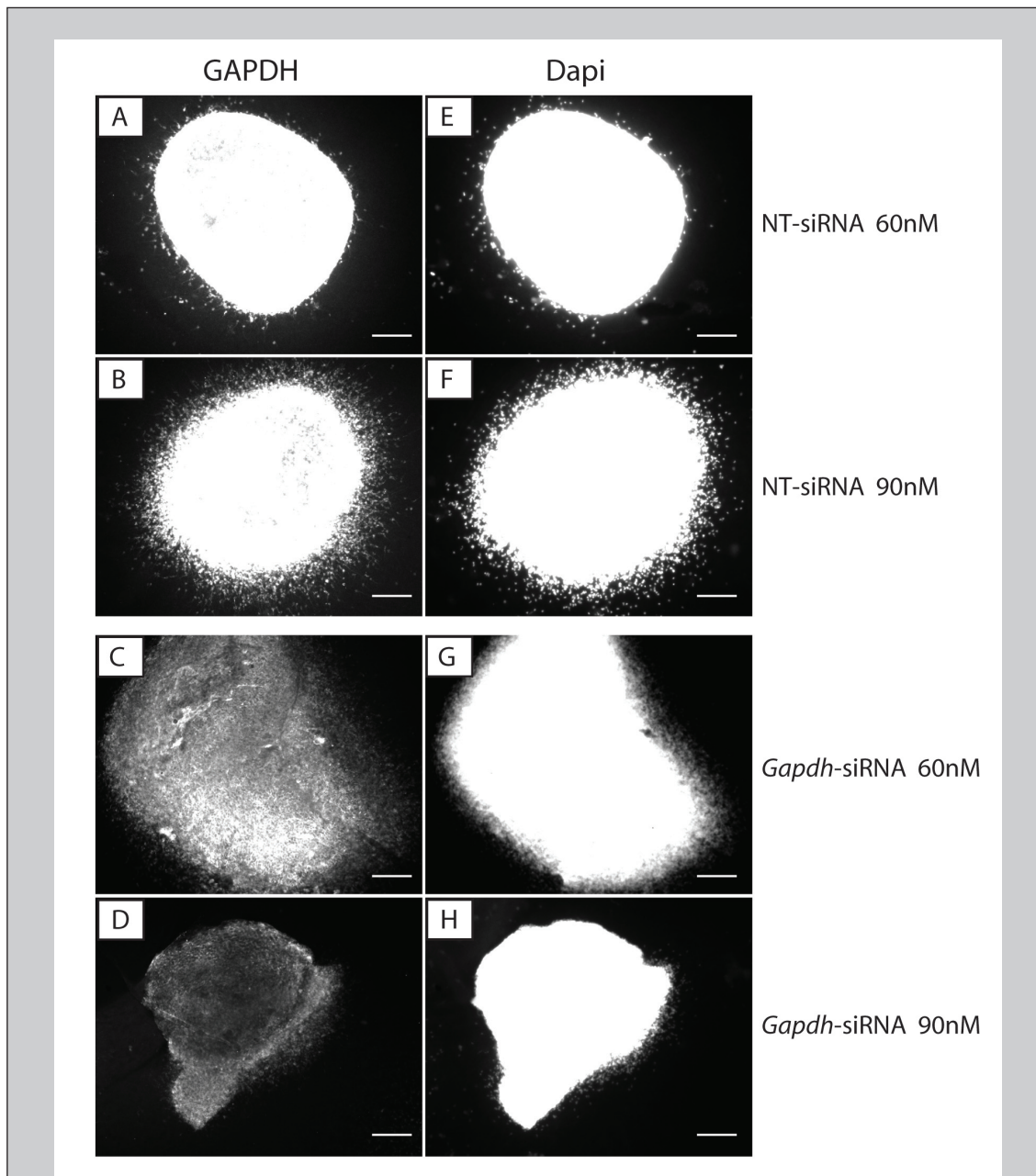


**Figura 24. Cuantificación del silenciamiento de *Scd-1* en cultivo de astrocitos.**

Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con *Scd1*-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron entonces incubadas en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M durante 8 horas. A continuación se extrajo el RNA para analizar la expresión de mRNA de *Scd-1* mediante RT-PCR, tal y como se describe en Material y Métodos. Las membranas se escanearon y se cuantificaron las bandas mediante un programa de análisis de imagen. Los valores se normalizaron contra *β-actina* y se expresaron como porcentaje respecto a control en la condición NT-siRNA. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas;  $p < 0,01$  cuando se compara con la situación Control (*One-way ANOVA* seguido del post-test Tukey).

Como el silenciamiento en explantes no es una técnica muy empleada, decidimos ponerla a punto en nuestro laboratorio empezando por las concentraciones del siRNA necesarias para obtener el mayor descenso en la expresión de nuestra proteína de interés. Para ello, en primer lugar, empleamos un siRNA validado para *Gapdh* a 60 nM y 90 nM y como agente de transfección utilizamos Lipofectamina 2000

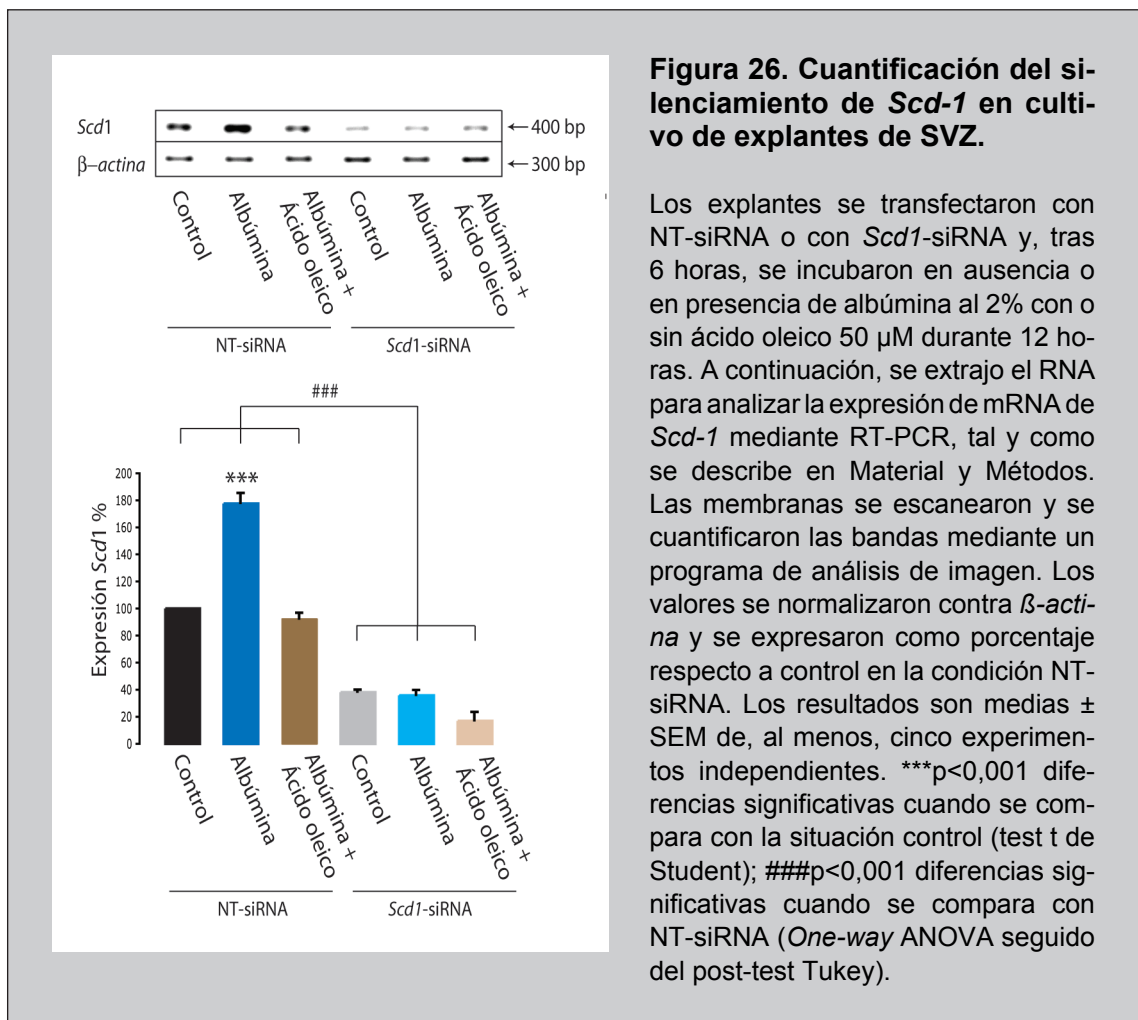
a una concentración de 3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Los resultados muestran (figura 25) una fuerte reducción en la expresión de la GAPDH cuando se transfectó con 90 nM de siRNA (comparar 25D con 25B).



**Figura 25. Silenciamiento de la GAPDH en cultivo de explantes de SVZ.**

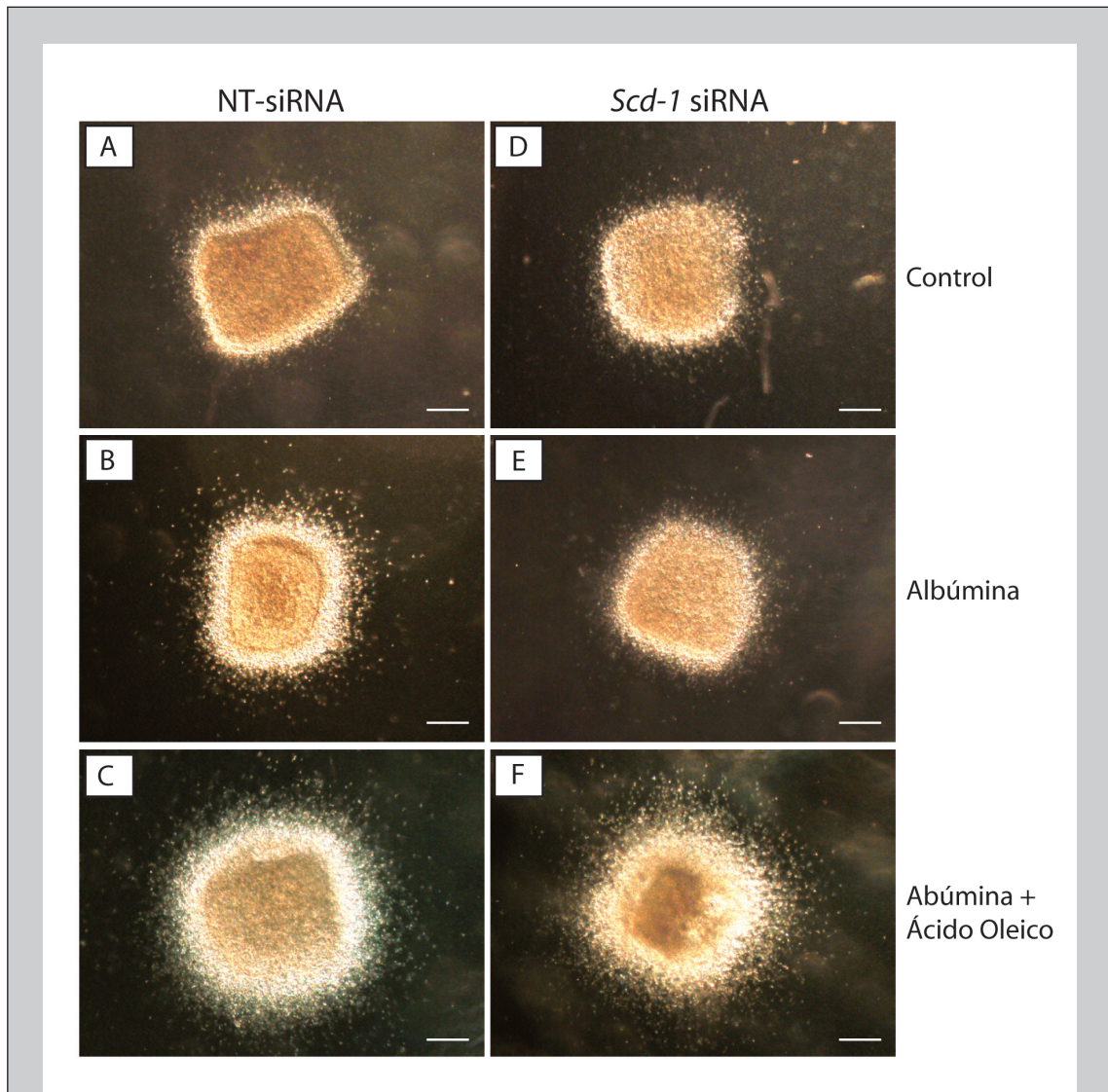
Los explantes se transfectaron con NT-siRNA (A,B) o con *Gapdh*-siRNA (C,D), a una concentración de 60 o 90 nM, y se incubaron durante 72 horas. A continuación, se lavaron con PBS y se fijaron y se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH durante 12 horas. Tras varios lavados en PBS los explantes se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón conjugado con AlexaFluor 488 durante 3 horas. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran una reducción en la expresión de GAPDH, siendo superior esta reducción a una concentración de 90 nM de siRNA. El DNA se tiñó con DAPI (E-H). Barra de calibrado: 500  $\mu\text{m}$ .

Una vez determinada la concentración de siRNA más efectiva, comprobamos cuál era el índice de silenciamiento del siRNA contra *Scd-1* en explantes. Para ello se empleó como control la secuencia NT-siRNA. Para determinar el silenciamiento de la SCD-1 se realizó una RT-PCR a las 12 horas. La figura 26 muestra una reducción cercana al 60% de los niveles de mRNA de la SCD-1 en la situación control tras el silenciamiento. También se observa que la presencia de albúmina en el cultivo transfectado con la secuencia NT-siRNA aumenta el nivel de mRNA de la SCD-1 aproximadamente un 80%, de manera similar a lo que sucede en astrocitos. Sin embargo la presencia de albúmina + ácido oleico no modifica tal expresión. Así mismo, en los cultivos silenciados ni la albúmina ni la albúmina + ácido oleico modifica los niveles de mRNA de la SCD-1.



#### 4.4.2.2 Efecto del silenciamiento de la SCD-1 en las células de la SVZ

Una vez puesto a punto el silenciamiento de la SCD-1 en explantes de SVZ, estudiamos el efecto de la albúmina y de la albúmina + ácido oleico en ausencia de SCD-1 sobre la migración celular. Para lo cual, los explantes se preincubaron durante 6 horas en el medio de transfección con el siRNA contra *Scd-1* o con NT-siRNA. Posteriormente se sembraron y se incubaron, en nuevo medio de transfección, en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M. Transcurridas 24 horas de cultivo tomamos fotografías. De esta forma se observa (figura 27) como el halo de migración de las células de los explantes transfectados con siRNA contra *Scd-1* en presencia de albúmina (figura 27E) es menor que el del explante control transfectado con NT-siRNA e incubado con albúmina (figura 27B). Sin embargo no hay diferencias significativas en la situación control (figura 27A, D) o en albúmina + ácido oleico (figura 27C, F).

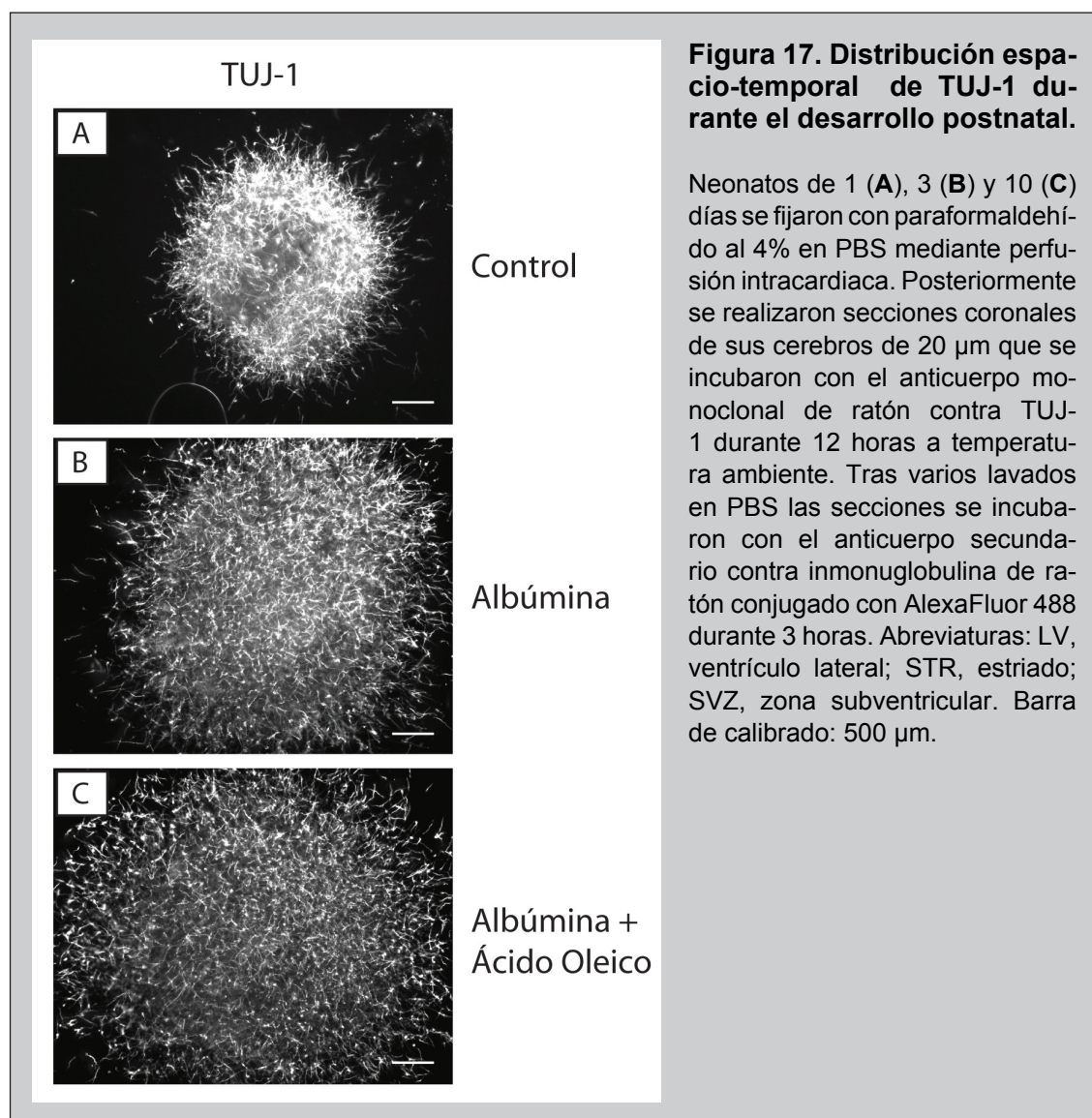


**Figura 27. El silenciamiento de la SCD-1 disminuye el efecto de la albúmina sobre la migración neuronal en cultivo de explantes de SVZ de cerebro a las 24 horas.**

Los explantes se transfectaron con NT-siRNA (A, B, C) o con *Scd1*-siRNA (D, E, F) y, tras 6 horas, se incubaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M durante 24 horas. A continuación, se tomaron imágenes de contraste de fase, mostrando el efecto de la albúmina sobre la migración (B), este efecto se ve disminuido cuando se silencia la enzima limitante de la síntesis de ácido oleico (E). Barra de calibrado: 500  $\mu$ m.

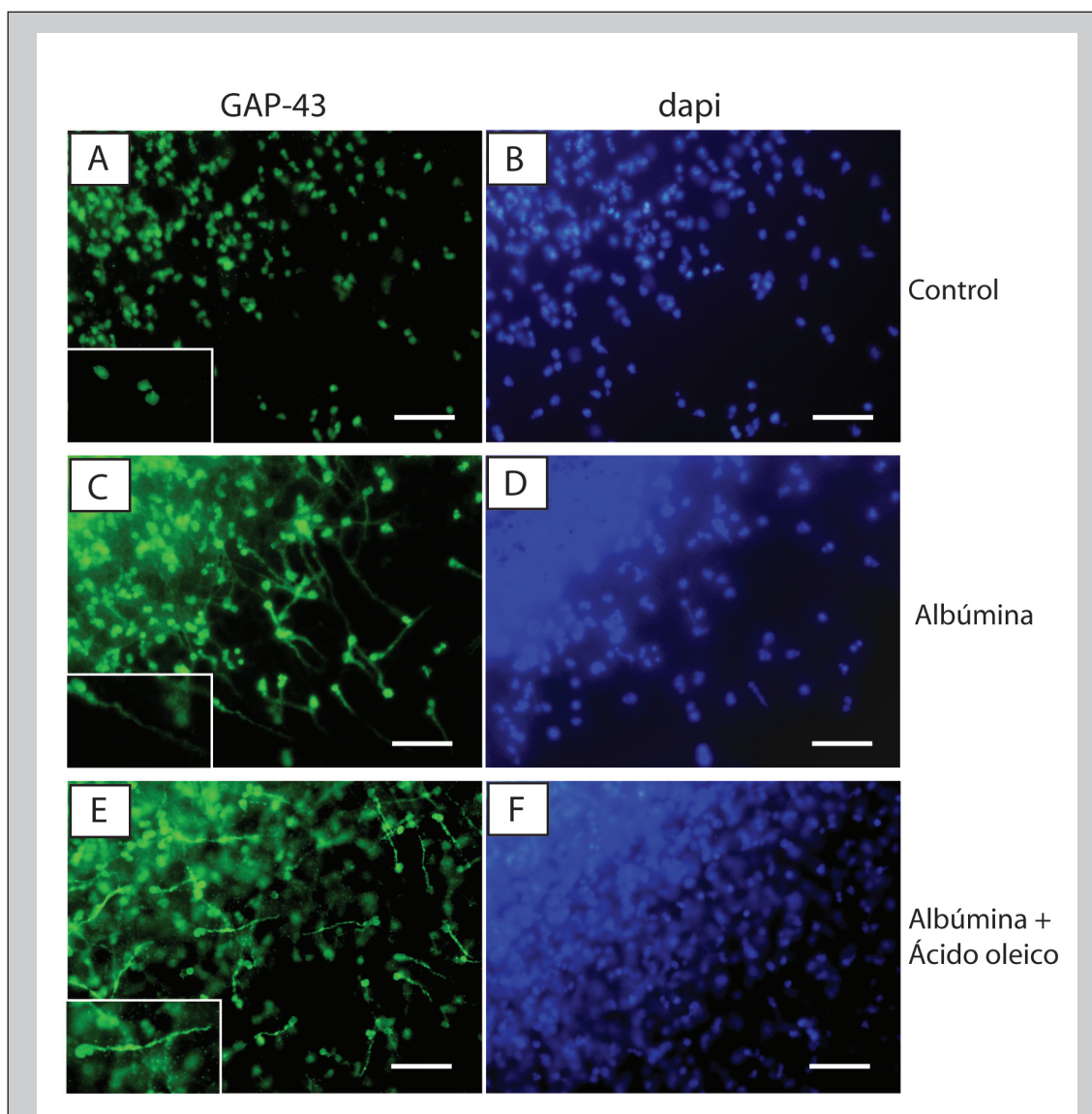
### 4.4.3 Estudio de las características de las células que migran en los explantes de SVZ en presencia de albúmina

Ante el efecto que ejerce la albúmina sobre las células de la SVZ mediante la inducción de la SCD-1 y, por tanto, de la síntesis de ácido oleico, quisimos investigar qué tipo de células eran las que salían del explante. Para ello, los explantes de la SVZ, obtenidos de fetos a término, se cultivaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M, a 37°C. Transcurridas 72 horas, los explantes se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó una inmunofluorescencia contra TUJ-1. De esta manera pudimos observar como prácticamente la totalidad de las células que salían del explante eran TUJ-1 positivas y, por tanto, neuronas (figura 28).



#### 4.4.3.1 Efecto de la albúmina sobre la expresión de GAP-43 en las neuronas que migran en los explantes de SVZ en presencia de albúmina

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se observó que el ácido oleico se comportaba como factor neurotrófico en el cultivo primario de neuronas. En estos cultivos se podía observar un aumento en la expresión de la proteína marcadora de crecimiento axonal GAP-43 (Tabernero y col. 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos investigar el efecto que ejercía la albúmina sobre la expresión de GAP-43 en los explantes de SVZ. Para ello, empleamos explantes de la SVZ que se cultivaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu\text{M}$ , a 37°C. Transcurridas 72 horas, los explantes se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó una inmunofluorescencia contra GAP-43. Los resultados muestran que la presencia de albúmina (figura 29C) induce la expresión de GAP-43 en el *leading process* (proceso de avance) de las neuronas que están saliendo del explante, al contrario de lo que ocurre en la situación control (figura 29A), en la que la expresión de GAP-43 se encuentra confinada únicamente en el soma celular. El complejo albúmina + ácido oleico (figura 29E) produce un efecto similar al resultado con la sola presencia de la albúmina.



**Figura 29. Expresión de GAP-43 en axones en cultivo de explantes de SVZ de cerebro.**

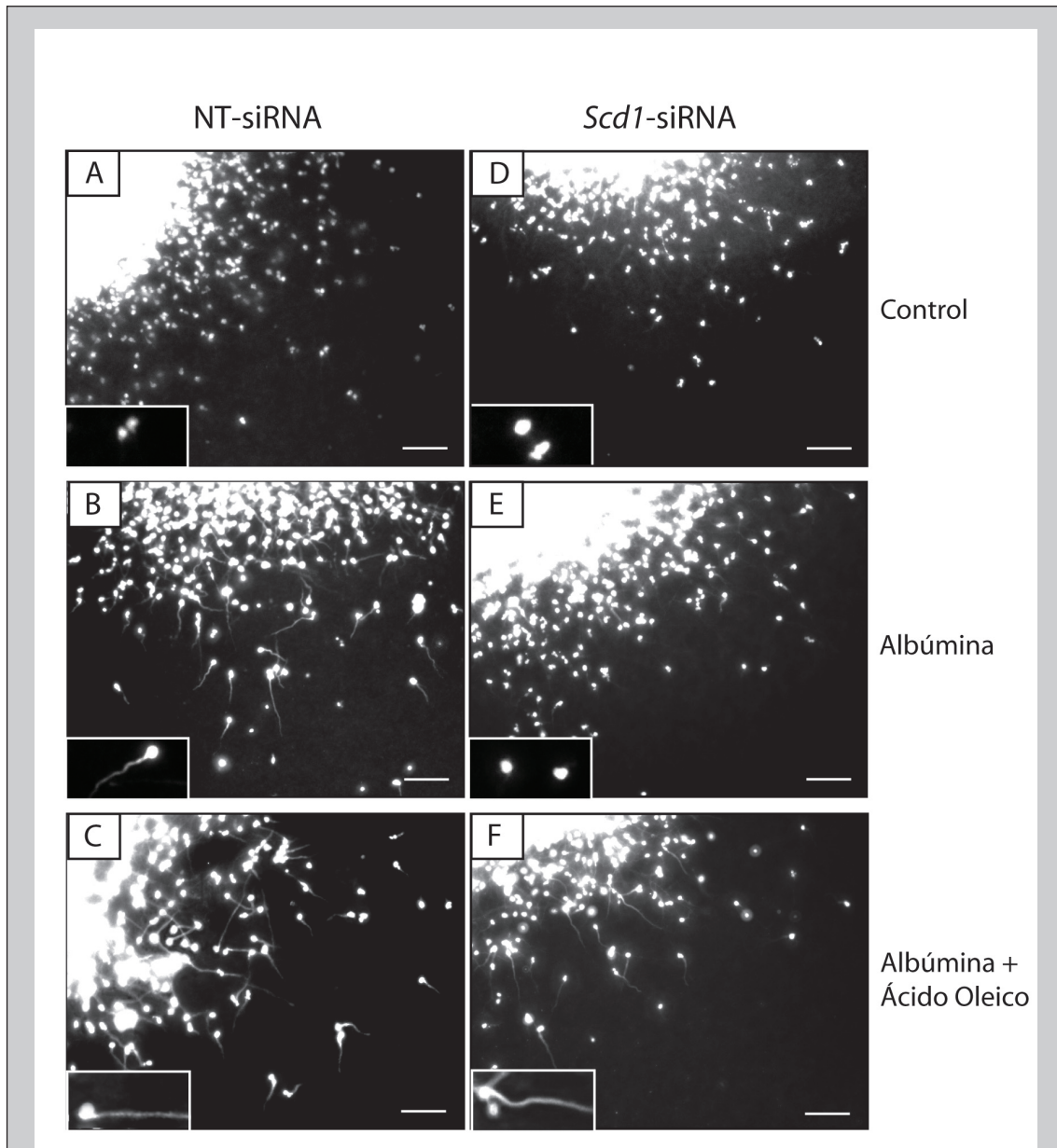
Los explantes se incubaron en ausencia (A,B) o en presencia (C,D) de albúmina al 2% con (E,F) o sin ácido oleico 50  $\mu$ M durante 72 horas. A continuación, se lavaron los explantes con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo monoclonal de conejo contra GAP-43 durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS los explantes se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmonoglobulina de conejo conjugado con AlexaFluor 488 durante 3 horas. El DNA nuclear se tiñó con DAPI (C, D, E). Barra de calibrado: 100  $\mu$ m.



#### 4.4.3.2 Efecto del silenciamiento de la SCD-1 en la expresión de GAP-43 en las neuronas que migran en los explantes de SVZ en presencia de albúmina

Con objeto de averiguar si el efecto de la albúmina sobre la expresión de GAP-43 en las neuronas que migran de la SVZ está mediado por el ácido oleico silenciamos la expresión de la enzima limitante de su síntesis, la SCD-1.

Para lo cual, los explantes se preincubaron durante 6 horas en el medio de transfección con el siRNA. Posteriormente se sembraron y se incubaron, en nuevo medio de transfección, en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M. A las 72 horas se fijaron con paraformaldehído al 4% y, seguidamente, se realizó una inmunocitoquímica contra GAP-43. Los resultados (figura 30) indican que el número de neuronas con *leading process* GAP-43 positivo disminuyen en los explantes incubados con albúmina con la SCD-1 silenciada con respecto a los explantes transfectados con NT-siRNA en la misma condición (comparar figuras 30B y 30E). Sin embargo, el efecto de la albúmina + ácido oleico no se ve modificado por este silenciamiento (figuras 30C y 30F).



**Figura 30. El silenciamiento de la SCD-1 inhibe el efecto de la albúmina sobre la expresión de GAP-43 en explantes de SVZ de cerebro.**

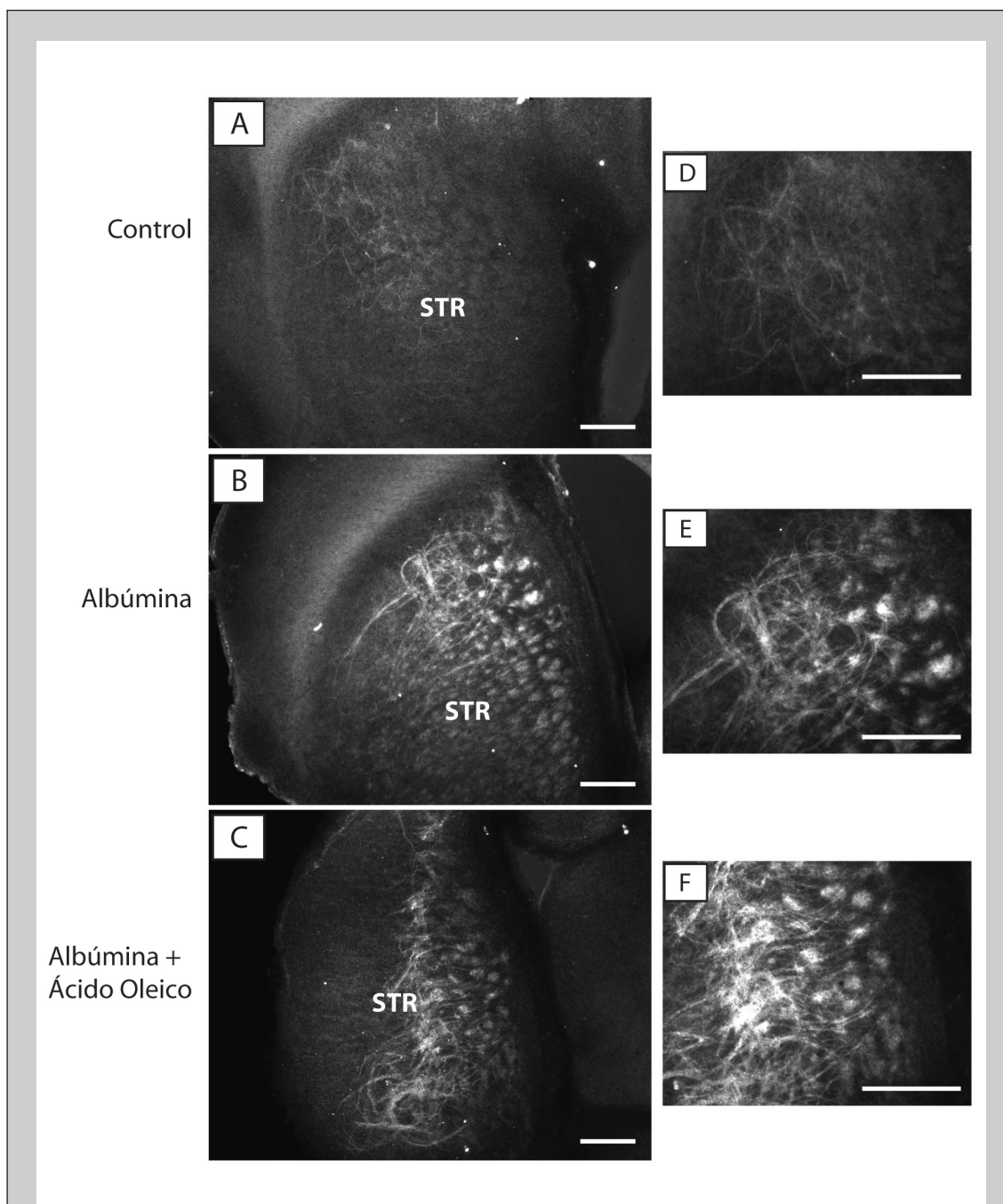
Los explantes se transfectaron con NT-siRNA (A-C) o con Scd1-siRNA (D-F) y, tras 6 horas, se incubaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M durante 72 horas. A continuación, se lavaron las rodajas con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo monoclonal de conejo contra GAP-43 durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS los explantes se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de conejo conjugado con AlexaFluor 488 durante 3 horas. Barra de calibrado: 100  $\mu$ m.

## 4.5 EFECTO DE LA ALBÚMINA EN LA EXPRESIÓN DE GAP-43 EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RODAJAS DE CEREBRO

Nuestros trabajos previos muestran que el ácido oleico sintetizado en respuesta a la albúmina inducía la expresión de GAP-43 en neuronas en cultivo primario. Dado que en el cerebro postnatal la expresión de GAP-43 está elevada tras el nacimiento (Dani, 1991), quisimos saber si esta expresión está relacionada con la albúmina y el ácido oleico.

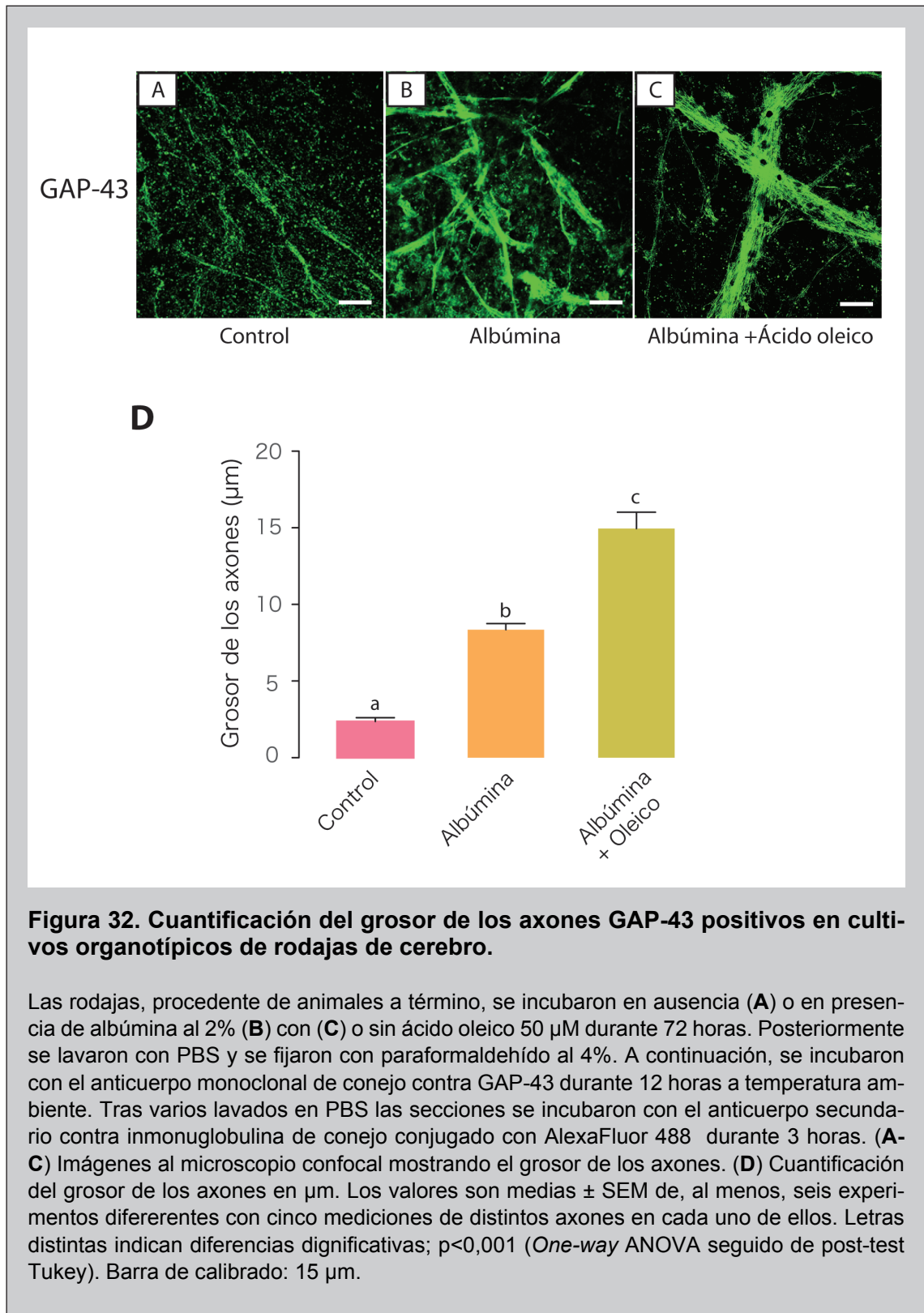
Para ello, realizamos cultivos de rodajas coronales de cerebro en el que la SVZ estuviera presente y, por tanto, la SCD-1. Así, se emplearon rodajas coronales de embriones a término de 350  $\mu\text{m}$ , que se cultivaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2%, acompañada o sin acompañar con ácido oleico 50  $\mu\text{M}$  durante 72 horas a 37°C. A continuación, se analizó la expresión de GAP-43. Nuestros resultados muestran que la albúmina induce la expresión de GAP-43 en el estriado (figura 31B), si se compara con las rodajas cultivadas en ausencia de albúmina (figura 31A) en donde la expresión de la GAP-43 es muy reducida. Asimismo, la presencia del complejo albúmina-ácido oleico (figura 31C) produce un efecto similar a la albúmina, provocando una fuerte expresión de GAP-43 en el estriado. Los insertos 31D-F muestran imágenes ampliadas de este efecto.

A continuación, analizamos el grosor de los fascículos de axones después del tratamiento. Para ello se tomaron fotos de mayor aumento para poder cuantificar mejor el grosor. Los resultados indican que el grosor de los fascículos de axones de las rodajas tratadas con albúmina (figura 32B, D) son aproximadamente de 8  $\mu\text{m}$  y estadísticamente más gruesos que los observados en la situación control (figura 32A, D). Asimismo, los fascículos de axones de las rodajas incubadas con albúmina + ácido oleico (figura 32C y D) son de un grosor aún mayor, de aproximadamente 14  $\mu\text{m}$ .

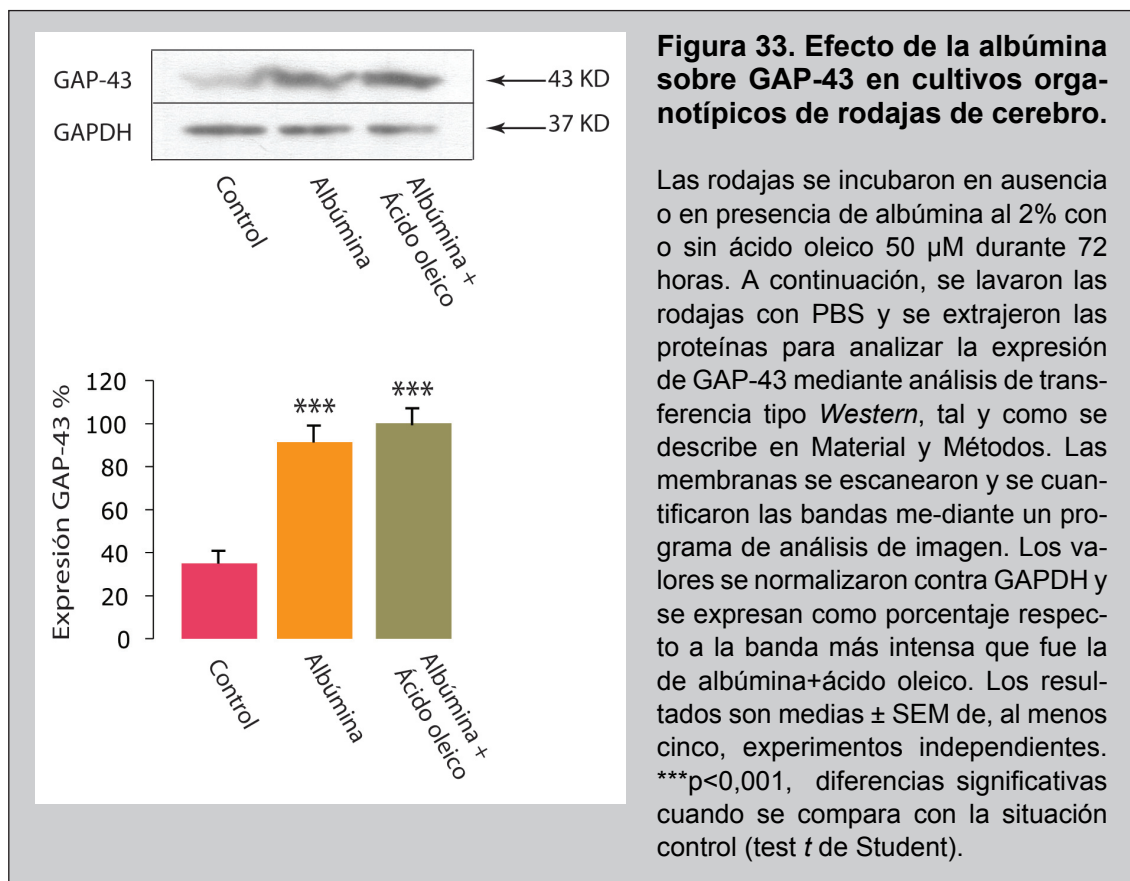


**Figura 31. Expresión de GAP-43 en cultivos organotípicos de rodajas de cerebro.**

Las rodajas coronales procedentes de fetos a término se cultivaron en ausencia (A, D) o en presencia de albúmina (B, E) al 2% con (C, F) o sin ácido oleico 50  $\mu$ M durante 72 horas. Posteriormente se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%. A continuación, se incubaron con el anticuerpo monoclonal de conejo contra GAP-43 durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmonoglobulina de conejo conjugado con AlexaFluor 488 durante 3 horas. Abreviaturas: STR, estriado. Barra de calibrado: 500  $\mu$ m.



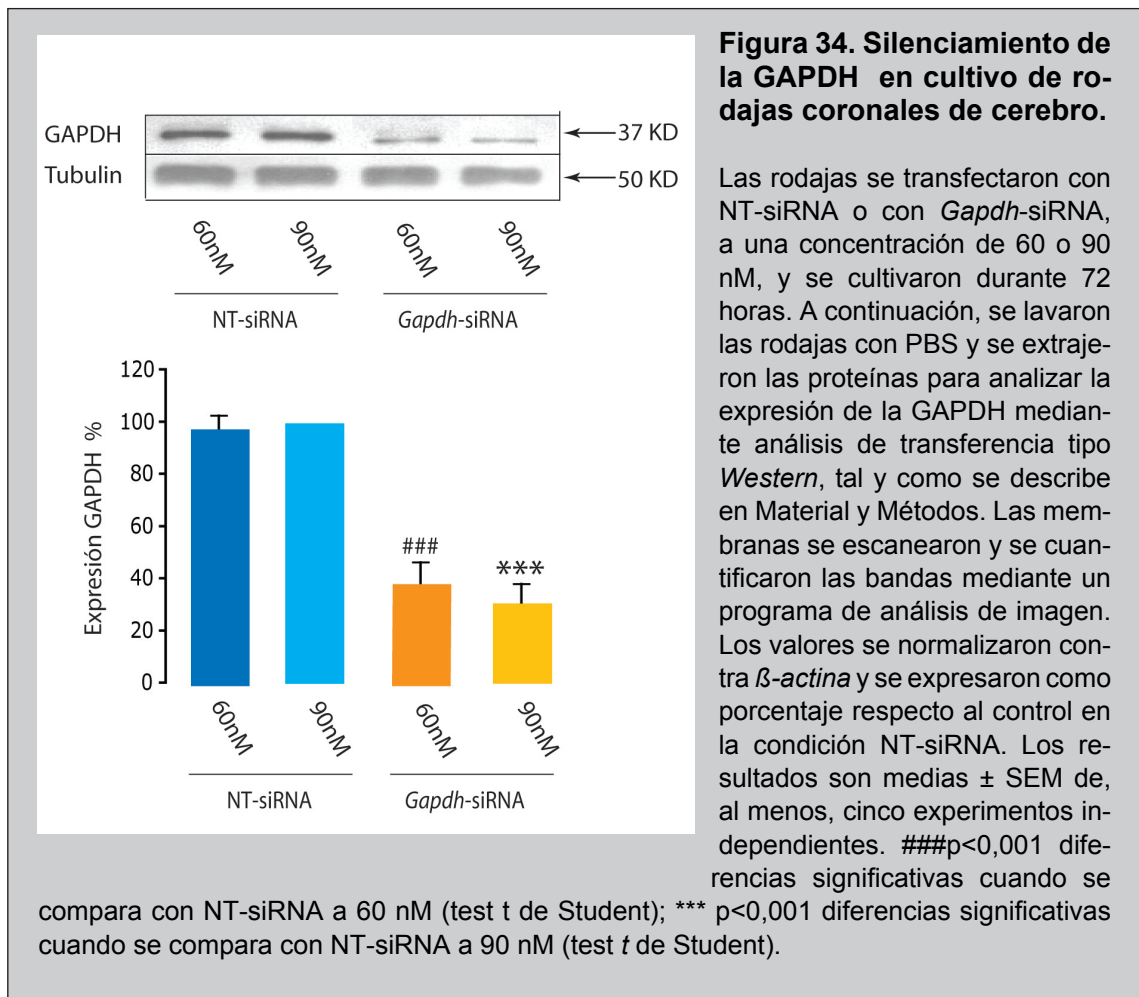
Para confirmar estos resultados, a las 72 horas de cultivo se extrajeron las proteínas de las rodajas y se analizó la expresión de GAP-43 mediante transferencia tipo *Western*. Los resultados (figura 33) muestran que la presencia de albúmina aumenta la expresión de GAP-43 un 60%. Asimismo la presencia de albúmina + ácido oleico produjo un incremento similar al de la albúmina, no siendo estadísticamente significativo.



#### 4.5.1 Efecto del silenciamiento de la SCD-1 sobre la axonogénesis del núcleo estriado

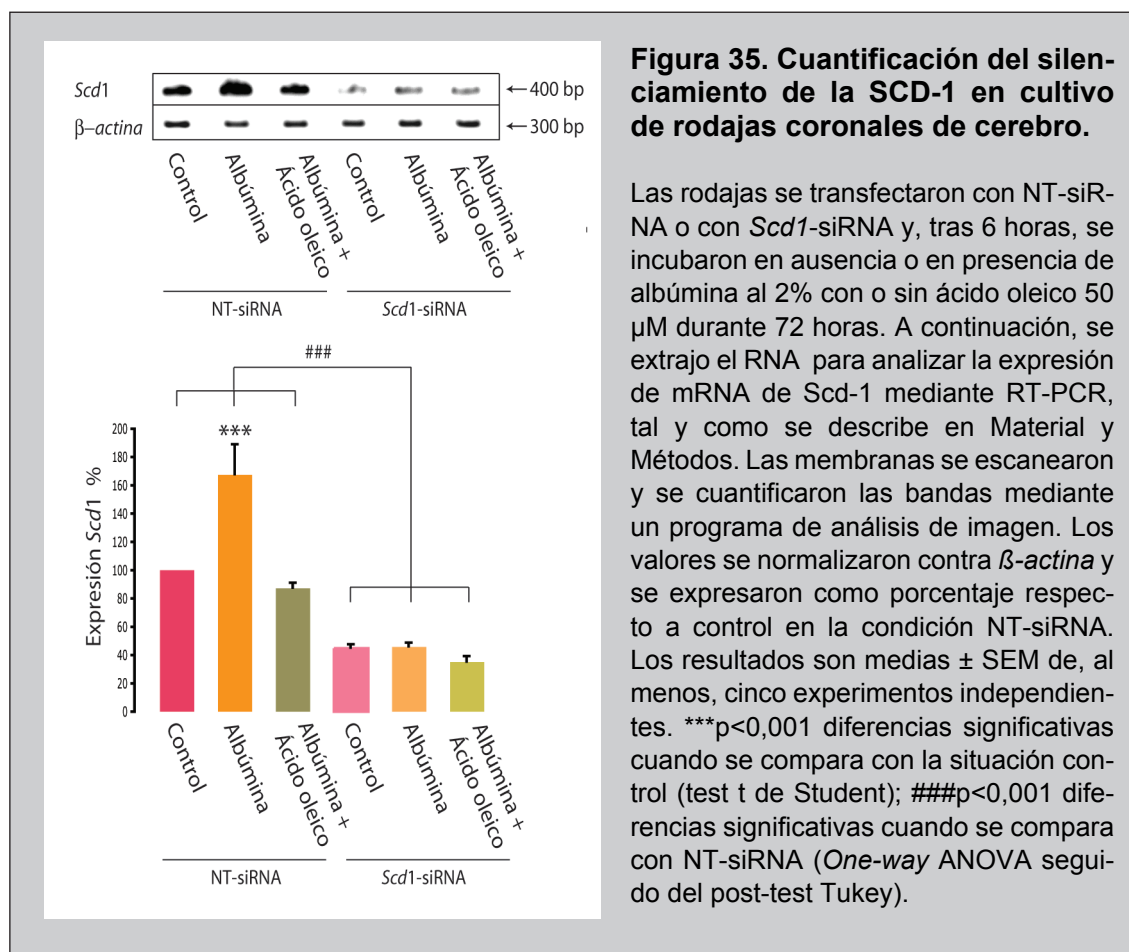
Los experimentos descritos hasta el momento indican que en nuestras condiciones experimentales la SCD-1 se expresa en la SVZ inmediatamente tras el nacimiento (figura 7), además la albúmina induce la axonogénesis en el estriado. Para saber si el efecto de la albúmina sobre la axonogénesis en el estriado estaba mediado por el ácido oleico, decidimos investigar los efectos del silenciamiento de la SCD-1 sobre la axonogénesis producida por la albúmina en el estriado del cerebro postnatal.

Previamente pusimos a punto las condiciones de silenciamiento en cultivos organotípicos de rodajas de cerebro. Para ello empleamos, como así mismo habíamos hecho con los explantes, un siRNA validado para *Gapdh* a 60 nM y 90 nM y como agente de transfección utilizamos Lipofectamina 2000 a una concentración de 3  $\mu$ L/mL. Los resultados muestran (figura 34) una fuerte reducción en la expresión de la GAPDH cuando se transfectó con 60 nM de siRNA.



Para determinar si la SCD-1 interviene en el efecto de la albúmina sobre la axonogénesis en rodajas de cerebro, la expresión de la SCD-1 se silenció por siRNA. Se empleó como control una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana (denominada NT-siRNA). Para comprobar el silenciamiento de la SCD-1 en los cultivos organotípicos se realizó la transfección de la secuencia 1 a una concentración de 60 nM durante 12 horas. A continuación, se realizó una RT-PCR para analizar los niveles

de *Scd-1*. La [figura 35](#) muestra que la transfección con el *Scd1*-siRNA produce una reducción cercana al 60% en la expresión de *Scd-1* en la condición control. Por otro lado, la presencia de albúmina en el cultivo transfectado con la secuencia NT-siRNA aumenta la expresión de *Scd-1* aproximadamente un 70%. Sin embargo, la presencia de albúmina + ácido oleico no modifica la expresión. Así mismo, en los cultivos silenciados ni la albúmina ni la albúmina + ácido oleico modifica los niveles de mRNA de la SCD-1.



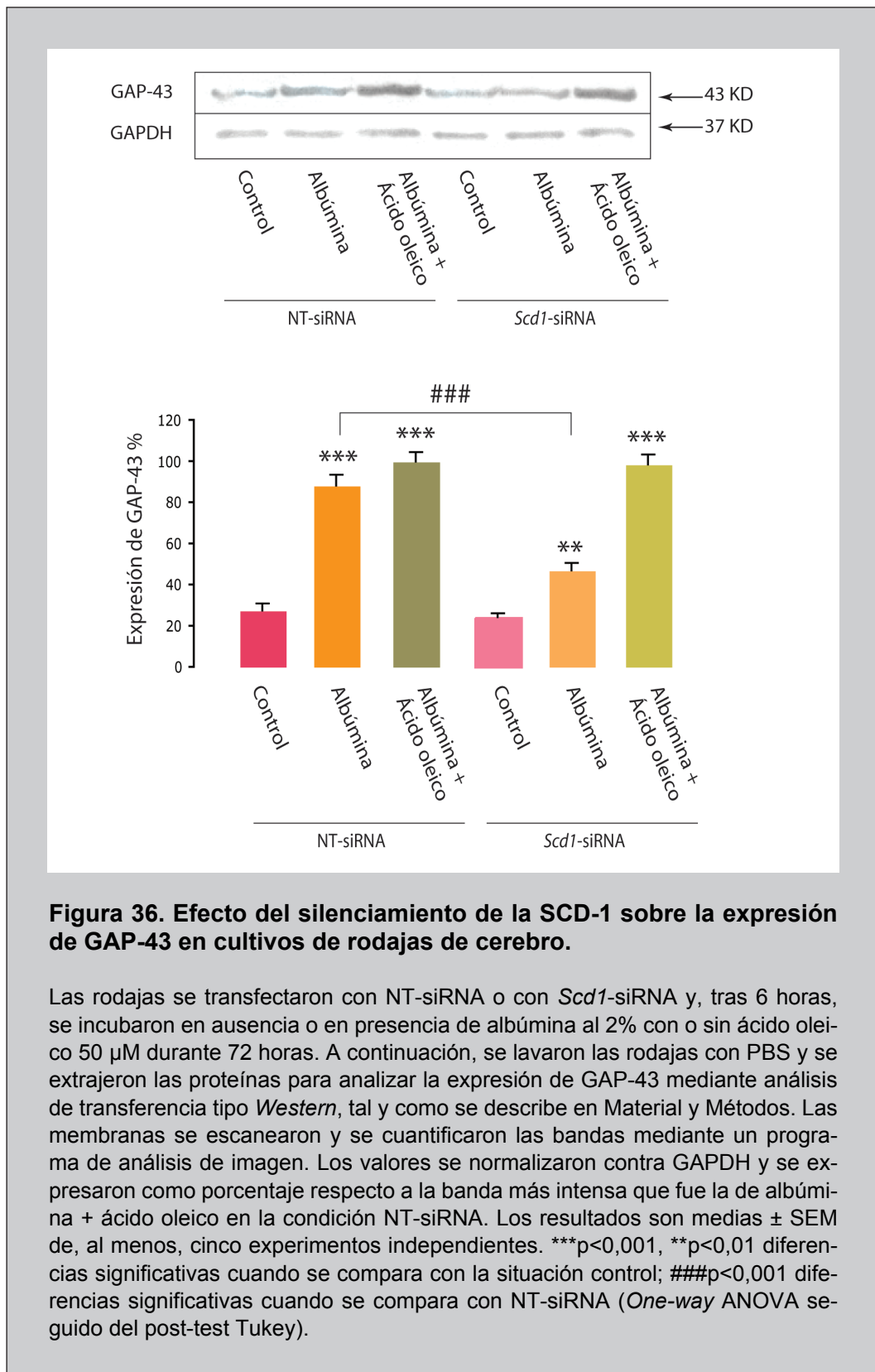
**Figura 35. Cuantificación del silenciamiento de la SCD-1 en cultivo de rodajas coronales de cerebro.**

Las rodajas se transfectaron con NT-siRNA o con *Scd1*-siRNA y, tras 6 horas, se incubaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M durante 72 horas. A continuación, se extrajo el RNA para analizar la expresión de mRNA de *Scd-1* mediante RT-PCR, tal y como se describe en Material y Métodos. Las membranas se escanearon y se cuantificaron las bandas mediante un programa de análisis de imagen. Los valores se normalizaron contra  $\beta$ -actina y se expresaron como porcentaje respecto a control en la condición NT-siRNA. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de, al menos, cinco experimentos independientes. \*\*\* $p$ <0,001 diferencias significativas cuando se compara con la situación control (test t de Student); ### $p$ <0,001 diferencias significativas cuando se compara con NT-siRNA (One-way ANOVA seguido del post-test Tukey).

Una vez comprobada la eficiencia del silenciamiento de la SCD-1 mediante siRNA, determinamos su implicación en la axonogénesis. Para lo cual, las rodajas se preincubaron durante 6 horas en el medio de transfección con NT-siRNA o *Scd1*-siRNA. Posteriormente, se sembraron y se incubaron en nuevo medio de transfección, en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M. A las 72 horas se extrajeron las proteínas y se analizó la expresión de GAP-43 por transferen-



cia tipo *Western*. Los resultados (figura 36) indican que el silenciamiento de la SCD-1 impide el efecto de la albúmina sobre GAP-43 en un 45%. Sin embargo el efecto de la albúmina + ácido oleico no se ve modificada por la ausencia de SCD-1.



**Figura 36. Efecto del silenciamiento de la SCD-1 sobre la expresión de GAP-43 en cultivos de rodajas de cerebro.**

Las rodajas se transfectaron con NT-siRNA o con *Scd1*-siRNA y, tras 6 horas, se incubaron en ausencia o en presencia de albúmina al 2% con o sin ácido oleico 50  $\mu$ M durante 72 horas. A continuación, se lavaron las rodajas con PBS y se extrajeron las proteínas para analizar la expresión de GAP-43 mediante análisis de transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Las membranas se escanearon y se cuantificaron las bandas mediante un programa de análisis de imagen. Los valores se normalizaron contra GAPDH y se expresaron como porcentaje respecto a la banda más intensa que fue la de albúmina + ácido oleico en la condición NT-siRNA. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de, al menos, cinco experimentos independientes. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  diferencias significativas cuando se compara con la situación control; ### $p < 0,001$  diferencias significativas cuando se compara con NT-siRNA (*One-way ANOVA* seguido del post-test Tukey).



DISCUSIÓN



Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que la presencia de albúmina induce la síntesis de ácido oleico en los astrocitos (Medina y Tabernero 2002; Tabernero y col. 2001). La albúmina se internaliza en los astrocitos a través de un sistema caveolina dependiente (Bento-Abreu, 2009, no publicado), siendo la megalina su receptor (Bento-Abreu y col. 2008) posteriormente sufre un proceso de transcitosis que incluye el paso de la albúmina por el retículo endoplásmico y por el Golgi (Medina y Tabernero 2002; Tabernero y col. 2002b). Es precisamente en el retículo donde se sintetiza el ácido oleico. La albúmina activa SCD-1 a través del SREBP-1 (Tabernero y col. 2002b), proteína que se une al elemento regulador de esteroides (Velasco y col. 2003). A continuación, el ácido oleico es liberado al medio extracelular formando el complejo albúmina-ácido oleico.

El complejo albúmina-ácido oleico es endocitado por las neuronas en cultivo primario, induciendo la expresión de proteínas marcadoras de crecimiento axonal y dendrítico, GAP-43 y MAP-2, respectivamente (Tabernero y col. 2001; Tabernero y col. 2002b). En este sentido, el ácido oleico promueve, asimismo, la agregación de estas neuronas en grupos que emiten axones y dendritas, formando una red similar a la materia blanca y la materia gris del sistema nervioso central (Tabernero y col. 2001).

Es conocido que, en la etapa perinatal, la proteína sérica de mayor abundancia en el cerebro es la albúmina (Dziegielewska y col. 1981a), presentando concentraciones 10 veces mayores que en el adulto (Habgood y col. 1992). De hecho, la concentración de albúmina en el cerebro es muy alta en el primer día de vida postnatal, disminuyendo progresivamente hasta el día 20, cuando alcanza los valores que serán constantes durante toda la vida adulta (Habgood y col. 1992).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y conociendo que la estearil-CoA desaturasa-1 (SCD-1), enzima clave en la síntesis de ácido oleico, se encuentra elevada durante los primeros días de vida postnatal (Velasco y col. 2003), nos propusimos investigar el papel que podría jugar el ácido oleico en el desarrollo postnatal del cerebro.

Nuestro primer objetivo fue analizar la presencia de ácido oleico en cerebro durante los primeros días de vida postnatal. En este sentido, nuestros resultados indican que se produce un fuerte incremento en la concentración ácido oleico libre justo después del nacimiento (figura 2B). Sin embargo, otros ácidos grasos, tales como el ácido palmítico, no sufren cambios sustanciales durante el mismo periodo (figura 2B). Así, si comparamos las concentraciones de ácido palmítico con las del ácido oleico podemos observar que éste último se encuentra a concentraciones dos veces superiores a las del ácido palmítico en el día primero de vida. Es necesario resaltar que el aumento de la concentración de ácido oleico observado en nuestros experimentos coincide con el aumento de la expresión de la MAP-2 y GAP-43, proteínas marcadoras del crecimiento dendrítico y axonal, respectivamente (Velasco y col. 2003). Por consiguiente, estos resultados tomados en su conjunto sugieren que el ácido oleico puede jugar un papel esencial en el desarrollo postnatal del cerebro.

Como primer paso para intentar demostrar esta hipótesis decidimos estudiar la localización zonal de la SCD-1 en el cerebro de rata durante el desarrollo postnatal. De hecho, la isoforma 2 de la SCD ha sido descrita en el cerebro como una enzima constitutiva (DeWille y Farmer 1993; Lane, 1989). Por el contrario, la isoforma 1 sólo se encuentra elevada durante los primeros días de vida (Velasco y col. 2003), siendo posiblemente la responsable del aumento de las concentraciones de ácido oleico observado en nuestros experimentos (figura 2B). En este sentido, nuestros resultados indican que inmediatamente tras el nacimiento, la SCD-1 está muy aumentada, encontrándose confinada en la SVZ (figura 7), a lo largo del eje rostro-caudal. Esta distribución espacio-temporal coincide con la observada para la albúmina (figura 9), que en el día P1 es únicamente observable en el parénquima cerebral y de una forma más patente, en la SVZ.

La presencia de albúmina coincide con la existencia de un receptor específico para la albúmina en el cerebro, cuya expresión se encuentra regulada durante el desarrollo y que se ha postulado durante décadas (Laborda y col. 1989; Habgood y col. 1992; Ohsugi y col. 1992). Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha demostrado que la megalina es el receptor de albúmina en astrocitos y, a su vez, se mostró como su expresión está regulada durante el desarrollo postnatal en el cerebro (Bentro-Abreu y col., 2008), siendo, probablemente responsable de la elevada concentración

de albúmina en el cerebro durante los primeros días de vida postnatal (Mollgard y col. 1979; Trojan y Uriel, 1979; Dziegielewska y col. 1980; Velasco y col. 2003). La expresión de megalina se ha corroborado mediante inmunohistoquímica (figura 11) pudiendo observarse tanto en el plexo coroideo, lugar de entrada de la albúmina desde el torrente sanguíneo al líquido cefalorraquídeo, así como en la pared celular que bordea el ventrículo lateral haciendo suponer que ésta es la principal vía de entrada de la albúmina a la SVZ. A su vez, la presencia de megalina es coincidente con la expresión de caveolinas (figura 12), proteínas que forman las caveolas, mecanismo por el cual la albúmina es endocitada (Bento-Abreu, no publicado).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la endocitosis de la albúmina en astrocitos está mediada por caveolas, siendo la caveolina-1 la responsable del reclutamiento de la megalina y, la caveolina-2 la mediadora en la formación e internalización de las caveolas (Bento-Abreu, no publicado). En este sentido, nuestros resultados (figuras 11 y 12) indican que la presencia de megalina coincide con los de las caveolinas 1 y 2, lo que sugiere que la maquinaria específica de endocitosis de la albúmina está presente en la SVZ durante el periodo neonatal temprano.

Aunque nuestro laboratorio ha demostrado que los astrocitos en cultivo primario son capaces de sintetizar ácido oleico en respuesta a la albúmina en la SVZ durante la temprana etapa postnatal no se observan células GFAP positivas (figura 13). Sin embargo, es en esta región y en este momento en el que se expresa la SCD-1 (figura 7), enzima limitante de la síntesis de dicho ácido graso. Este hecho nos llevó a preguntarnos qué células serían las encargadas de realizar la síntesis de ácido oleico in vivo. En este sentido, observamos la presencia de células BLBP positivas en la SVZ (figura 15). De hecho, las células BLBP positivas son identificadas como glía radial y son precursoras de astrocitos y de neuronas (Gotz y Huttner 2005). En este sentido, la glía radial se encuentra presente durante los primeros estadios del desarrollo, aunque posteriormente (P15) son sustituidas por células GFAP positivas (Merkle y Alvarez-Buylla 2006). Como se puede observar en las figuras 9 y 13 la expresión de la albúmina y la de la BLBP muestran una localización muy similar a P1, mostrando formaciones en hileras perpendiculares al ventrículo lateral (figura 16). Este hecho parece indicar que podría ser la glía radial (células BLBP positivas) la encargada de sintetizar el ácido oleico en la SVZ justo después del nacimiento. En apo-

yo de esta hipótesis, los astrocitos en cultivo primario (figura 14) coexpresan BLBP y GFAP, lo que parece indicar que los astrocitos en cultivo expresan, al menos en parte, el fenotipo de la glía radial.

La SVZ se compone de células con capacidad proliferativa, tales como los progenitores basales y la glía radial, así como neuronas postmitóticas sin madurar. El hecho de que la SCD-1 se expresase en dicha región del cerebro nos llevó a estudiar el papel que podía ejercer la presencia de esta enzima en dicha zona mediante el empleo de explantes de SVZ. De hecho, los explantes permiten el estudio de zonas discretas del SNC, dado que mantienen las características propias de la zona, siendo ajenas a la influencia de las áreas adyacentes. Nuestros resultados muestran que la presencia de albúmina promueve la migración de las células presentes en la SVZ (figura 21). Sin embargo, el silenciamiento de la SCD-1 en los explantes previene el efecto de la albúmina sobre la migración celular (figura 27E), aunque no en presencia de ácido oleico (figura 27F). Estos resultados indican claramente que la actividad de la SCD-1 es necesaria para la migración celular observada en los explantes de la SVZ tratados con albúmina. Es importante destacar que prácticamente la totalidad de las células que migran son TUJ-1 positivas, lo que sugiere que se trata de neuronas (figura 17). Por otro lado, si se estudia la localización de la GAP-43 en las neuronas que migran por efecto de la albúmina, se puede observar que, en presencia de albúmina o de albúmina + ácido oleico, la expresión de GAP-43 es muy aparente en los *leading process*. Este efecto de la albúmina sobre la GAP-43 desaparece en explantes cuando la SCD-1 se silencia indicando que es un efecto dependiente de ácido oleico, lo que es muy importante, dado el papel de esta proteína en la migración, arborización y formación de sinapsis (Aigner y Caroni 1995).

En este sentido, GAP-43 está asociada a la prolongación de filopodios y a la arborización de las neuritas, durante el desarrollo y la regeneración neuronal y su ausencia genera déficits en la localización neuronal (Denny 2006). El hecho de que el ácido oleico promueva la expresión de GAP-43 en el *leading process* y la migración de las neuronas de la SVZ abre un nuevo camino en la aplicación de este factor neurotrófico como propulsor de la migración de nuevas neuronas durante procesos isquémicos o neurodegenerativos en el cerebro adulto. Así, la SVZ del cerebro adulto



es una de las principales dianas terapéuticas por su capacidad de generar nuevas neuronas en el cerebro adulto.

Por otro lado, nuestro grupo ha mostrado previamente que el ácido oleico actúa como factor neurotrófico en las neuronas, induciendo la expresión de las proteínas marcadoras del crecimiento axonal y dendrítico, tales como la GAP-43 y la MAP-2, respectivamente (Tabernero y col. 2001; Tabernero y col. 2002a). De hecho, la proteína GAP-43 ejerce un papel fundamental en el crecimiento axonal (Meiri y col. 1986; Van Hooff y col. 1988), siendo P4 el día de su máxima expresión en el cerebro (Dani y col. 1991; Velasco y col. 2003). Como se puede observar en la figura 18, nuestros resultados indican que existe una relación espacio-temporal entre la expresión de MAP-2 y de GAP-43, con la de la enzima limitante de la síntesis de ácido oleico, SCD-1 (figura 7). Este hecho sugiere que el ácido oleico puede jugar un papel fundamental en la maduración axonal durante el periodo neonatal temprano. En este sentido, se ha descrito que la expresión de GAP-43 presenta bajos niveles a E21, produciéndose un aumento sustancial justo después del nacimiento. Así, la expresión de la GAP-43 aumenta tras el nacimiento hasta llegar a su máximo nivel de expresión hacia la mitad de la primera semana de vida postnatal (Dani y col. 1991; Velasco y col. 2003).

Teniendo en cuenta estos precedentes, decidimos investigar el posible papel que podía ejercer la albúmina y, subsecuentemente, el ácido oleico sobre la expresión de GAP-43 en el cerebro. Para ello, empleamos cultivos organotípicos de rodajas de cerebro extraídos a E21. De esta manera podíamos estudiar el efecto del ácido oleico en zonas más amplias del cerebro, lo que nos permitiría, en su caso, conocer la influencia de la SVZ sobre las áreas adyacentes. Nuestros resultados muestran, que la presencia de albúmina incrementa significativamente la expresión de GAP-43 en cerebro (figura 33). Es más, la detección inmunohistoquímica de las rodajas nos permitió comprobar que el aumento de GAP-43 está localizado en el núcleo estriado (figura 31). Además, este fenómeno está mediado por la actividad de la SCD-1 en la SVZ, puesto que su silenciamiento mediante RNA de interferencia previene el aumento de la expresión de GAP-43 producida por la albúmina, pero no cuando ésta está acompañada de ácido oleico (figura 36).

La generación de neuronas del núcleo estriado tiene lugar en dos oleadas, una primera oleada de neuronas entre E13 y E16 y una segunda entre E16 y E20. A continuación, estas células migran desde la SVZ hasta el núcleo estriado. De hecho, el desarrollo y maduración del núcleo estriado continúa durante las dos primeras semanas después del nacimiento, observándose crecimiento axonal seguido de formación de sinapsis (Fishell y van der Kooy 1987). En este sentido, la expresión de GAP-43 observada en el estriado es alta el primer día de vida descendiendo a continuación (figura 18). La patología de la enfermedad de Huntington no está clara a día de hoy y se barajan tres hipótesis sobre los mecanismos implicados en la degeneración. Una de las hipótesis se basa en la excitotoxicidad que resulta de la sobreestimulación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos estriatales por parte del glutamato que llega de la corteza cerebral. Otra hipótesis apunta a la disfunción del metabolismo energético como posible causa de la enfermedad, dado que las neuronas estriatales son especialmente sensibles a las toxinas de acción mitocondrial (Broulliet y col., 1999). La tercera hipótesis sugiere la pérdida del aporte trófico de las células estriatales. Por otro lado, se ha observado una disminución de la expresión de BDNF en pacientes con la enfermedad de Huntington (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001) por acción de la huntingtina mutada. También se ha descrito una menor aportación de BDNF de la corteza al estriado (Gauthier y col., 2004) y una alteración en la secreción de BDNF (Del y col., 2006). Se ha mostrado que el aporte de la neurotrofina BDNF, las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, FGF y GDNF han demostrado promover la supervivencia de neuronas estriatales (Ventimiglia y col., 1995; Gavaldá y col., 2004). De la misma manera, muchos de estos factores también son efectivos en la protección de neuronas estriatales frente a un estímulo excitotóxico o isquémico in vivo (Alexi y col., 1997; Alberch y col., 2002).

Por otro lado, estudios anatómicos realizados en los cerebros de ratones transgénicos nulos de huntingtina, una proteína asociada a la enfermedad de Huntington, sugieren que las neuronas espinosas medianas del estriado no completan adecuadamente su programa de desarrollo postnatal, manteniendo características electrofisiológicas y morfológicas propias de neuronas inmaduras (Belleau y Warren 2000; Cepeda y col. 1991; Klapstein y col. 2001; Tepper y col. 1998). Estas observaciones sugieren que la enfermedad de Huntington pudiera ser el resultado de una alteración del desarrollo del estriado (Hernández-Echeagaray 2004). Por tanto, dado que

el ácido oleico está presente durante este momento del desarrollo, sus efectos neurotróficos podrían ejercer un papel importante en la maduración del núcleo estriado, sin olvidar su posible uso terapéutico en la prevención de ésta y otras enfermedades neurodegenerativas que cursan con la degeneración de las neuronas del estriado.

Tomados en su conjunto, nuestros resultados indican que durante la fase postnatal del desarrollo cerebral, la zona subventricular, además de ser la principal fuente de neuronas durante este periodo, sintetiza ácido oleico, el cual, presumiblemente, ejerce sus efectos neurotróficos in situ, así como en las zonas adyacentes. De hecho, coincide con la expresión de proteínas características del desarrollo neuronal, tales como la GAP-43, la cual es imprescindible para el crecimiento del axón. Asimismo, el ácido oleico aumenta la migración de las neuronas de la zona subventricular, lo que sugiere que el ácido oleico puede cumplir un papel importante en la migración de las neuronas que abandonan la zona subventricular durante este periodo. Por último, el ácido oleico parece estar destinado como señal del desarrollo del estriado, dado que produce en esta zona el engrosamiento de los haces axonales, contribuyendo, posiblemente, a la maduración definitiva de las neuronas de esta zona.

Es necesario poner de manifiesto que la segunda fase del desarrollo cerebral, es decir, la que tiene lugar durante el periodo perinatal es de vital importancia en la especie humana en la que gran parte del desarrollo del SNC tiene lugar después del nacimiento. Por consiguiente, nuestros resultados apuntan al ácido oleico como un factor fundamental en el desarrollo del cerebro durante este periodo. De hecho, la síntesis de ácido oleico inducida por la albúmina podría ser una señal que controlara la zona subventricular, así como la maduración final del estriado.



CONCLUSIONES



**1.** La concentración de ácido oleico libre en el cerebro aumenta durante el primer día de vida, disminuyendo los días siguientes. La estearil-CoA desaturasa-1 (SCD-1), enzima limitante de la síntesis de ácido oleico, se localiza en la zona subventricular a lo largo del eje rostro-caudal del cerebro, mostrando su nivel más alto durante el primer día de vida, coincidiendo con el pico máximo de ácido oleico. Estos resultados sugieren que el ácido oleico puede servir de señal en el desarrollo postnatal del cerebro.

**2.** 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, hasta quedar finalmente confinada, a partir del día décimo, en el plexo coroideo. Por tanto, durante los primeros días de vida postnatal, se observa una relación espacio-temporal entre la presencia de albúmina y la SCD-1, lo que sugiere que la albúmina induce la síntesis de ácido oleico en la zona subventricular.

**3.** La megalina, que actúa como receptor de la albúmina en astrocitos, así como las caveolinas 1 y 2, proteínas claves en la endocitosis de la albúmina, están presentes en las células que rodean el ventrículo lateral, lo que sugiere que la maquinaria necesaria para la endocitosis de la albúmina está presente en las células de la zona subventricular.

**4.** La albúmina promueve la migración celular en explantes de la zona subventricular. Estas células son neuronas, a juzgar por la expresión de TUJ-1, y por la presencia de GAP-43 en sus *leading process*. El efecto de la albúmina sobre la migración neuronal es dependiente del ácido oleico sintetizado en la zona subventricular, puesto que el silenciamiento de la SCD-1 suprime el efecto de la albúmina, a menos que ésta vaya acompañada de ácido oleico.

**5.** La distribución de las proteínas marcadoras del desarrollo neuronal, TUJ-1, MAP-2 y GAP-43, se correlaciona con la presencia de la SCD-1, tanto en el espacio como en el tiempo, lo que sugiere que la síntesis de ácido oleico está relacionada con la maduración de las neuronas durante la etapa postnatal temprana.

**6.** La albúmina induce la axonogénesis en el estriado, produciendo un aumento significativo de la expresión de GAP-43, así como del grosor de los fascículos axonales. Este fenómeno es dependiente de la actividad de la SCD-1, dado que su silenciamiento impide tales fenómenos. Estos resultados sugieren que el desarrollo postnatal del estriado está controlado por el ácido oleico sintetizado en la zona subventricular en respuesta a la albúmina.

**Conclusión final:** La albúmina promueve la migración de las neuronas de la zona subventricular y la maduración de las neuronas del estriado. Dichos fenómenos son dependientes de la síntesis de ácido oleico en la zona subventricular. Estos resultados tomados en su conjunto sugieren que el ácido oleico controla la maduración neuronal durante el desarrollo postnatal del cerebro.



# BIBLIOGRAFÍA



- Aigner L., and Caroni P.** (1995) Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43-depleted growth cones. *J Cell Biol* 128: 647-660.
- Alberch J., Perez-Navarro E., and Canals J.M.** (2002) Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 57: 817-822.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J.D.** *Biología Molecular de la Célula*. Barcelona: Garland Publishing, Inc., 1996.
- Alexi T., Venero J.L., and Hefti F.** (1997) Protective effects of neurotrophin-4/5 and transforming growth factor- $\alpha$  on striatal neuronal phenotypic degeneration after excitotoxic lesioning with quinolinic acid. *Neuroscience* 78: 73-86.
- Anderson S.A., Eisenstat D.D., Shi L., and Rubenstein J.L.** (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278: 474-476.
- Angevine J.B., Jr., and Sidman R.L.** (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192: 766-768.
- Arias C., Becerra-Garcia F., Arrieta I., and Tapia R.** (1998) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus in vivo. *Exp Neurol* 153: 242-254.
- Assemat E., Vinot S., Gofflot F., Linsel-Nitschke P., Illien F., Chatelet F., Verroust P., Louvet-Vallee S., Rinninger F., and Kozyraki R.** (2005) Expression and role of cubilin in the internalization of nutrients during the peri-implantation development of the rodent embryo. *Biol Reprod* 72: 1079-1086.
- Avila J., Dominguez J., and Diaz-Nido J.** (1994) Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol* 38: 13-25.
- Bar-Or D., Rael L.T., Lau E.P., Rao N.K., Thomas G.W., Winkler J.V., Yukl R.L., Kingston R.G., and Curtis C.G.** (2001) An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 856-862.
- Barbin G., Pollard H., Gaiarsa J.L., and Ben-Ari Y.** (1993) Involvement of GABA<sub>A</sub> receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 152: 150-154.
- Baskin D.G., Figlewicz D.P., Woods S.C., Porte Jr. D., and Dorsa D.M.** (1987) Insulin in the brain. *Ann Rev Physiol* 49: 335-347.
- Bayer S.A.** Neurogenesis and Neuronal Migration. In: *The Rat Nervous System*, edited by Paxinos G. Sydney: Academic Press, 1995, p. 1041-1076.
- Bayer S.A.** The development of the central nervous system. In: *Development Neurochemistry*, edited by Wiggins RC, McCandless DW, and Enna SJ. Austin: University of Texas Press, 1985, p. 18-56.
- Bayer S.A., and Altman J.** (1991) Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience* 45: 391-412.
- Beiraghi S., Zhou M., Talmadge C.B., Went-Sumegi N., Davis J.R., Huang D., Saal H., Seemayer T.A., and Sumegi J.** (2003) Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv(4)(p13.1q21.1) in a family with cleft lip. *Gene* 309: 11-21.
- Belayev L., Liu Y., Zhao W., Busto R., and Ginsberg M.D.** (2001) Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke* 32: 553-560.
- Belleau M.L., and Warren R.A.** (2000) Postnatal development of electrophysiological properties of nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol* 84: 2204-2216.
- Benowitz L.I., and Routtenberg A.** (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20: 84-91.

- Bento-Abreu A., Tabernero A., and Medina J.M.** (2007) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. *J Neurochem* 103: 871-881.
- Bento-Abreu A., Velasco A., Polo-Hernandez E., Perez-Reyes P.L., Tabernero A., and Medina J.M.** (2008) Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem* 106: 1149-1159.
- Bhattacharya A.A., Grune T., and Curry S.** (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 303: 721-732.
- Bligh E.G., and Dyer W.J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Bolam J.P., Hanley J.J., Booth P.A., and Bevan M.D.** (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 ( Pt 4): 527-542.
- Bradford H.F.** *Chemical Neurobiology. An introduction to Neurochemistry.* New York: W. H. Freeman & Company, 1986.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Breuer S., Pech K., Buss A., Spitzer C., Ozols J., Hol E.M., Heussen N., Noth J., Schwaiger F.W., and Schmitt A.B.** (2004) Regulation of stearyl-CoA desaturase-1 after central and peripheral nerve lesions. *BMC Neurosci* 5: 15.
- Brouillet E., Conde F., Beal M.F., and Hantraye P.** (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59: 427-468.
- Bulloch A.G.M.** (1987) Somatostatin enhances neurite outgrowth and electrical coupling of regenerating neurons in *Helisoma*. *Brain Res* 412: 6-17.
- Cáceres A., Banker G., Steward O., Binder L., and Payne M.** (1984) MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* 315: 314-318.
- Cáceres A., Banker G.A., and Binder L.** (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 6: 714-722.
- Campbell K.** (2005) Cortical neuron specification: it has its time and place. *Neuron* 46: 373-376.
- Campbell K., Olsson M., and Bjorklund A.** (1995) Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* 15: 1259-1273.
- Carey E.M.** The biochemistry of fetal brain development and myelination. In: *Biochemical Development of the Fetus and Neonate*, edited by Jones CT. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982, p. 287-336.
- Carro E., Spuch C., Trejo J.L., Antequera D., and Torres-Aleman I.** (2005) Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 25: 10884-10893.
- Caviness J.V.S.** Normal development of cerebral neocortex. In: *Developmental Neurobiology*, edited by Evrard P, and Minkowski A. New York: Vevey, Raven Press, 1989, p. 1-10.
- Caviness V.S., Jr., and Takahashi T.** (1995) Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17: 159-163.
- Cepeda C., Walsh J.P., Buchwald N.A., and Levine M.S.** (1991) Neurophysiological maturation of cat caudate neurons: evidence from in vitro studies. *Synapse* 7: 278-290.
- Chesselet M.F., and Robbins E.** (1989) Regional differences in substance P-like immunoreactivity in the striatum correlate with levels of pre-protachykinin mRNA. *Neurosci Lett* 96: 47-53.
- Chiaramello A., Neuman T., Peavy D.R., and Zuber M.X.** (1996) The GAP-43 gene is a direct downstream target of the basic helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem* 271: 22035-22043.

- Cohen S.** (1960) Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the Mouse Salivary Gland and Its Neuro-Cytotoxic Antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46: 302-311.
- Cowan W.M.** Desarrollo del cerebro. In: *El Cerebro*, edited by Hubel DH. Barcelona: Prensa Científica, 1987, p. 69-81.
- Cui S., Verroust P.J., Moestrup S.K., and Christensen E.I.** (1996) Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 271: F900-907.
- Curry S., Brick P., and Franks N.P.** (1999) Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* 1441: 131-140.
- Dani J.W., Armstrong D.M., and Benowitz L.I.** (1991) Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. *Neuroscience* 40: 277-287.
- de Carlos J.A., Lopez-Mascaraque L., and Valverde F.** (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16: 6146-6156.
- Deacon T.W., Pakzaban P., and Isacson O.** (1994) The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res* 668: 211-219.
- Deane R., Wu Z., and Zlokovic B.V.** (2004) RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35: 2628-2631.
- DeDiego I., Smith-Fernandez A., and Fairen A.** (1994) Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* 6: 983-997.
- DeFelipe J.** (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14: 1-19.
- DeFelipe J., and Farinas I.** (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39: 563-607.
- Dehay C., and Kennedy H.** (2007) Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 8: 438-450.
- Denny J.B.** (2006) Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol* 4: 293-304.
- Desai A.R., and McConnell S.K.** (2000) Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* 127: 2863-2872.
- DeWille J.W., and Farmer S.J.** (1993) Linoleic acid controls neonatal tissue-specific stearyl-CoA desaturase mRNA levels. *Biochim Biophys Acta* 1170: 291-295.
- Dinsmore J.H., and Solomon F.** (1991) Inhibition of MAP-2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* 64: 817-826.
- Doweiko J.P., and Nompleggi D.J.** (1991) Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 15: 207-211.
- Du Y., and Dreyfus C.F.** (2002) Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res* 68: 647-654.
- Duerden J.M., and Gibbons G.F.** (1990) Storage, mobilization and secretion of cytosolic triacylglycerol in hepatocyte cultures. The role of insulin. *Biochem J* 272: 583-587.
- Dziegielewska K.M., Evans C.A., Lai P.C., Lorscheider F.L., Malinowska D.H., Mollgard K., and Saunders N.R.** (1981a) Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal rats during development. *Dev Biol* 83: 193-200.
- Dziegielewska K.M., Evans C.A.N., Lai P.C.W., Lorscheider F.L., Malinowska D.H., Mollgard K., and Saunders N.R.** (1981b) Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal rats during development. *Dev Biol* 83: 193-200.
- Elliot K.A.C.** The use of brain slices. In: *Handbook of Neurochemistry*, edited by Lajtha A. New York: Plenum Press, 1969, p. 103-114.

- Enoch H.G., Catala A., and Strittmatter P.** (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* 251: 5095-5103.
- Ferrante R.J., Kowall N.W., Beal M.F., Martin J.B., Bird E.D., and Richardson E.P., Jr.** (1987) Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46: 12-27.
- Ferrante R.J., Kowall N.W., Beal M.F., Richardson E.P., Jr., Bird E.D., and Martin J.B.** (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230: 561-563.
- Ferrer I., Goutan E., Marin C., Rey M.J., and Ribalta T.** (2000) Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res* 866: 257-261.
- Fishell G., and van der Kooy D.** (1987) Pattern formation in the striatum: developmental changes in the distribution of striatonigral neurons. *J Neurosci* 7: 1969-1978.
- Fishell G., and van der Kooy D.** (1991) Pattern formation in the striatum: neurons with early projections to the substantia nigra survive the cell death period. *J Comp Neurol* 312: 33-42.
- Fishman P.S., Farrand D.A., and Kristt D.A.** (1990) Internalization of plasma proteins by cerebellar purkinje cells. 100: 43-49.
- Gal J.S., Morozov Y.M., Ayoub A.E., Chatterjee M., Rakic P., and Haydar T.F.** (2006) Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci* 26: 1045-1056.
- Garbay B., Boiron-Sargueil F., Shy M., Chbihi T., Jiang H., Kamholz J., and Cassagne C.** (1998) Regulation of oleoyl-CoA synthesis in the peripheral nervous system: demonstration of a link with myelin synthesis. *J Neurochem* 71: 1719-1726.
- Gauthier L.R., Charrin B.C., Borrell-Pages M., Dompierre J.P., Rangone H., Cordelieres F.P., De Mey J., MacDonald M.E., Lessmann V., Humbert S., and Saudou F.** (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118: 127-138.
- Gekle M.** (2005) Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol* 67: 573-594.
- Gerfen C.R.** (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311: 461-464.
- Gerfen C.R.** (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15: 133-139.
- Gerfen C.R., Baimbridge K.G., and Miller J.J.** (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8780-8784.
- Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F.J., Jr., and Sibley D.R.** (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1432.
- Gervais F.G., Singaraja R., Xanthoudakis S., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Metzler M., Hackam A.S., Tam J., Vaillancourt J.P., Houtzager V., Rasper D.M., Roy S., Hayden M.R., and Nicholson D.W.** (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol* 4: 95-105.
- Ginsberg M.D., Palesch Y.Y., and Hill M.D.** (2006) The ALIAS (ALbumin In Acute Stroke) Phase III randomized multicentre clinical trial: design and progress report. *Biochem Soc Trans* 34: 1323-1326.
- Gohlke J.M., Griffith W.C., and Faustman E.M.** (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: 43-54.
- Gottlicher M., Widmark E., Li Q., and Gustafsson J.A.** (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4653-4657.

- Gotz M., and Huttner W.B.** (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777-788.
- Granda B., Taberero A., Tello V., and Medina J.M.** (2003) Oleic acid induces GAP-43 expression through a protein kinase C-mediated mechanism that is independent of NGF but synergistic with NT-3 and NT-4/5. *Brain Res* 988: 1-8.
- Graybiel A.M., Moratalla R., and Robertson H.A.** (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6912-6916.
- Graybiel A.M., and Ragsdale C.W., Jr.** (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5723-5726.
- Grdadolnik J., and Marechal Y.** (2005) Hydrogen-deuterium exchange in bovine serum albumin protein monitored by fourier transform infrared spectroscopy, part I: structural studies. *Appl Spectrosc* 59: 1347-1356.
- Grimm-Jorgensen Y.** (1987) Somatostatin and calcitonin stimulate neurite regeneration of molluscan neurons in vitro. *Brain Res* 403: 121-126.
- Gurr M.I., Harwood J.L., and Frayn K.N.** *Lipid Biochemistry*. Cornwall: Blackwell Science, 2002.
- Gusella J.F., and MacDonald M.E.** (1998) Huntingtin: a single bait hooks many species. *Curr Opin Neurobiol* 8: 425-430.
- Haber S.N., and Watson S.J.** (1985) The comparative distribution of enkephalin, dynorphin and substance P in the human globus pallidus and basal forebrain. *Neuroscience* 14: 1011-1024.
- Habgood M.D., Sedgwick J.E., Dziegielewska K.M., and Saunders N.R.** (1992) A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. *J Physiol* 456: 181-192.
- Habib N.A., Wood C.B., Apostolov K., Barker W., Hershman M.J., Aslam M., Heinemann D., Fermor B., Williamson R.C., Jenkins W.E., and et al.** (1987) Stearic acid and carcinogenesis. *Br J Cancer* 56: 455-458.
- Halliday A.L., and Cepko C.L.** (1992) Generation and migration of cells in the developing striatum. *Neuron* 9: 15-26.
- Hamasaki T., Goto S., Nishikawa S., and Ushio Y.** (2003) Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Brain Res Rev* 41: 1-12.
- Hamburger V., and Levi-Montalcini R.** (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 111: 457-501.
- Hamon M., Bourgoin S., Chanez C., and De Vitry F.** Do serotonin and other neurotransmitters exert a trophic influence on the immature brain? In: *Developmental Neurobiology*, edited by Evrard P, and Minkowski A. New York: Vevey, Raven Press, 1989, p. 171-183.
- Hatten M.E., and Mason C.A.** (1986) Neuron-astroglia interactions in vitro and in vivo. *Trends Biochem Sci* 9: 168-174.
- Hayashi M.** (1992) Ontogeny of some neuropeptides in the primate brain. *Prog Neurobiol* 38: 231-260.
- He P., and Curry F.E.** (1993) Albumin modulation of capillary permeability: role of endothelial cell [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Am J Physiol* 265: H74-82.
- He X.M., and Carter D.C.** (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358: 209-215.
- Hernández-Echeagaray.** *Avances sobre la neurobiología de la enfermedad de Huntington*. Editorial UAM, 2004.
- Herschkowitz N.** (1988) Brain development in the fetus, neonate and infant. *Biol Neonate* 54: 1-19.

- Hevner R.F., Hodge R.D., Daza R.A., and Englund C.** (2006) Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci Res* 55: 223-233.
- Houlgatte R., Mallat M., Brachet P., and Prochiantz A.** (1989) Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain. *J Neurosci Res* 24: 143-152.
- Hovik K.E., Spydevold O.S., and Bremer J.** (1997) Thia fatty acids as substrates and inhibitors of stearoyl-CoA desaturase. *Biochim Biophys Acta* 1349: 251-256.
- Ivins J.K., and Pittman R.N.** (1989) Growth cone-growth cone interactions in cultures of rat sympathetic neurons. *Dev Biol* 135: 147-157.
- Janzer R.C., and Raff M.C.** (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325: 253-256.
- Jeffcoat R., and James A.T.** (1978) The control of stearoyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett* 85: 114-118.
- Johnston J.G., Gerfen C.R., Haber S.N., and van der Kooy D.** (1990) Mechanisms of striatal pattern formation: conservation of mammalian compartmentalization. *Brain Res Dev Brain Res* 57: 93-102.
- Joorgensen K.A., and Stoffersen E.** (1979) Heparin like activity of albumin. *Thromb Res* 16: 569-574.
- Juurink B.H.J., and Devon R.M.** (1990) Macromolecular translocation-a possible function of astrocytes. *Brain Res* 533: 73-77.
- Kaestner K.H., Ntambi J.M., Kelly T.J., Jr., and Lane M.D.** (1989) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 264: 14755-14761.
- Kakita A., and Goldman J.E.** (1999) Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 23: 461-472.
- Kalil R.E.** (1990) Formación de sinapsis durante el desarrollo del cerebro. *Investigación y Ciencia* Febrero: 26-34.
- Kaplan M.R., Meyer-Franke A., Lambert S., Bennett V., Duncan I.D., and Levinson S.R.** (1997) Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* 17: 724-728.
- Kawaguchi Y., and Kubota Y.** (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16: 2701-2715.
- Kawaguchi Y., Wilson C.J., Augood S.J., and Emson P.C.** (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18: 527-535.
- Khan W.A., Blobe G.C., and Hannun Y.A.** (1992) Activation of protein kinase C by oleic acid. *J Biol Chem* 267: 3605-3612.
- Khoo D.E., Fermor B., Miller J., Wood C.B., Apostolov K., Barker W., Williamson R.C., and Habib N.A.** (1991) Manipulation of body fat composition with sterculic acid can inhibit mammary carcinomas in vivo. *Br J Cancer* 63: 97-101.
- Klapstein G.J., Fisher R.S., Zanjani H., Cepeda C., Jokel E.S., Chesselet M.F., and Levine M.S.** (2001) Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J Neurophysiol* 86: 2667-2677.
- Kounnas M.Z., Haudenschild C.C., Strickland D.K., and Argraves W.S.** (1994) Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo* 8: 343-351.
- Laborda J., Naval J., Calvo M., Lampreave F., and Uriel J.** (1989) Alpha-fetoprotein and albumin uptake by mouse tissues during development. *Biol Neonate* 56: 332-341.
- Lanca A.J., Boyd S., Kolb B.E., and van der Kooy D.** (1986) The development of a patchy organization of the rat striatum. *Brain Res* 392: 1-10.



- Lavdas A.A., Grigoriou M., Pachnis V., and Parnavelas J.G.** (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19: 7881-7888.
- Lee J.E.** (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7: 13-20.
- Leegwater-Kim J., and Cha J.H.** (2004) The paradigm of Huntington's disease: therapeutic opportunities in neurodegeneration. *NeuroRx* 1: 128-138.
- Levi-Montalcini R.** (1982) Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Ann Rev Neurosci* 5: 341-362.
- Li J., Ding S.F., Habib N.A., Fermor B.F., Wood C.B., and Gilmour R.S.** (1994) Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 57: 348-352.
- Lipton S.A., and Kater S.B.** (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Biochem Sci* 12: 265-270.
- Liu Y., Belayev L., Zhao W., Busto R., Belayev A., and Ginsberg M.D.** (2001) Neuroprotective effect of treatment with human albumin in permanent focal cerebral ischemia: histopathology and cortical perfusion studies. *Eur J Pharmacol* 428: 193-201.
- Luckenbill E.L.** (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res* 23: 1-27.
- Maccioni R.B., and Cambiasso V.** (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 75: 835-864.
- Madtes J.P., and Redburn D.A.** (1983) GABA as a trophic factor during development. *Life Sci* 33: 979-984.
- Marin O., and Rubenstein J.L.** (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2: 780-790.
- Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., and Wu C.** (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5: 793-807.
- Mauch D.H., Nagler K., Schumacher S., Goritz C., Muller E.C., Otto A., and Pfrieger F.W.** (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294: 1354-1357.
- McBain C.J., and Fisahn A.** (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2: 11-23.
- McConnell S.K.** (1988) Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain Res* 472: 1-23.
- McCormick D.A.** (1989) GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* 62: 1018-1027.
- Medina J.M., and Tabernero A.** (2002) Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *J Physiol Paris* 96: 265-271.
- Meiri K.F., Pfenninger K.H., and Willard M.B.** (1986) Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc Natl Acad Sci* 83: 3537-3541.
- Meisami E., and Timiras P.S.** Normal and abnormal biochemical development of the brain after birth. In: *Biochemical Development of the Fetus and Neonate*, edited by Jones CT. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982, p. 759-821.
- Merkle F.T., and Alvarez-Buylla A.** (2006) Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* 18: 704-709.
- Meyer G., Soria J.M., Martinez-Galan J.R., Martin-Clemente B., and Fairen A.** (1998) Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J Comp Neurol* 397: 493-518.
- Michler A.** (1990) Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. *Int J Dev Neurosci* 8: 463-472.
- Mihara K.** (1990) Structure and regulation of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase gene. *J Biochem (Tokyo)* 108: 1022-1029.

- Mione M.C., Cavanagh J.F., Harris B., and Parnavelas J.G.** (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17: 2018-2029.
- Misson J.P., Austin C.P., Takahashi T., Cepko C.L., and Caviness V.S., Jr.** (1991) The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex* 1: 221-229.
- Miyata T., Kawaguchi A., Okano H., and Ogawa M.** (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31: 727-741.
- Miyazaki M., Jacobson M.J., Man W.C., Cohen P., Asilmaz E., Friedman J.M., and Ntambi J.M.** (2003) Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem* 278: 33904-33911.
- Mollgard K., and Jacobsen M.** (1984) Immunohistochemical identification of some plasma proteins in human embryonic and fetal forebrain with particular reference to the development of the neocortex. *Brain Res* 315: 49-63.
- Molyneaux B.J., Arlotta P., Menezes J.R., and Macklis J.D.** (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8: 427-437.
- Myers R.H., Vonsattel J.P., Stevens T.J., Cupples L.A., Richardson E.P., Martin J.B., and Bird E.D.** (1988) Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38: 341-347.
- Nadal A., Fuentes E., Pastor J., and McNaughton P.A.** (1995) Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1426-1430.
- Nadarajah B., Brunstrom J.E., Grutzendler J., Wong R.O., and Pearlman A.L.** (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4: 143-150.
- Nadarajah B., and Parnavelas J.G.** (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3: 423-432.
- Nelson D.L., and Cox M.M.** *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 2000.
- Nery S., Fishell G., and Corbin J.G.** (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* 5: 1279-1287.
- Niquet J., Ben-Ari Y., and Represa A.** (1994) Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *J Neurocytol* 23: 641-656.
- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Dammerman R.S., and Kriegstein A.R.** (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720.
- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Wong W.S., Clinton B.K., and Kriegstein A.R.** (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22: 3161-3173.
- Ntambi J.** (1999) Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40: 1549-1558.
- Ntambi J.M., Buhrow S.A., Kaestner K.H., Christy R.J., Sibley E., Kelly T.J., and Lane M.D.** (1988) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 263: 17291-17300.
- Oestreicher A.B., De Graan P.N., Gispén W.H., Verhaagen J., and Schrama L.H.** (1997) B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog Neurobiol* 53: 627-686.
- Ohsugi M., Sato H., and Yamamura H.** (1992) Transfer of I-125-albumin from blood to brain in newborn rats and the effect of hyperbilirubinemia on the transfer. *Biol Neonate* 62: 47-54.
- Ohtsuka T., Asahi M., Matsuura N., Kikuchi H., Hojo M., Kageyama R., Ohkubo H., and Hoshimaru M.** (1998) Regulated expression of neurogenic basic helix-loop-helix transcription factors during differentiation of the immortalized neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons. *Cell Tissue Res* 293: 23-29.

- Olmsted J.B.** (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol* 2: 421-457.
- Olsson M., Bjorklund A., and Campbell K.** (1998) Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence. *Neuroscience* 84: 867-876.
- Oppenheim R.W.** (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.
- Oshino N., and Sato R.** (1972) The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 149: 369-377.
- Pappenheimer J.R., Renkin E.M., and Borrero L.M.** (1951) Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am J Physiol* 167: 13-46.
- Parent A., and Hazrati L.N.** (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 128-154.
- Perrone-Bizzozero N.I., Cansino V.V., and Kohn D.T.** (1993) Post-transcriptional regulation of GAP-43 gene expression in PC12 cells through protein kinase C-dependent stabilization of the messenger RNA. *J Cell Biol* 120: 1263-1270.
- Pert C.B., Kuhar M.J., and Snyder S.H.** (1976) Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 3729-3733.
- Petersen A., Mani K., and Brundin P.** (1999) Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp Neurol* 157: 1-18.
- Plateel M., Teissier E., and Cecchelli R.** (1997) Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* 68: 874-877.
- Pleasure S.J., Anderson S., Hevner R., Bagri A., Marin O., Lowenstein D.H., and Rubenstein J.L.** (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28: 727-740.
- Poirier J.** (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17: 525-530.
- Puttmann M., Krug H., von Ochsenstein E., and Kattermann R.** (1993) Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. *Clin Chem* 39: 825-832.
- Raff M.C.** (1989) Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* 243: 1450-1455.
- Rakic P.** (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227: 1054-1056.
- Rakic P.** (1978) Neuronal migration and contact guidance in primate telencephalon. *Postgrad Med J* 54: 25-40.
- Rakic P.** (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183: 425-427.
- Rakic P.** (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241: 170-176.
- Raper J., and Tessier-Lavigne M.** Growth cones and axon pathfinding. In: *Fundamental Neuroscience*, edited by Zimond M, Bloom F, Landis S, Roberts J, and Squire L. San Diego: Academic Press, 1999, p. 519-546.
- Reisert I., Han V., Hartwig S., Ahnert-Hilger G., and Pilgrim C.** (1989) Rapid maturation of synaptic functions of prenatal serotonergic neurons in short-term cultures: absence of sex differences and hormone effects. *Neurosci* 32: 133-139.
- Represa A., Niquet J., Charriaut-Marlangue C., and Ben-Ari Y.** (1993) Reactive astrocytes in the kainic acid damaged hippocampus have the phenotypic features of type-2 astrocytes. *J Neurocytol* 22: 299-310.
- Ribak C.E., Vaughn J.E., and Roberts E.** (1979) The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 187: 261-283.

- Rodríguez-Rodríguez R.A., Tabernero A., Velasco A., Lavado E.M., and Medina J.M.** (2004) The neurotrophic effect of oleic acid includes dendritic differentiation and the expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2. *J Neurochem* 88: 1041-1051.
- Rodríguez-Rodríguez R.A., Tabernero A., Velasco A., Lavado E.M., and Medina J.M.** (2004) The neurotrophic effect of oleic acid includes dendritic differentiation and the expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2. *J Neurochem* 88: 1041-1051.
- Sánchez C., Díaz-Nido J., and Avila J.** (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61: 133-168.
- Sanes J., and Jessell T.** Guía de los axones hacia sus objetivos. In: *Principios de Neurociencia*, edited by Kandel E, Schwartz J, and Jessell T. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2001, p. 1063-1086.
- Saunders N.R., and Møllgaard K.** (1984) Development of the blood-brain barrier. *J Dev Physiol* 6: 45-57.
- Schoenfeld T.A., and Obar R.A.** (1994) Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* 151: 67-137.
- Seaton P., Hunt A., and Patel A.J.** (1988) Production by astrocytes of a trophic factor for cholinergic neurons. *Biochem Soc Trans* 16: 296-297.
- Shanklin J., and Somerville C.** (1991) Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2510-2514.
- Shanklin J., Whittle E., and Fox B.G.** (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33: 12787-12794.
- Skene J.H.** (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 12: 127-156.
- Skene J.H.P., and Virág I.** (1989) Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *J Cell Biol* 108: 613-624.
- Somogyi P., and Klausberger T.** (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9-26.
- Spector A.A., and Fletcher J.E.** Transport of fatty acid in the circulation. In: *Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism*, edited by Dietschy JM, Gotto AM, and Ontko JA. Bethesda, Maryland: American Physiological Society, 1978, p. 229-249.
- Spoerri P.E.** (1988) Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. *Synapse* 2: 11-22.
- Stenman J., Toresson H., and Campbell K.** (2003) Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J Neurosci* 23: 167-174.
- Streit W.J.** Microglial cells. In: *Neuroglia*, edited by Kettenmann H, and Ransom BR. New York: Oxford University Press, 1995, p. 85-96.
- Strittmatter P., and Enoch H.G.** (1978) Purification of stearyl-CoA desaturase from liver. *Methods Enzymol* 52: 188-193.
- Strittmatter P., Spatz L., Corcoran D., Rogers M.J., Setlow B., and Redline R.** (1974) Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4565-4569.
- Tabernero A., Bolaños J.P., and Medina J.M.** (1993) Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem J* 294: 635-638.
- Tabernero A., Granda B., Medina A., Sanchez-Abarca L.I., Lavado E., and Medina J.M.** (2002a) Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate. *J Neurochem* 81: 881-891.

- Tabernero A., Lavado E.M., Granda B., Velasco A., and Medina J.M.** (2001) Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* 79: 606-616.
- Tabernero A., Medina A., Sanchez-Abarca L.I., Lavado E., and Medina J.M.** (1999a) The effect of albumin on astrocyte energy metabolism is not brought about through the control of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentrations but by free-fatty acid sequestration. *Glia* 25: 1-9.
- Tabernero A., Medina A., Sánchez-Abarca L.I., Lavado E., and Medina J.M.** (1999b) The effect of albumin on astrocyte energy metabolism is not brought about through the control of intercellular Ca<sup>2+</sup> concentrations but by free-fatty acid sequestration. *Glia* 25: 1-9.
- Tabernero A., Orfao A., and Medina J.M.** (1996) Astrocyte differentiation in primary culture followed by flow cytometry. *Neurosci Res* 24: 131-138.
- Tabernero A., Velasco A., Granda B., Lavado E.M., and Medina J.M.** (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: 4240-4246.
- Tabor D.E., Xia Y.R., Mehrabian M., Edwards P.A., and Luskis A.J.** (1998) A cluster of stearoyl CoA desaturase genes, *Scd1* and *Scd2*, on mouse chromosome 19. *Mamm Genome* 9: 341-342.
- Tan S.S., Kalloniatis M., Sturm K., Tam P.P., Reese B.E., and Faulkner-Jones B.** (1998) Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21: 295-304.
- Tanzi R.E., and Bertram L.** (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120: 545-555.
- Tepper J.M., Sharpe N.A., Koos T.Z., and Trent F.** (1998) Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev Neurosci* 20: 125-145.
- Thiede M.A., Ozols J., and Strittmatter P.** (1986) Construction and sequence of cDNA for rat liver stearoyl coenzyme A desaturase. *J Biol Chem* 261: 13230-13235.
- Thomson A.M., and Deuchars J.** (1994) Temporal and spatial properties of local circuits in neocortex. *Trends Neurosci* 17: 119-126.
- Thomson A.M., West D.C., Hahn J., and Deuchars J.** (1996) Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *J Physiol* 496 ( Pt 1): 81-102.
- Tildon J.T.** (1993) Differential effects of serum proteins on substrate oxidation by isolated synaptosomes and cultured brain astrocytes. *Dev Neurosci* 15: 226-232.
- Tojo A., and Endou H.** (1992) Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol* 263: F601-606.
- Trojan J., and Uriel J.** (1979) [Intracellular localization of alpha-fetoprotein and serum albumin in the central nervous system of the rat during fetal and postnatal development]. *C R Seances Acad Sci D* 289: 1157-1160.
- Tsunoda S., Sierralta J., and Zuker C.S.** (1998) Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes. *Curr Opin Genet Dev* 8: 419-422.
- van der Kooy D., and Fishell G.** (1987) Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments. *Brain Res* 401: 155-161.
- Van Eden C.G., Mrzljak L., Voorn P., and Uylings H.B.** (1989) Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 289: 213-227.
- Van Hooff C.O., De Graan P.N., Oestreicher A.B., and Gispen W.H.** (1988) B-50 phosphorylation and polyphosphoinositide metabolism in nerve growth cone membranes. *J Neurosci* 8: 1789-1795.

- Varon S., Skaper S.D., Facci L., Rudge J.S., and Manthorpe M.** Trophic and metabolic couplings between astroglia and neurons. In: *Glial-Neuronal Communication in Development and Regeneration*, edited by Althans HH, and Seifert W. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1987, p. 493-504.
- Velasco A., Tabernero A., and Medina J.M.** (2003) Role of oleic acid as a neurotrophic factor is supported in vivo by the expression of GAP-43 subsequent to the activation of SREBP-1 and the up-regulation of stearoyl-CoA desaturase during postnatal development of the brain. *Brain Res* 977: 103-111.
- Ventimiglia R., Mather P.E., Jones B.E., and Lindsay R.M.** (1995) The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 7: 213-222.
- Vernadakis A.** (1988) Neuron-glia interrelations. *Int Rev Neurobiol* 30: 149-224.
- Vicario C., and Medina J.M.** (1992) Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period. *J Neurochem* 58: 32-40.
- Vicario C., Tabernero A., and Medina J.M.** (1993) Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture. *Pediatr Res* 34: 709-715.
- Volpe J.J., and Marasa J.C.** (1976) Regulation of palmitic acid synthesis in cultured glial cells: effects of glucocorticoid on fatty acid synthetase, acetyl-CoA carboxylase, fatty acid and sterol synthesis. *J Neurochem* 27: 841-845.
- Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J., Ferrante R.J., Bird E.D., and Richardson E.P., Jr.** (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 559-577.
- Wichterle H., Garcia-Verdugo J.M., Herrera D.G., and Alvarez-Buylla A.** (1999) Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 2: 461-466.
- Wichterle H., Turnbull D.H., Nery S., Fishell G., and Alvarez-Buylla A.** (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128: 3759-3771.
- Woolf N.J.** (1998) A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol* 55: 59-77.
- Yamamoto S., Kitadai Y., Tsuchida A., Sasaki T., Matsubara K., and Kajiyama G.** (2000) Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human gallbladder lesions. *Eur J Cancer* 36: 257-263.
- Zeidman R., Lofgren B., Pahlman S., and Larsson C.** (1999) PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 145: 713-726.
- Zhang S., Yang Y., and Shi Y.** (2005) Characterization of human SCD2, an oligomeric desaturase with improved stability and enzyme activity by cross-linking in intact cells. *Biochem J* 388: 135-142.
- Zheng Y., Prouty S.M., Harmon A., Sundberg J.P., Stenn K.S., and Parimoo S.** (2001) Scd3-a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics* 71: 182-191.
- Zlokovic B.V., Martel C.L., Matsubara E., McComb J.G., Zheng G., McCluskey R.T., Frangione B., and Ghiso J.** (1996) Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4229-4234.
- Zoellner H., Hofler M., Beckmann R., Hufnagl P., Vanyek E., Bielek E., Wojta J., Fabry A., Lockie S., and Binder B.R.** (1996) Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. *J Cell Sci* 109 ( Pt 10): 2571-2580.

**Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D., Leavitt B.R., Goffredo D., Conti L., MacDonald M.E., Friedlander R.M., Silani V., Hayden M.R., Timmusk T., Sipione S., and Cattaneo E.** (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293: 493-498.