

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

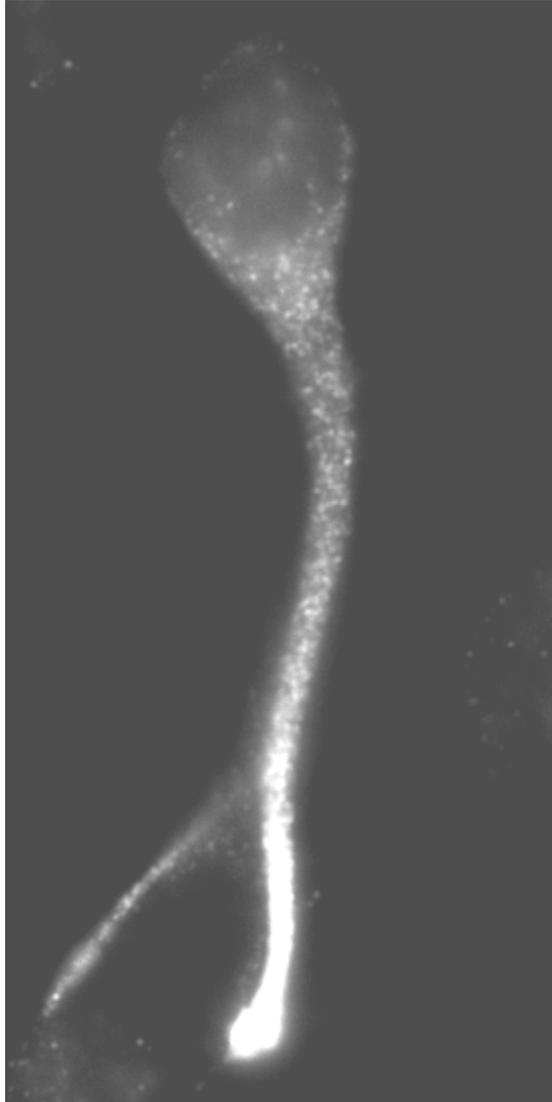
AUTORIZAN

La presentación de la Tesis Doctoral: “Efectos del ácido oleico en la migración neuronal y en la formación de sinapsis”, realizado bajo su dirección por la Licenciada en Bioquímica D^a. M^a de la Vega Tello Hernández en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, firman el documento en Salamanca, a 18 de Junio de 2008.

Fdo. José M^a. Medina Jiménez

Fdo. Aranzazu Tabernero Urbieta



No entiendes realmente algo a no ser que seas capaz de explicárselo a tu abuela.

Albert Einstein

Al Prof. Dr. D. José María Medina, director de este trabajo, que confió en una “pequeña” “cuasi” licenciada en Bioquímica para llevar a cabo este trabajo, la primera oportunidad es muy importante y él me la dio.

A la Prof^a. Dra. D^a. Arantxa Tabernero, codirectora de este trabajo, que siempre me tendió su mano y me mostró el camino del optimismo para continuar con el trabajo hacia delante. Por su eterna sonsira, que nos ayuda a todos a que ésto sea mucho más fácil.

A la Prof^a. Dra. D^a. Josefa Martín Barrientos, por ayudarme en todo lo que he necesitado, incluida la redacción de esta memoria, y por sus charlas y comentarios que han hecho que todo este periodo de tiempo haya sido mucho más entretenido y ameno. Y por preocuparse por mí en todo momento.

Al resto de los profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, en especial a D. Juan Pedro Bolaños, D^a Ángeles Almeida, D. Emilio Fernández, D^a María Ángeles Serrano y D^a Victoria García, todos los momentos pasados con ellos están llenos de buenos recuerdos, y me han aconsejado siempre que lo he necesitado. Al Prof. Dr. D. José Juan García Marín, del Departamento de Fisiología Animal, por su ayuda en el diseño de los “primers” para la PCR cuantitativa, y por la otra ayuda prestada en la “pequeña inundación” del departamento.

A Tomy, no solo por su ayuda técnica, sino también por saber escucharme, aconsejarme y ayudarme en todo.

Al personal del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (S.E.A.), no solo por el cuidado de “nuestras” ratas, sino por haber sido tan considerados conmigo a la hora de sacrificarlas y “ahorrarme” esa desagradable tarea.

A Javier Escudero, secretario del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por su buen humor y su eficiencia en todo lo referente a la secretaría.

A mis compañeros de laboratorio, antes el 129 del Edificio Interdepartamental, ahora el laboratorio 15 del INCYL, tanto a las que mostraron una inmensa paciencia cuando era una “pequeña infante”, Ana Velasco, Rosita y Susana; como a todos los que han ido llegando después, Teresa, Lourdes, Sandra, André, José Carlos, Alex y Ester, y en especial a Erica y Ángel, que tanto me han apoyado y animado estos últimos y

estresantes meses. Con todos he pasado momentos que nunca olvidaré, y que recordaré con cariño, los congresos y demás eventos científico-sociales han sido mucho mejores en vuestra compañía. Sin olvidar esa estresante mudanza, el “museo” será algo que con el tiempo haya que hacer. No quiero olvidarme tampoco de todos los que han pasado por aquí, pero llegaron a estar menos tiempo, como Mayka, Juampi, y todos los estudiantes de Erasmus, pues de todos ellos he aprendido algo.

A todos los “habitantes” del 102, con los que tanto compartimos, y con los que tan buenos momentos he pasado. Ahora están un poquito más lejos que antes, pero seguro que la comunicación sigue entre ambos laboratorios.

A mis amigas de toda la vida, las que siempre están ahí, en lo bueno y sobre todo, en lo malo, que es lo que cuenta, las que realmente saben como soy, y me apoyan y quieren sin más. A mis amigas de la carrera, por esas cenas que tanto nos gustan y que nos ayudan a poder seguir viéndonos a pesar de los años, los trabajos, y las dificultades de la vida en general, vosotras sabéis lo que significa para mí esta tesis mejor que nadie. Y a tod@s l@s que aparecieron después en mi vida, y que tan preocupados han estado por “mis neuronas”, y tanto interés han mostrado, siempre, para entender que era exactamente lo que hacía, y para qué servía. No sé si alguna vez quedó claro, pero la intención es lo que cuenta.

A Ángel, por estos 3 años y pico, que suena a condena, pero, como decían “Los Rodríguez”, han sido una “*Dulce condena*”. Por saber hacerme reír en cualquier momento, incluso en los difíciles, que es cuando más lo necesito. Y por su carácter tranquilo y sereno, que tanto contrasta con el mío, y que en el fondo me complementa. Ya sabes “*Los polos opuestos...*”.

A mis PADRES, por todo el sacrificio que siempre han hecho por mí y por el cuál nunca me han pedido nada a cambio. Sin vosotros no sería nada y a vosotros os lo debo todo. A mi HERMANO, capaz de quererme a pesar de mi temperamento y además, demostrármelo; y a mis ABUELOS, que siempre están orgullosos de mí. Y al resto de mi FAMILIA, incluido al pequeño Sergio, el último “*tendero*” en llegar, por vuestro apoyo y cariño.

ABREVIATURAS

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropinoico
AMPS: Persulfato amónico
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAMKII: Proteína Quinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CNTF: Factor neurotrófico ciliar
CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP
DAPI: 4',6-diamino-2-fenil-indol
DCLK: Quinasa similar a la Doblecortina
DCX: Doblecortina
DEPC: Dietilpirocarbonato
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA: ácido desoxirribonucleico
DTT: 1,4-Ditioeritritol
EBSS: Solución de Earle
EDTA: ácido etilen diamino tetraacético
EGTA: Ácido etilenglicol-bis-(b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético
EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
EPSP: Potencial postsináptico
FITC: Isocianato de Fluoresceína
FCS: Suero fetal de ternero
FGF: Factor de Crecimiento Derivado de los Fibroblastos
GAP-43: Proteína Asociada al Crecimiento-43
GAPDH: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GAST: Transportador Glial de Glutamato y Aspartato
GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía
GGF: Factor de Crecimiento Glial
GLT: Transportador Glial de Glutamato
mGluR: Receptor metabotrópicos acoplados a proteína G
GluR-2/3: Isoformas 2 y 3 del Receptor de Glutamato
bHLH: Factores de Hélice-Bucle-Hélice básicos
IGF: Factor de crecimiento insulínico
kDa: Kilodaltons
MAGUKs: Guanilato ciclasa asociada a membrana
MAPs: Proteínas Asociadas a los Microtúbulos
MAP-2: Proteína Asociada a los Microtúbulos-2
MODY-6: Diabetes juvenil tipo-6
N-CAM: Molécula de Adherencia de las Células Nerviosas
NCBI: National Center of Biotechnology Information
NGF: Factor de Crecimiento Nervioso
ngn: Neurogenina

NMDA: N-metil-D-aspartato
NSF: Factor sensible a N-etilmaleimida
dNTP: Desoxinucleótidos fosfatos
NT-3: Neurotrofina-3
NT-4/5: Neurotrofina-4/5
NT-6: Neurotrofina-6
NT-7: Neurotrofina-7
PACAP: Polipéptido activador de la adenilato ciclasa
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ: dominio en dedos de zinc
PI3K: Fosfatidil inositol-3'-quinasa
PKA: Proteína Quinasa A
PKC: Proteína Quinasa C
PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PSD: Densidad Postsináptica
RNA: Ácido Ribonucleico
mRNA: RNA mensajero
RT-PCR: Reacción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa
SAP-90: Proteína asociada a la sinapsis-90
SCD: Estearil-CoA-desaturasa
SDS: Docecil sulfato sódico
SGZ: Zona subgranular
SNARE: Receptor del Factor de la Proteína de Fusión Sensible a N-etilmaleimida soluble
SNAPs: Proteínas asociadas al NSF
SNC: Sistema Nervioso Central
SNP: Sistema Nervioso Periférico
TAE: Tampón Tris Acetato-EDTA
TBS: Tampón Tris salino
TEMED: N,N,N',N',-tetrametilendiamino
TGF β : Factor de crecimiento β
Trks: Receptores tirosina quinasa
TrkA: Receptor tirosina quinasa A
TrkB: Receptor tirosina quinasa B
TrkC: Receptor tirosina quinasa C
dUTP: Desoxiuridín fosfato

INDICE

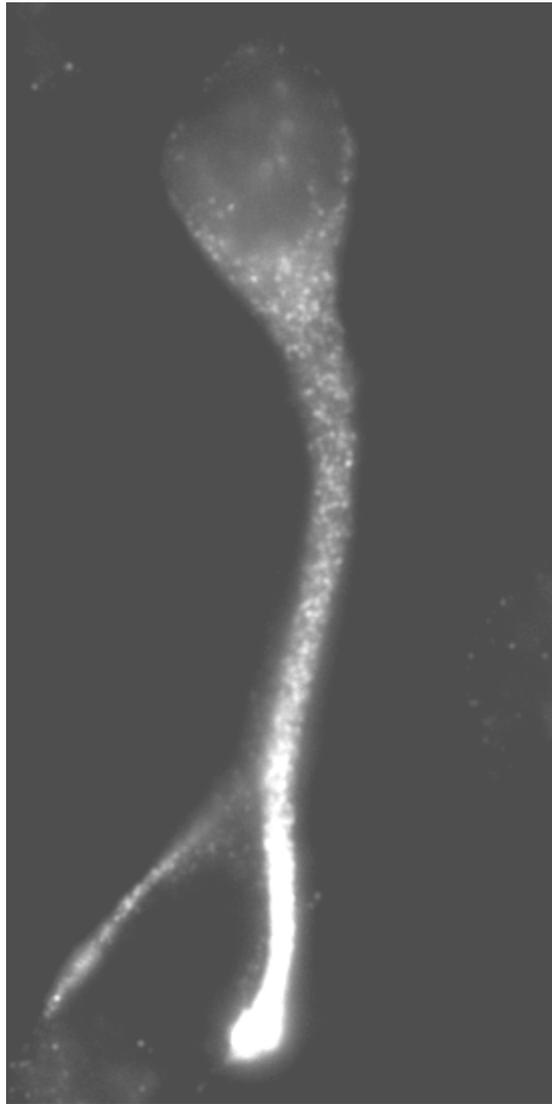
1 INTRODUCCIÓN

1.1 DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	1
1.1.1 Desarrollo neuronal	1
1.1.1.1 Proliferación neuronal	2
1.1.1.2 Migración celular	4
1.1.1.2.1 Doblecortina	6
1.1.1.3 Agregación neuronal	9
1.1.1.4 Diferenciación neuronal	9
1.1.1.4.1 Proteínas asociadas a los microtúbulos, MAPs ..	11
1.1.1.4.2 Proteína asociada al crecimiento, GAP-43	13
1.1.1.5 Sinaptogénesis	15
1.1.1.5.1 Papel del colesterol en la sinaptogénesis	17
1.1.1.5.2 Estructura y función de las proteínas SNARE ..	17
1.1.1.5.3 Sinaptotagminas	18
a) Glicosilación y palmitoilación de las	
sinaptotagminas	19
b) Interacciones de las sinaptotagminas	20
c) Función de las sinaptotagminas	20
1.1.1.5.4 Papel del glutamato en la sinapsis	20
a) Liberación del glutamato	21
b) Receptores ionotrópicos	21
c) Receptores metabotrópicos (mGluR)	22
d) Transportadores de glutamato	22
1.1.1.5.5 Densidad postsináptica (PSD)	22
1.1.1.5.6 Sinaptofisina	23
1.1.1.5.7 Sinaptobrevina	24
1.1.1.6 Muerte neuronal	24
1.2 FACTORES NEUROTRÓFICOS	25
1.2.1 Neurotrofinas	25
1.2.1.1 NGF	26
1.2.1.2 BDNF	27
1.2.1.3 NT-3	27
1.2.1.4 NT-4/5	28
1.2.2 Receptores de las neurotrofinas	28
1.2.3 El ácido oleico	31
1.2.3.1 Efecto del ácido oleico sobre la expresión	
de la MAP-2	33
1.2.3.2 Efecto del ácido oleico sobre la expresión	

de la GAP-43	33
1.2.3.3 Mecanismos de acción del ácido oleico en la diferenciación neuronal	34
1.2.4 Otros factores neurotróficos	35
1.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PRONEURALES Y NEURALES	36
a) Estructura y diversidad de los factores de transcripción bHLH	36
b) Familia NeuroD	38
2 PLAN DE TRABAJO	43
3 MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1 MATERIAL	49
3.1.1 Especie ensayada y condiciones del animalario	49
3.1.2 Medios instrumentales	49
3.1.3 Productos	51
3.1.3.1 Productos utilizados para la preparación y crecimiento de los cultivos celulares	51
3.1.3.2 Productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas específicas	52
3.1.3.3 Productos utilizados en los experimentos para la detección de mRNA	54
3.1.3.4 Otros productos	54
3.2 MÉTODOS	55
3.2.1 Preparación de cultivos celulares	55
3.2.1.1 Composición de las disoluciones	55
3.2.1.2 Preparación de la solución de albúmina	56
3.2.1.3 Preparación del cultivo primario de neuronas	56
3.2.2 Tratamientos celulares	57
3.2.3 Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo <i>western</i>	57
I. Extracción de proteínas	58
II. Cuantificación de proteínas	58
III. Preparación de los geles	58
IV. Preparación de las muestras para electroforesis	59
V. Electroforesis de proteínas	59

VI. Electrotransferencia	59
VII. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana	60
VIII. Inmunodetección	60
3.2.4 Localización de las proteínas celulares mediante inmunocitoquímica	61
3.2.5 Análisis del mRNA por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y no cuantitativa	62
I. Extracción del RNA total de los cultivos y de muestras de cultivo neuronales	66
II. Transcripción inversa del RNA total obtenido	67
III. Reacción en cadena de la polimerasa no cuantitativa	68
IV. Cuantificación del cDNA	69
V. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa .	70
4 RESULTADOS	71
4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO OLEICO	73
4.1.1 Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión de los receptores de las neurotrofinas, receptores tirosina kinasa (Trks)	73
4.1.2 Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2	76
4.1.3 Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión del factor de transcripción Nex-1	79
4.1.4 Estudio del efecto de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2	80
4.2 EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO EN LA MIGRACIÓN NEURONAL	83
4.3 EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO EN LA SINAPTOGÉNESIS	85
4.3.1 Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión y localización de la sinaptotagmina I	86
4.3.2 Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión y localización del receptor de glutamato, isoformas 2 y 3, GluR-2/3	88

4.3.3	Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión y localización de la densidad postsináptica, PSD-95	90
4.3.4	Estudio del efecto del ácido oleico en la formación de sinapsis	91
4.4	EFFECTO DE LAS NEUROTROFINAS SOBRE LA MIGRACIÓN NEURONAL INDUCIDA POR EL ÁCIDO OLEICO	93
4.5	EFFECTO DE LAS NEUROTROFINAS SOBRE LA SINAPTOGÉNESIS PROMOVIDA POR EL ÁCIDO OLEICO	98
4.5.1	Estudio del efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión y localización de la sinaptotagmina I	98
4.5.2	Estudio del efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión y localización del receptor de glutamato, isoformas 2 y 3, GluR-2/3	103
4.5.3	Estudio del efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico en la formación de sinapsis	108
5	DISCUSIÓN	113
5.1	MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO OLEICO	115
5.2	EFFECTO DEL ÁCIDO OLEICO SOBRE LA MIGRACIÓN Y LA FORMACIÓN DE SINAPSIS	117
5.3	INFLUENCIA DE LAS NEUROTROFINAS SOBRE LOS EFECTOS DEL ÁCIDO OLEICO	119
6	CONCLUSIONES	123
7	BIBLIOGRAFÍA	127



1. INTRODUCCIÓN

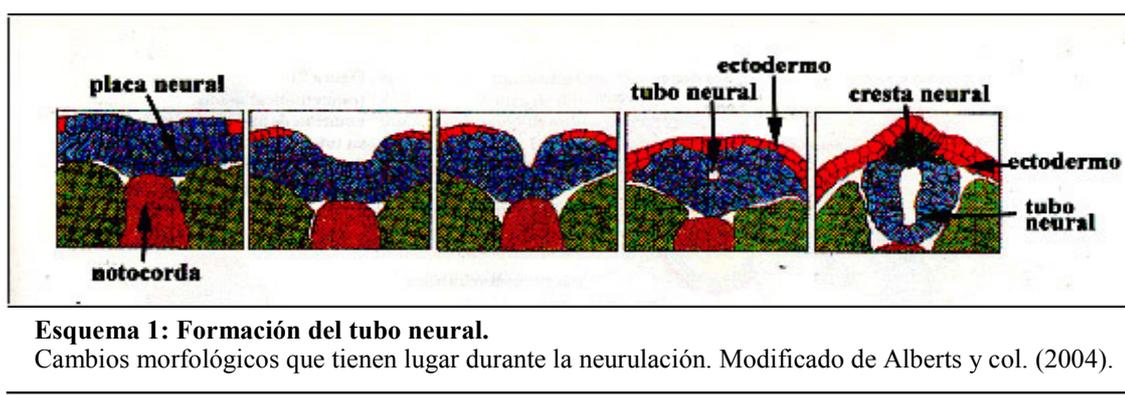
No tenemos que poner límites a la ciencia, sino al uso que hacemos de ella.

Anónimo

1.1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central, SNC, es una entidad anatómica, protegida eficazmente de los traumas externos mediante formaciones óseas como son: el cráneo y la columna vertebral. Está encargado de recibir y transmitir impulsos, coordinando de esta forma las diferentes actividades del organismo.

El sistema nervioso se origina por una modificación y sucesiva evolución del ectodermo del embrión, mediante un proceso conocido como neurulación. La invaginación de la blástula crea la placa neural que, al cerrarse sobre sí misma, formará el tubo neural, que posteriormente dará lugar al encéfalo y a la médula espinal. En la línea donde el tubo neural se despegue del ectodermo un cierto número de células migran por el exterior del tubo neural. Éstas son las células de la cresta neural, que formarán el sistema nervioso periférico (Alberts, 2004) (ver esquema 1).



Durante el desarrollo, el neuroepitelio, es decir la zona modificada del ectodermo que forma el tubo neural, está compuesto por una sola capa de células denominadas neuroblastos. Una vez acabada la formación de los neuroblastos se forma otro tipo celular, los glioblastos. Los neuroblastos dan origen a las neuronas funcionales y maduras. Los glioblastos dan dos tipos de células inmaduras: los astroblastos, que se convierten en astrocitos, y los oligodendroblastos, que dan lugar a los oligodendrocitos.

1.1.1. Desarrollo neuronal

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):

- Inducción de la placa neural. Proliferación neuronal. Organogénesis embrionaria del sistema nervioso central (SNC) desde la concepción. Multiplicación y posterior proliferación de neuroblastos. Así, mientras se forma el tubo neural el neuroepitelio es mitóticamente activo, por lo que se van formando neuroblastos que se acumulan en la superficie subventricular del tubo neural.
- Migración neuronal. Migración y diferenciación de neuroblastos con crecimiento de los axones. Así, las neuronas inmaduras emigran de la zona ventricular del tubo neural para formar la placa cortical que se convierte en la sustancia gris de la corteza cerebral (Jessell y Sanes, 2001b).
- Agregación neuronal. Formación de conexiones interneuronales con sinapsis y síntesis de neurotransmisores. Así, al llegar a su localización definitiva las neuronas tienden a agregarse formando las diferentes capas de la corteza cerebral o bien grupos nucleares.
- Sinaptogénesis. En el estado adulto un proceso tardío de la diferenciación axonal.
- Muerte neuronal. Eliminación de algunas conexiones formadas inicialmente por necrosis o apoptosis.

En cuanto al desarrollo temporal del cerebro humano se piensa que sucede de la siguiente manera: inducción neuronal (3-4 semanas de gestación); proliferación de neuroblastos (8-25 semanas de gestación); migración neuronal y agregación selectiva neuronal (8-34 semanas de gestación); diferenciación neuronal, formación de vías específicas de conexión (5 semanas de gestación hasta los 4 años de vida); muerte neuronal y eliminación de sinapsis selectiva en la corteza (2-16 años), seguida de mielinización (25 semanas de gestación-20 años) (Cowan, 1987; Herschkowitz, 1988). Considerando que el cerebro humano contiene del orden de cien mil millones de neuronas y que prácticamente no se añaden neuronas después del nacimiento, puede calcularse que las neuronas deben generarse en el cerebro a un ritmo promedio de más de 250.000/min (Cowan, 1979).

1.1.1.1. Proliferación neuronal

Durante la formación del tubo neural el neuroepitelio es mitóticamente activo, de modo que empiezan a formarse neuroblastos que se acumulan en la superficie ventricular del tubo neural. El momento del desarrollo en el que comienzan a aparecer las neuronas es diferente en cada especie. En el hombre está comprendido entre los días 40 y 125 de la gestación (Rakic,

1978), mientras que en la rata comienza el día 14 y finaliza el día 20 de gestación (Miller, 1985).

Comparativamente, la neurogénesis en la rata tiene lugar en un periodo de la gestación posterior al que se produce en el hombre. Las implicaciones de esta neurogénesis temprana en el hombre no se conocen, pero existe la posibilidad de que las neuronas necesiten un periodo 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 periodo 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).

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

La neurogénesis parece estar regulada negativamente por el factor de crecimiento glial (GGF), una proteína codificada por el gen neurregulina (Jessell y Sanes, 2001a). También el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) demostró ser un factor antimitogénico (Dicicco-Bloom y col., 1998). También se ha descrito que las neurotrofinas, así como sus receptores, son esenciales para la proliferación de precursores neuronales (Bartkowska y col., 2007).

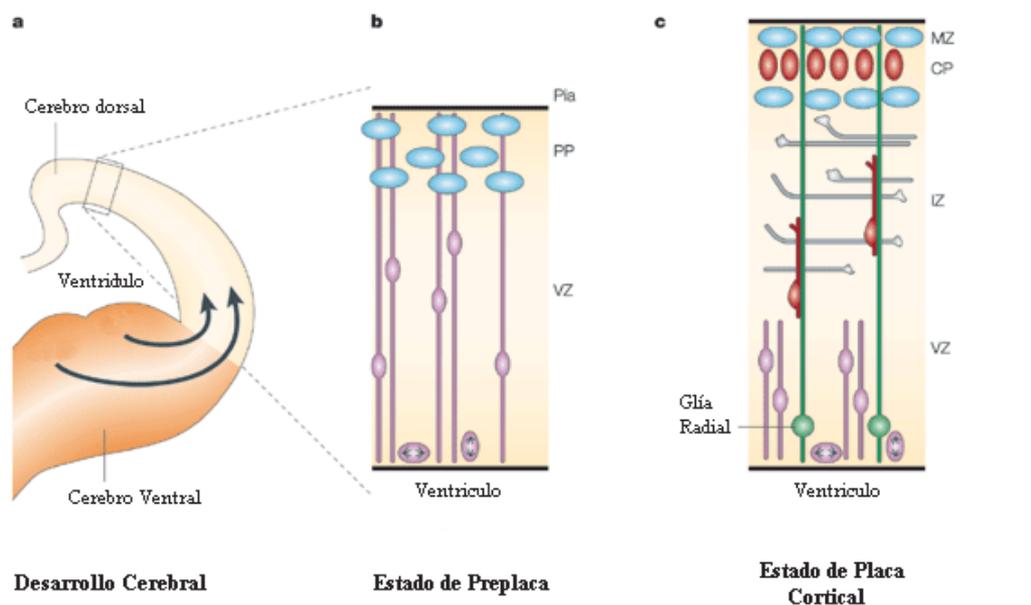
1.1.1.2. Migración celular

Una vez finalizada la proliferación celular, las neuronas inmaduras emigran de la zona ventricular del tubo neural para formar la placa cortical que, finalmente, se convierte en la sustancia gris de la corteza cerebral (Jessell y Sanes, 2001b). Al llegar a la corteza cerebral las neuronas se colocan formando capas. Las células que se generan más tempranamente ocuparán capas corticales más profundas, mientras que las células formadas más tardíamente ocuparán posiciones superficiales (Caviness, 1989). Para migrar desde la zona proliferativa hasta la corteza cerebral las neuronas se guían por células gliales dispuestas radialmente (Rakic, 1972). Al final de la gestación estas células gliales radiales se transforman en astrocitos fibrosos (Schmechel y Rakic, 1979) o, incluso, en neuronas (Hartfuss y col., 2001; Noctor y col., 2001). (ver esquema 2).

La migración neuronal en la corteza cerebral empieza cuando la primera cohorte de neuronas postmitóticas sale de la zona ventricular a formar la capa plexiforme primordial o preplaca. Esta zona generada tempranamente se divide por la llegada de neuronas a la placa cortical, dentro de la zona marginal y una subplaca más profunda. Estudios de incorporación de timidina tritiada han mostrado que las láminas II-VI de la corteza cerebral son generadas en una secuencia “al revés”, es decir, que las neuronas que son generadas más tempranamente residen en las capas profundas, mientras que las células más tardías migran atravesando placas ya existentes hacia la superficie de esas placas. Consecuentemente, la zona marginal (lámina I) y la subplaca contienen las neuronas generadas en primer lugar (Nadarajah y Parnavelas, 2002) (véase Esquema 2).

Algunos factores, tales como las moléculas de adherencia de la célula nerviosa (N-CAM), así como las N-caderinas, pueden participar en el reconocimiento entre las neuronas y las células gliales (Edelman, 1983; Takeichi, 1988). De hecho, Hatten y Mason (1986) realizaron experimentos, en cultivos celulares, que muestran el fenómeno de migración de las neuronas a lo largo de las células gliales Bergman en el

cerebelo. Sus resultados indican que se establecen puntos de contacto entre las neuronas y las células de la glía y que existen moléculas de naturaleza glicoproteica que regulan el proceso de migración neuronal.



Esquema 2: Desarrollo de la corteza cerebral.

Diagrama esquemático de una sección transversal de la corteza cerebral de roedores. La zona ventricular (VZ) contiene las células progenitoras de las neuronas y de la glía. Las primeras neuronas en generarse se establecen en la preplaca (PP). Los axones de estas neuronas, junto con axones en crecimiento desde el tálamo, establecen la zona intermedia (IZ). Las neuronas corticales generadas formarán una serie de seis capas que se agrupan formando la placa cortical (CP), que dividirán la preplaca en la zona marginal (MZ), que será la futura capa 1 de la corteza cerebral y en una subplaca de neuronas transitorias que yace bajo la placa cortical. Modificado de Nadarajah y Parnavelas (2002).

La migración neuronal puede seguir otras vías además de las relacionadas con las células gliales radiales (Austin y Cepko, 1990; Walsh y Cepko, 1992). En este sentido, se ha descrito que las moléculas como el GABA pueden actuar como quimioatrayentes para las neuronas embrionarias de la corteza cerebral (Behar y col., 1996).

Se han identificado dos modelos distintos de migración neuronal: migración radial y migración tangencial (Nadarajah y Parnavelas, 2002). La migración radial es el movimiento neuronal más ampliamente estudiado, y es la principal forma de migración en el desarrollo de la corteza cerebral. La primera característica de la migración radial es que las neuronas, generadas en las zonas proliferativas, se mueven a la superficie del cerebro a través de fibras gliales orientadas radialmente que cruzan todo el parénquima. Este movimiento ha sido también calificado como migración gliofilica, por las interacciones entre las neuronas migrantes y

los sustratos gliales. En la migración tangencial, la cuál es de naturaleza neurofílica, las neuronas se mueven paralelas a la superficie del cerebro a lo largo de axones de otras neuronas. Un ejemplo de este modelo de migración es el movimiento de interneuronas corticales que migran desde su origen en el telencéfalo ventral a la corteza cerebral en desarrollo.

Se ha demostrado que son requeridos tres pasos para el movimiento punto-punto de cualquier célula. Así, el proceso fundamental de extensión para explorar en el ambiente y encontrar sustancias atrayentes o repulsivas, la nucleoquinesis o movimiento del núcleo hacia el primer proceso y la retracción del resto de la célula. Recientemente, se ha descrito que el proceso de extensión está mediado por la polimerización y reorganización de microfilamentos de actinina, los cuales están controlados por GTPasas de la familia RHO. Durante la nucleoquinesis, el núcleo se mueve por el interior de la célula por un mecanismo en el que están involucrados los microtúbulos y sus proteínas motor asociadas (Nadarajah y Parnavelas, 2002).

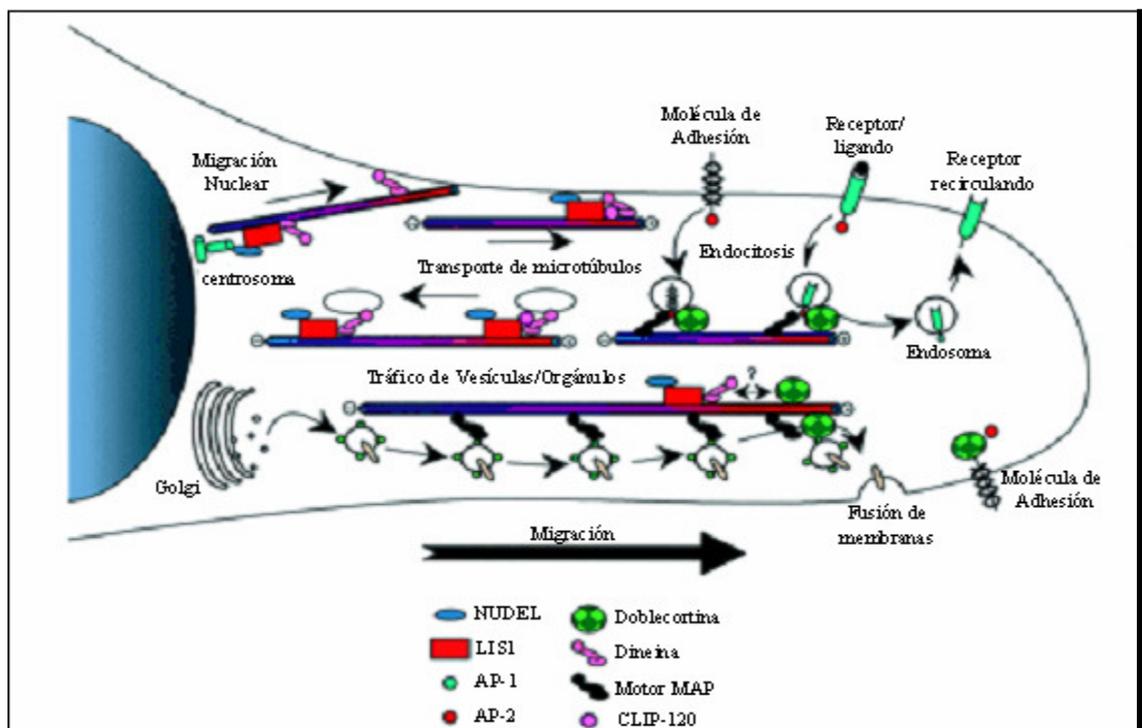
1.1.1.2.1. Doblecortina

Los microtúbulos están implicados en muchos procesos celulares, tales como la mitosis, la movilidad y el transporte de orgánulos. El esqueleto de los microtúbulos son los heterodímeros de α y β tubulina, los cuales se asocian lateral y longitudinalmente para formar microtúbulos cilíndricos y de forma polar. Se ha descrito que las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) son las encargadas del control y del dinamismo de los microtúbulos. La doblecortina (DCX) es un miembro bien descrito de la familia de las MAPs (Moore y col., 2006). Está demostrado que los cambios en los estados de polimerización de los microtúbulos afectan a la expresión de genes a través de diferentes rutas de señales (Rosette y Karin, 1995).

La DCX es una proteína neuronal de 40 kDa, encargada de la estabilización de los microtúbulos, específicamente expresada en el proceso de migración neuronal. Además, también parece modular la comunicación célula a célula, lo que sugiere que DCX actúa tanto en células autónomas, como en células no autónomas. Es una proteína que está centralmente involucrada en la organización del citoesqueleto de los microtúbulos y, por lo tanto, con una función esencial tanto en migración como en diferenciación (Moore y col., 2006). En el adulto, la DCX se expresa en la zona subventricular por los neuroblastos que migran al bulbo olfatorio (Couillard-Despres y col., 2005; Walker y col., 2007), así como en el giro dentado y en la corteza

piriforme, regiones donde la migración es baja, lo que indica que la proteína no está sólo relacionada con la migración y puede tener más funciones (Ocbina y col., 2006). La alta expresión de DCX ocurre durante los estadios tempranos de la corticogénesis, concretamente en el día embrionario 14 (E14); después los niveles decaen hasta el día del nacimiento (Walker y col., 2007). La expresión de DCX está regulada después de la segunda semana bajando su expresión en el momento en el que aparece el marcador de neuronas maduras NeuN (Couillard-Despres y col., 2005).

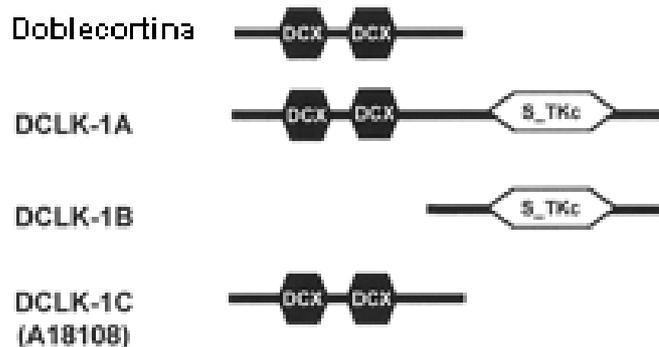
La DCX está implicada en el tráfico de vesículas, dada su interacción con los complejos adaptadores AP1 y AP2, implicados en el transporte de endosomas y lisosomas mediado por clatrin. Se requiere específicamente en el extremo de los procesos de crecimiento neuronal, donde juega un papel en la extensión de las membranas y/o en la regulación de ciertas moléculas de adhesión implicadas en la orientación celular y axonal (ver esquema 3) (Friocourt y col., 2003).



Esquema 3: Mecanismo de actuación de la DCX.

La DCX interactúa directamente con los microtúbulos, en los extremos de las neuritas en neuronas diferenciadas y en el extremo de los procesos punteros de neuronas migratorias tangencialmente. Se sabe también que la DCX interactúa con el complejo AP-1 y promueve la disociación de las vesículas transportadas por los microtúbulos. La DCX también interactúa con el complejo AP-2, lo que sugiere que podría jugar un papel en la regulación de la endocitosis y en el reciclado de moléculas de adhesión o de receptores. Modificado de (Friocourt y col., 2003).

El gen *DCX*, localizado en el cromosoma X, contiene 9 exones, de los cuales los 3 del extremo 5' se usan alternativamente. El promotor y las regiones reguladoras del gen no están todavía bien caracterizados. Así, algunos autores sugieren que pueden existir variantes por *splicing* alternativo de *DCX*, expresadas en el cerebro (Ocbina y col., 2006). La estructura secundaria pronosticada sugiere un dominio de unión a los microtúbulos, denominado dominio doblecortina (DCX), muy conservado evolutivamente en otras proteínas específicas del cerebro (Friocourt y col., 2003). Este dominio está localizado en el extremo amino terminal y consiste en 2 repeticiones de 80 residuos (ver esquema 4). Se observan muchas mutaciones sin sentido en estas regiones conservadas. Su expresión y fosforilación está regulada durante el desarrollo cerebral (Shmueli y col., 2001).



Esquema 4:

Las proteínas DCLK, de las cuales existen varias isoformas, muestran una homología muy fuerte con la *DCX*. 2 repeticiones del denominado motivo *DCX* forman el dominio de unión a los microtúbulos de la proteína *DCX* y unas repeticiones similares están presentes en varias de las isoformas de las *DCLK*. Además, muchas isoformas de las *DCLK* contienen un dominio quinasa (S-TKc). La isoforma *DCLK-1C* muestra un 75% de aminoácidos idénticos y, al menos, una estructura secundaria predefinida idéntica a la proteína *DCX*. Modificado de (Friocourt y col., 2003).

Mutaciones en el gen *DCX* causan lisencefalia en hombres, en los varones con un fenotipo menos severo (heterotopía en banda subcortical) y en las mujeres heterocigóticas (Gleeson y col., 1999; Ocbina y col., 2006). La lisencefalia es una enfermedad producida por malformaciones corticales, caracterizada por la desorganización de las capas corticales, anomalías en las circunvoluciones menores e importantes deficiencias cognitivas y epilepsia (Friocourt y col., 2003).

La quinasa similar a la *DCX* (“*DCX*-like kinase”, *DCLK*) es una fosfoproteína con una fuerte homología con la *DCX*. Es también muy importante para el desarrollo neuronal y actúa en coordinación con la *DCX* para asegurar la correcta división celular y asegurar precursores neuronales

y células migratorias eficientes (Moore y col., 2006). Varias isoformas de la DCLK tienen un patrón de expresión similar a DCX durante el desarrollo embrionario, incluyendo la expresión en neuronas corticales migratorias. Además, algunas de estas isoformas contienen un dominio de unión a los microtúbulos, homólogo al de DCX, sugiriendo una función similar, o, quizás, funciones conectadas (ver esquema 4) (Friocourt y col., 2003).

En experimentos realizados en células PC12, se comprobó que la DCX estabiliza los microtúbulos e inhibe el crecimiento de las neuritas inducido por el factor de crecimiento nervioso (NGF). Sin embargo, la longitud de las neuritas es mayor cuando la diferenciación se induce por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y forskolina o por dibutilil-cAMP. También los niveles de calcio intracelular disminuyen en las células que sobreexpresan DCX. La transcripción mediada por CREB y los niveles de la proteína fosfoCREB también disminuyen en las células transfectadas con DCX. Todo esto sugiere que la sobreexpresión de DCX puede afectar al estado transcripcional de la célula (Shmueli y col., 2001).

1.1.1.3. Agregación neuronal

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

1.1.1.4. Diferenciación neuronal

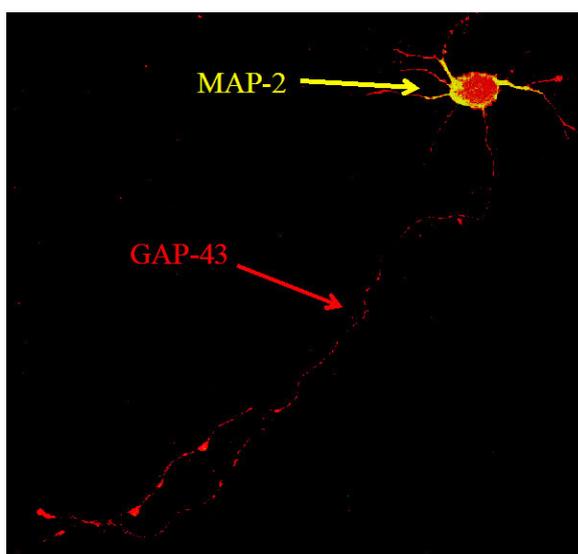
La diferenciación neuronal se caracteriza por el crecimiento del cuerpo celular, la elaboración de axones y dendritas seguida de su crecimiento en longitud y grosor y el agrupamiento de los cuerpos neuronales formando acumulaciones de las que parten radialmente las neuritas (que se encuentran formadas por axones y dendritas). Esta distribución da lugar a la disposición en materia blanca y materia gris que adoptan las neuronas en el SNC.

En las neuronas existen unas zonas que Ramón y Cajal denominó conos de crecimiento, donde se originan las dendritas y los axones (Herschkowitz, 1988; Caviness, 1989). 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 no es suficiente para que se produzca el desarrollo de las neuronas inmaduras; como se verá más adelante, es fundamental la presencia de factores neurotróficos (ver apartado 1.2.).

En la rata, el proceso de diferenciación neuronal comienza prenatalmente y dura hasta la tercera semana de vida postnatal. En el hombre, la diferenciación neuronal empieza en el período prenatal y puede durar hasta los cuatro años de edad (Meisami y Timiras, 1982; Herschkowitz, 1988).

En la elaboración de las dendritas es imprescindible la proteína asociada a microtúbulos, MAP-2 y en la elaboración de los axones interviene la proteína asociada al crecimiento, GAP-43 (ver Esquema 5).



Esquema 5: Localización inmunocitoquímica de las proteínas MAP-2 y GAP-43, en neuronas en cultivo primario.

La MAP-2, marcadora de crecimiento dendrítico, aparece en color amarillo y la GAP-43, marcadora de crecimiento axonal, aparece en rojo.

1.1.1.4.1. Proteínas asociadas a microtúbulos, MAPs

El citoesqueleto es la base de la morfología celular del tejido nervioso. Está constituido por tres tipos de elementos citoplasmáticos que interactúan entre ellos y con otras estructuras celulares. Estos elementos son los microfilamentos, los filamentos intermedios y los microtúbulos (Alberts, 2004). Los microtúbulos son cilindros largos y huecos, formados por heterodímeros de α y β tubulina (Mandelkow y Mandelkow, 1995; Desai y Mitchison, 1997). Aparte de la tubulina, existe en los microtúbulos un grupo muy heterogéneo de proteínas asociadas a estos polímeros (Wiche y col., 1991), que controlan el crecimiento y organización de los microtúbulos. Entre ellas encontramos: proteínas motoras (kinesinas y dineínas), proteínas que desensamblan los microtúbulos y proteínas promotoras del ensamblaje de los microtúbulos, denominadas proteínas asociadas a microtúbulos o MAPs.

Una de las MAPs más abundantes en el cerebro de mamíferos es la proteína asociada a microtúbulos-2, MAP-2. Esta proteína es termoestable y tiene varias isoformas, formadas a partir de un único gen por corte y empalme alternativo del pre-mRNA (Maccioni y Cambiazo, 1995). La MAP-2a y la MAP-2b son MAPs de alto peso molecular, próximo a 300 kDa, y se localizan específicamente en las dendritas. Existen otras dos variedades de la MAP-2 con un peso molecular inferior, MAP-2c y MAP-2d (Tucker, 1990).

La MAP-2 se asocia a los microtúbulos para estabilizarlos y promover su ensamblaje, pero manteniendo sus propiedades dinámicas (Olmsted, 1986). Así, ejerce un importante papel en el crecimiento de las dendritas (Woolf, 1998). Otras funciones descritas para 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 transporte de orgánulos en los axones y las dendritas.

Todas las MAP-2 tienen, próximo a la región carboxilo terminal, un conjunto de secuencias repetidas de 18 aminoácidos. Estas secuencias repetidas, separadas entre sí por 13 ó 14 aminoácidos, constituyen el dominio de unión a la tubulina. Todas las isoformas de la MAP-2 tienen, además, una región rica en prolina, previa al dominio de unión amino-terminal. Se piensa que la región carboxilo-terminal de la molécula de MAP-2, que incluye la región rica en prolina y los dominios de unión a la tubulina, está fuertemente unida a los microtúbulos, mientras que el resto de la molécula, que comprende la región amino-terminal y el dominio

central, se proyecta fuera de la superficie de los microtúbulos como un brazo, por lo que se le denomina “dominio de proyección” (Sánchez y col., 2000).

Las proteínas MAP-2 se expresan en el sistema nervioso, siendo una de las proteínas más abundantes en el cerebro (Olmsted, 1986; Schoenfeld y Obar, 1994). Dentro del sistema nervioso, las MAP-2 de alto peso molecular se expresan específicamente en las dendritas de las neuronas (Schoenfeld y Obar, 1994) y raramente en los axones, por lo que la MAP-2a y la MAP-2b se pueden considerar proteínas específicas de la diferenciación dendrítica neuronal. 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 isoformas de la MAP-2 proceden de la transcripción de un único gen. Las múltiples isoformas expresadas en las neuronas resultan del corte y empalme alternativo de un pre-mRNA transcrito del gen de la MAP-2, que en la especie humana está localizado en el cromosoma 2 y contiene 20 exones (Neve y col., 1986; Shafit-Zagardo y Kalcheva, 1998). El sitio de comienzo de la traducción se encuentra en el exón 5 y el codón de parada se localiza en el exón 19.

Los patrones de expresión diferencial de las isoformas de la 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). No obstante, no hay nada descrito hasta el momento acerca de una posible regulación transcripcional o post-transcripcional, de la MAP-2. Sin embargo, las distintas isoformas de la MAP-2 son modificadas post-traduccionalmente. 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 se modifica post-traduccionalmente durante el desarrollo de las neuronas 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 quinasas 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 quinasas/fosfatasa para el adecuado recambio y dinámica de los microtúbulos y, en consecuencia, una función neural satisfactoria. Así una hiperfosforilación de las MAP-2 causa su liberación de los microtúbulos, provocando la retracción neurítica e, incluso, la muerte neuronal a largo plazo (Arias y col., 1998). Entre las diversas proteínas quinasas que pueden fosforilar la MAP-2 están la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII), la proteína quinasa dependiente de calcio/fosfolípidos y diacilglicéridos (PKC) y las proteínas quinasas dirigidas por prolina. La desfosforilación de la MAP-2 se lleva a cabo por diversas serina-treonina fosfatasa, tales como las PP1, 2A, 2B (calcineurina) y 2C. Estas enzimas están muy concentradas en el cerebro y asociadas al citoesqueleto. Se cree que las fosfatasa juegan un papel esencial en la regulación de la plasticidad neuronal y en la transmisión sináptica (Sánchez y col., 2000).

1.1.1.4.2. Proteína asociada al crecimiento, GAP-43.

La GAP-43, también denominada B-50, se localiza fundamentalmente en los axones y, sobre todo, en los conos de crecimiento. Su expresión es máxima durante los procesos de crecimiento neuronal, tanto durante el desarrollo como en procesos de regeneración (véase (Skene, 1989; Benowitz y Routtenberg, 1997; Oestreicher y col., 1997)). No obstante, se ha demostrado recientemente que las vías que regulan la inducción de la GAP-43 durante el desarrollo son diferentes de las que tienen lugar durante la regeneración axonal (Udvardi y col., 2001). Esta proteína desaparece durante la vida adulta, quedando confinada en zonas cerebrales de alta plasticidad o en terminales sinápticos relacionados con la llamada potenciación a largo plazo, un proceso que se supone asociado a la memoria (Benowitz y Routtenberg, 1997).

Tanto en el SNC como en el SNP, la expresión de la GAP-43 comienza a aparecer en las neuronas postmitóticas, una vez que se han dividido y han migrado a su destino final. Su expresión en la rata se localiza a lo largo de los axones y en sus terminales. 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 disminuye su expresión, aunque en ciertas poblaciones de neuronas se detecta la GAP-43 en estadios posteriores (Benowitz y Routtenberg, 1997; Oestreicher y col., 1997).

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 a ácidos grasos. La corta región hidrofóbica en el extremo amino-terminal de la proteína contiene dos residuos de cisteína en las posiciones 3 y 4, que son, probablemente, los sitios de acilación con ácidos grasos y de unión a la membrana. Esta región contiene un dominio activador de la proteína G. En la parte intermedia existe el denominado dominio IQ, compuesto de 12-15 aminoácidos localizados antes de la serina 41 que constituye el sitio de unión a calmodulina. Además, en la parte intermedia existe un sitio de fosforilación para la proteína G en la serina 41 que, a su vez, regula la unión de la GAP-43 a calmodulina. En el extremo carboxilo-terminal se localiza el motivo F, el cual interacciona con los componentes del citoesqueleto (Skene, 1989).

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 (Chiaramello y col., 1996; Ohtsuka y col., 1998). El promotor de la GAP-43 contiene 7 cajas E (E1-E7) que están organizadas en dos grupos, un grupo distal (de E3 a E7) y un grupo proximal (E1 y E2) (Uittenbogaard y col., 2003). 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). Se ha descrito también que otro factor de transcripción de la familia de los NeuroD, Nex-1, actúa también como activador de la transcripción de la GAP-43, siendo su más potente regulador (Uittenbogaard y col., 2003).

La regulación del gen *GAP-43* es crítica para entender los mecanismos que controlan la diferenciación neuronal. La regulación es compleja, y están implicados mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales (Uittenbogaard y col., 2003). La expresión de la GAP-43 está regulada a nivel del mRNA. Así, el 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 (Perrone-Bizzozero y col., 1993).

1.1.1.5. Sinaptogénesis

Después de conseguir su destino final, las neuronas comienzan a generar prolongaciones dendríticas y axónicas que las capacitan para recibir contactos de otras células. Habitualmente se generan más contactos de los que serán precisos para la neurona adulta, madura y diferenciada. Las prolongaciones axónicas se ven guiadas en su trayecto por actores mecánicos y químicos. Los axones en crecimiento contienen orgánulos subcelulares como neurotúbulos, neurofilamentos, mitocondrias, vesículas recubiertas y lisas, retículo endoplasmático y algunos cúmulos de ribosomas. Los microtúbulos parecen ser necesarios para formar el armazón estructural que mantiene la estabilidad de las fibras alargadas.

La mayoría de las sinapsis consiste 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 cuestión principal es como un axón en crecimiento identifica el lugar en el que se formará una sinapsis. Existen dos explicaciones alternativas, aunque no excluyentes entre sí, sobre la forma en que las neuronas alcanzan sus dianas y forman sus conexiones precisas durante las fases del desarrollo: la hipótesis de la afinidad química o reconocimiento molecular y la hipótesis de la actividad neuronal. La sinaptogénesis es un proceso tardío de la diferenciación neuronal, si bien algunas sinapsis aparecen durante fases más tempranas (Caviness, 1989).

La hipótesis del reconocimiento molecular sugiere que cada neurona tiene especificada una identidad molecular que le permite ser reconocida por otras neuronas que entran en conexión con ella (Yuste y col., 1994). A este respecto se ha propuesto que las macromoléculas de la superficie axónica ofrecen lugares de identificación complementarios de las situadas en la membrana postsináptica. La hipótesis de la actividad neuronal destaca la importancia de la actividad neuronal durante el desarrollo, indicando que el patrón de actividad neuronal generado por los estímulos externos podría cambiar las conexiones tálamo-corticales, en virtud de la regla según la cual las conexiones que se utilizan quedan asentadas, en tanto que desaparecen las conexiones menos utilizadas (Yuste y col., 1994).

Entre los factores que pueden estimular la sinaptogénesis se encuentra la serotonina. En este sentido, se ha observado que algunos

neurotransmisores, como el GABA y la serotonina, aumentan el desarrollo de neuropilos y de las sinapsis en neuronas en cultivo (Madtes y Redburn, 1983; Hamon y col., 1989; 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 (Meisami y Timiras, 1982; Bayer, 1995).

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

Recientemente se ha demostrado la existencia de grupos co-activos de neuronas que ocupan territorios discretos; estos grupos han recibido el nombre de dominios neuronales. La co-activación de un dominio puede ser mediada por un tipo de conexiones entre dendritas, las uniones comunicantes o “*gap junctions*”. Tales uniones son complejos proteicos que forman un túnel entre dos células cercanas, permitiendo el paso de iones y pequeños metabolitos. Se ha demostrado que las neuronas acopladas eléctricamente entre sí por uniones de hendidura pueden activarse con idéntica eficacia, si no mayor, que las neuronas conectadas por sinapsis. No obstante, se ha podido comprobar que el acoplamiento entre neuronas desaparece al inicio del desarrollo. En base a estas observaciones, se ha planteado la hipótesis según la cual los dominios neuronales unen entre sí a las células que posteriormente estarán comunicadas mediante sinapsis. Según este modelo, las uniones de hendidura desaparecen durante el desarrollo y son reemplazadas en su función por conexiones sinápticas (Yuste y col., 1994).

El funcionamiento integrador del sistema nervioso se basa principalmente en la conectividad existente entre sus elementos básicos: las neuronas. Estas conexiones están determinadas en gran parte por factores genéticos, y una vez que se forman permanecen estables. Sin embargo, cada vez se resalta más el hecho de la posible modificación de las conexiones neuronales. Esta modificación de las conexiones establecidas entre las neuronas se denomina plasticidad neuronal. Los principales cambios plásticos son: modificaciones de las neuronas y de sus conexiones como resultado de las interacciones con el medio durante el desarrollo neuronal postnatal. Así mismo, la plasticidad neuronal también es responsable de los cambios en conectividad que ocurren tras un daño cerebral o de la plasticidad que tienen lugar durante el aprendizaje.

1.1.1.5.1. Papel del colesterol en la sinaptogénesis

Poirier (1994) describió que, durante la sinaptogénesis, decrece progresivamente la síntesis de colesterol en las neuronas y se ve favorecida la internalización del mismo a través de la ruta del receptor ApoE/LDL. Recientemente se ha identificado un factor derivado de la glía que promueve el desarrollo de la sinapsis en cultivos de neuronas purificadas del SNC. Se trata del colesterol, que forma un complejo con lipoproteínas que contienen la apolipoproteína E. Si bien las neuronas del SNC producen suficiente colesterol para su supervivencia y crecimiento, la sinaptogénesis requiere cantidades adicionales que deber ser provistas por la glía. Por tanto, 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 después de la diferenciación de la glía, así como los efectos neurales y de conducta que se manifiestan por alteraciones en la homeostasis del colesterol o de las lipoproteínas (Mauch y col., 2001). La diferenciación de las dendritas actúa como paso limitante en la sinaptogénesis y el colesterol es indispensable para este proceso. El colesterol induce la redistribución de MAP-2 y de las isoformas 2 y 3 del receptor de glutamato (GluR-2/3) en las neuritas, sin producir cambios en sus niveles de expresión. El colesterol también promueve directamente la maduración de los terminales presinápticos, actuando en la síntesis y maduración de las vesículas sinápticas (Goritz y col., 2005).

1.1.1.5.2. Estructura y función de las proteínas SNARE

Las proteínas SNARE (Receptor del factor de la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida soluble) son proteínas que están implicadas en la exocitosis de las vesículas presinápticas. Juegan un papel en el acoplamiento y fusión de la vesículas sinápticas a la zona activa, así como en el efecto del calcio, más concretamente, en combinación con el sensor de calcio sinaptotagmina (Brunger, 2005). La exocitosis regulada está provocada por segundos mensajeros, tales como el calcio, en respuesta a la activación o despolarización de la membrana.

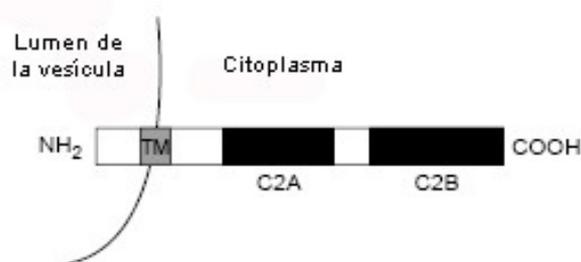
Las proteínas SNAREs son proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) junto con las proteínas asociadas al NSF (SNAPs). Las vesículas sinápticas son reclutadas en la zona activa de la membrana presináptica, pero no son fácilmente fusionadas. En cambio,

aproximadamente 10 vesículas se acoplan a la zona activa, a la espera de un potencial de acción. Se han descrito muchas proteínas esenciales para la liberación de neurotransmisores dependientes de calcio, como son sinaptotagmina, complexita, Munc18 y Munc13 (Brunger, 2005).

1.1.1.5.3. Sinaptotagminas

La exocitosis sináptica se provoca por una liberación de calcio tras la llegada del potencial de acción. La sinaptotagmina está descrita en distintas isoformas en neuronas y células no neurales. Las sinaptotagminas constituyen una numerosa familia de proteínas de unión a calcio. Actúan como sensores de calcio para la exocitosis rápida en neuronas de vertebrados, células endocrinas y en neuronas de *Drosophila* (Han y col., 2004). Estructuralmente, están compuestas por una secuencia corta intravesicular N-terminal, una única región transmembrana, una región rica en lisina, una región rica en arginina y dos copias de una repetición citoplasmática homóloga al dominio C-terminal de la proteína quinasa C (PKC), denominados dominios C2A y C2B (ver esquema 6). Están ampliamente conservadas y expresadas, en múltiples isoformas, con al menos 9 genes en mamíferos. La mayoría de las distintas isoformas de la sinaptotagmina están colocalizadas en el cerebro (Li y col., 1995; Koh y Bellen, 2003).

La sinaptotagmina I se detecta en todos los estados de desarrollo del cerebro del ratón, pero no en otros tejidos. Por el contrario, la sinaptotagmina VII es abundante en todos los tejidos embrionarios. Postnatalmente, sin embargo, la sinaptotagmina VII, se expresa abundantemente sólo en cerebro, decayendo sus niveles de expresión en otros tejidos (Han y col., 2004).



Esquema 6: Estructura de la sinaptotagmina.

Modificado de Koh y Bellen (2003).

La localización subcelular de las distintas isoformas de la sinaptotagmina es distinta. De esta forma, las sinaptotagminas I y II se expresan

fundamentalmente en vesículas sinápticas y gránulos de secreción mientras que, por ejemplo, las isoformas III y VII se expresan en la membrana plasmática. Los mecanismos que dirigen a la sinaptotagmina I hacia las vesículas sinápticas y después hacia la sinaptotagmina VII, que se encuentra en la membrana plasmática, son nucleares (Han y col., 2004).

Muchas sinaptotagminas se unen a los fosfolípidos y a las syntaxinas de una manera calcio-dependiente, aunque con propiedades ligeramente diferentes. Las excepciones son las sinaptotagminas IV, VIII, XI, y XII las cuales contienen sustituciones de aminoácidos en el dominio C2A que aparentemente impiden la unión al calcio. El homólogo directo de la sinaptotagmina I, la sinaptotagmina IX, no interacciona con proteínas SNAREs y el dominio C2B no interacciona con fosfolípidos. Sin embargo, la sinaptotagmina IX ayuda a la exocitosis provocada por calcio en estudios de permeabilización de células PC12. Además, aunque las sinaptotagminas III y IV se expresan primeramente en el cerebro, éstas no se encuentran localizadas en las vesículas sinápticas. El hecho de que varias sinaptotagminas se coexpresen en la sinapsis pero no se colocalicen en las vesículas sinápticas sugiere que pueden tener distintas funciones (Brunger, 2005).

Las sinaptotagminas I y II están localizadas en las vesículas sinápticas y los dominios C2A y C2B interaccionan, de una manera calcio-dependiente, con lípidos, SNAP-25, syntaxina y los complejos ternarios SNARE. Además, el dominio C2B puede promover la oligomerización en una forma calcio dependiente (Brunger, 2005).

Mutaciones en la sinaptotagmina I producen un fenotipo dominante, a pesar de la presencia de otras sinaptotagminas. De hecho, las sinaptotagminas I y II colocalizan en las neuronas del hipocampo, que son las afectadas en el ratón *knockout*. (Li y col., 1995), lo que sugiere que las distintas sinaptotagminas llevan a cabo distintas funciones.

a) Glicosilación y palmitoilación de las sinaptotagminas

El dominio N-terminal de la sinaptotagmina se glicosila y esto parece jugar un papel esencial en la localización de las isoformas de la sinaptotagmina. La N-glicosilación de la sinaptotagmina I, junto con una señal en los dominios C2 citosólicos, dirige a la proteína hasta las vesículas sinápticas (Han y col., 2004). La localización de las sinaptotagminas I y VII está normalmente restringida a las vesículas sinápticas y a la membrana plasmática respectivamente (Brunger, 2005). Se sabe que el único sitio de

N-glicosilación intraluminal de la sinaptotagmina I es un determinante esencial para su localización vesicular, mientras que los dominios C2 de las sinaptotagminas I y VII son funcionalmente intercambiables. Por lo tanto, la importancia funcional de la N-glicosilación de la sinaptotagmina I para la transmisión sináptica es fundamental para la correcta función de la sinaptotagmina I en la exocitosis (Han y col., 2004).

Además, las sinaptotagminas también tienen sitios de palmitoilación (Brunger, 2005). La palmitoilación es crítica para clasificar a la sinaptotagmina I en las vesículas intracelulares de los contactos presinápticos para dirigirla hacia el terminal presináptico. También se ha descrito que regula la internalización de muchas proteínas integrales de membrana, como los receptores acoplados a proteína G (Kang y col., 2004).

b) Interacciones de las sinaptotagminas

El tandem de los dominios C2 de la sinaptotagmina I cooperan para permitir la unión a las proteínas SNAREs. Así que la interacción entre la sinaptotagmina I y las proteínas SNAREs es de carácter débil.

c) Función de las sinaptotagminas

La exocitosis de la vesícula puede tener lugar a través de dos mecanismos. Así la fusión completa ocurre cuando la vesícula se fusiona con la membrana plasmática. Sin embargo, las vesículas pueden liberar transmisores durante los contactos transitorios con la membrana plasmática en lo que es denominado “*kiss-and-run*”. Pues bien, la sinaptotagmina I parece regular la elección entre la fusión completa y el “*kiss-and-run*”, con la unión del calcio a los dominios C2A y C2B, que juegan un importante papel en esta elección (Wang y col., 2003).

1.1.1.5.4. Papel del glutamato en la sinapsis

El principal neurotransmisor excitador en el cerebro es el glutamato, que ejerce sus acciones a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. La comunicación a través de esos receptores es crítica para la transmisión sináptica normal, además de contribuir al desarrollo del sistema nervioso y la plasticidad sináptica. Durante las lesiones agudas del sistema nervioso central, incluida la isquemia y el trauma encefálico, el glutamato y el aspartato se acumulan en el espacio extracelular causando una

sobreactivación de los receptores de aminoácidos excitadores, conduciendo al fenómeno denominado excitotoxicidad.

Se han descritos dos tipos de receptores de glutamato: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Hay 3 familias de receptores ionotrópicos: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropinoico) y receptores kainato. Estudios moleculares indican que estos 3 tipos de receptores son todos multiméricos y poseen subunidades con una gran homología entre ellas. Además, existen 3 grupos de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (mGluR), que modifican la excitabilidad glial y neuronal a través de las subunidades internas de la proteína G. Estos últimos actúan sobre los canales iónicos de membrana y a través de segundos mensajeros, tales como el diacilglicerol y el AMPc (Meldrum, 2000).

a) Liberación del glutamato

El glutamato es liberado desde vesículas de los terminales presinápticos por un mecanismo dependiente de calcio. La concentración de glutamato dentro de la vesícula es del orden de 100 nM y la liberación de una sola vesícula produce un potencial postsináptico (EPSP) a través de la activación de los receptores AMPA. La liberación sináptica del glutamato está controlada por un amplio rango de receptores presinápticos, donde no sólo figuran los metabotrópicos y los ionotrópicos, sino también los colinérgicos y opioides kappa (Meldrum, 2000).

b) Receptores ionotrópicos

Son receptores con una estructura molecular tetramérica o pentamérica, y constan de subunidades pertenecientes a 3 familias. La clase de las subunidades determina las propiedades biofísicas del receptor. La modificación más importante de la función de los receptores AMPA es la producida por la presencia de una subunidad GluR2 (también denominada GluRB), la cual previene la apertura del canal. Los receptores que sólo expresan subunidades GluR1 y GluR3 muestran una importante conductancia al calcio. Los receptores AMPA muestran, además, una afinidad más baja por el glutamato que los receptores NMDA, pero tienen una cinética más rápida, y son responsables del componente inicial rápido del EPSP. La estructura de la unión del GluR2 al kainato se ha determinado recientemente por cristalografía de rayos X. La estructura extracelular está formada por cuatro α -hélices bilobuladas con el agonista, en un grieta en la cual se sitúa el agonista (Meldrum, 2000).

c) Receptores metabotrópicos (mGluR)

Estos receptores comparten morfología molecular con las proteínas de unión a la proteína G. Tienen siete dominios transmembrana, con un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular.

Los receptores del grupo I activan a la fosfolipasa C, produciendo diacilglicerol e inositol trifosfato, que actuarán como segundos mensajeros. Los receptores de los grupos II y III están unidos a adenilato ciclasa, a la que inhiben (Meldrum, 2000).

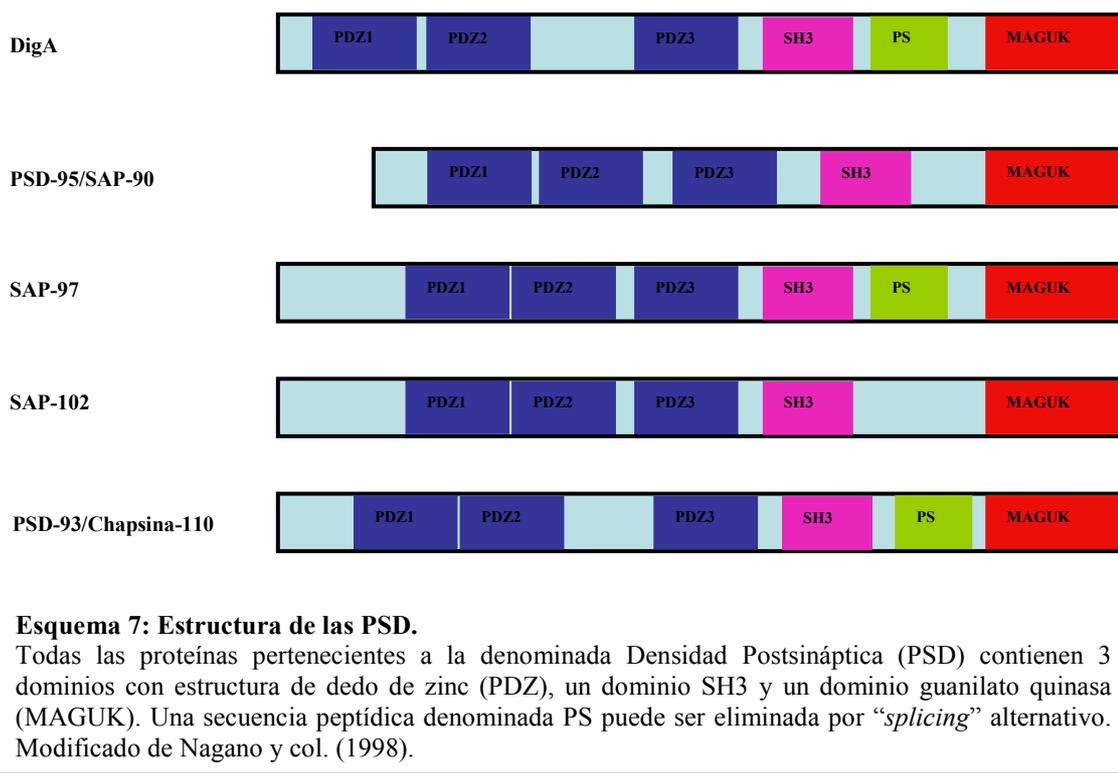
d) Transportadores de glutamato

Se han clonado cinco transportadores de glutamato en el SNC de mamíferos. Dos de ellos se expresan en células gliales: GAST (Transportador Glial de Glutamato y Aspartato) y GLT (Transportador Glial de Glutamato). Tres se expresan en neuronas EAAC1 (Transportador de aminoácidos excitatorios) y los EAAT4 y EAAT5. Todos ellos son dependientes de sodio, puesto que los gradientes de sodio y potasio proporcionan la energía para el transporte. Por otro lado, los transportadores neuronales parecen estar asociados a canales de cloro, los cuales se abren cuando se une el glutamato; así tienden a hiperpolarizar la membrana postsináptica, disminuyendo la actividad sináptica (Meldrum, 2000).

1.1.1.5.5. Densidad postsináptica (PSD)

La densidad postsináptica (PSD) es una estructura citoesquelética altamente organizada que se encuentra adyacente a la membrana postsináptica de la sinapsis excitatoria y que juega un papel importante en la organización de los receptores y proteínas relacionadas en la señalización sináptica (Petralia y col., 2005). Dentro de este grupo, las mejor estudiadas son aquellas cuya estructura molecular está formada por tres dominios en dedos de zinc (PDZ), una región reguladora homóloga a Src (SH3) y un dominio similar a la guanilato quinasa, que genericamente se denomina Guanilato Quinasa Asociada a Membrana (MAGUKs) (ver esquema 7). Las PSD interaccionan con receptores NMDA a través de una serie de proteínas. Una de ellas, la proteína asociada a la sinapsis-90 (SAP-90)/Densidad postsináptica-95 (PSD-95) fue inicialmente identificada

basándose en su abundancia en las PSD aisladas. PSD-95 interactúa con el extremo C-terminal del receptor NMDA, exactamente con la subunidad NR2, lo que sugiere que PSD-95 juega un papel importante en el anclaje sináptico y la organización de los receptores NMDA. Otras tres proteínas han sido identificadas en las PSD que están relacionadas estructuralmente con PSD-95. Éstas son la SAP-97/hdlg, Chapsina-110/PSD-93 y SAP-102 (Nagano y col., 1998; Sans y col., 2000; Schnell y col., 2002).



Los patrones de expresión de SAP-97, PSD-93, PSD-95 y SAP-102 son distintos, pero coinciden parcialmente en el cerebro. Por otro lado, la posibilidad de que las MAGUKs de forma independiente, puedan ser sustituidas unas por otras se sugiere a partir de resultados de estudios con ratones que expresan una forma de PSD-95 truncada, los cuales muestran cambios en la plasticidad relacionada con los receptores NMDA, aunque siguen conservando muchos de los aspectos de la función normal de dichos receptores (Migaud y col., 1998; Sans y col., 2000). Se ha descrito, que un incremento en los niveles de PSD-95 aumenta el número de AMPARs (Schnell y col., 2002).

1.1.1.5.6. Sinaptofisina

La sinaptofisina es una proteína de las membranas de las vesículas sinápticas que está expresada ubicuamente en el cerebro. Es capaz de

interaccionar con todas las proteínas de las vesículas sinápticas. Se ha sugerido un posible papel en la regulación del ciclo de las vesículas sinápticas, aunque se conoce que su función es redundante puesto que se compensa por otras proteínas. La sinaptofisina se fosforila tanto por serina/treonina kinasas, como por tirosina kinasas (Tarsa y Goda, 2002).

1.1.1.5.7. Sinaptobrevina

La sinaptobrevina es otra de las proteínas componentes de la membrana de las vesículas sinápticas. Se une a la sinaptofisina y, además, está ampliamente relacionada con la isoforma sinaptoporina. La interacción sinaptofisina-sinaptobrevina no se detecta en cerebro embrionario, por lo que su expresión es más tardía durante el desarrollo. También puede ser palmitilada como la sinaptotagmina (Veit y col., 2000).

1.1.1.6. Muerte neuronal

Durante el desarrollo del SNC se generan un gran número de neuronas, de las que apenas la mitad van a sobrevivir. Esta pérdida tan elevada de neuronas es común a todos los vertebrados y parece ser un mecanismo de adaptación durante el desarrollo del sistema nervioso (Oppenheim, 1991). La explicación de este fenómeno la dieron en los años 40 Hamburger y Levi-Montalcini en su *hipótesis del factor neurotrófico*, donde se propone que la supervivencia neuronal específica depende y está regulada por los distintos factores neurotróficos que se sintetizan en las áreas que actúan como blancos. Además, esta hipótesis también sugiere, que la degeneración de poblaciones neuronales específicas en el envejecimiento y en los procesos patológicos puede ser una consecuencia de la pérdida del acceso de dichas neuronas a los factores neurotróficos (Hamburger y Levi-Montalcini, 1949). Esta hipótesis se vio reforzada por el descubrimiento, años más tarde, del NGF.

1.2. FACTORES NEUOTRÓFICOS

Se han descrito varios tipos de factores neurotróficos: neurotrofinas, citoquinas relacionadas con la interleukina (su ejemplo más conocido es el factor neurotrófico ciliar, CNTF), miembros de la familia del factor de crecimiento β , TGF β (entre los que destaca el factor neurotrófico derivado de la glía, GDNF) y la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos, FGF. De todos ellos los más extensamente descritos son las neurotrofinas (para revisión ver (Castellanos-Ortega y col., 1999). Tanto la neurogénesis, como la gliogénesis, están influenciadas por varias citoquinas y factores de crecimiento como las neurotrofinas (Vicario-Abejon y col., 1995).

1.2.1. Neurotrofinas

Las neurotrofinas son factores neurotróficos importantes en el desarrollo, mantenimiento y diferenciación de las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC), así como del Sistema Nervioso Periférico (SNP). Se sabe que están implicados en la neurogénesis, la migración celular, el crecimiento de axones y dendritas, la sinaptogénesis, la mielinización, la expresión fenotípica de neurotransmisores y la apoptosis celular (Snider, 1994; Narisawa-Saito y col., 1999; Chan y col., 2001). Son proteínas muy conservadas evolutivamente y con un 50-58% de homología entre ellas. Además, actúan siempre como dímeros, ya sean homodímeros o heterodímeros (Robinson y col., 1995). Se han aislado en mamíferos 6 proteínas de esta familia: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3), la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Jessell y Sanes, 2001a), la neurotrofina 6 (NT-6) (Gotz y col., 1994; Li y col., 1997), y la neurotrofina 7 (NT-7) (Nilsson y col., 1998). Éstas son menos conocidas puesto que han sido descubiertas más recientemente.

Las distintas neurotrofinas se expresan de forma específica en las distintas regiones del sistema nervioso. En este sentido, en cada región se expresan diferentes neurotrofinas y diferentes receptores. Las neurotrofinas se sintetizan y se liberan al espacio intercelular uniéndose a receptores de membrana en las neuronas. Finalmente, se internalizan y sufren un transporte retrógrado, para luego modular la activación de distintos factores de transcripción implicados en la síntesis de proteínas responsables de distintas funciones neuronales (Fisman, 2003).

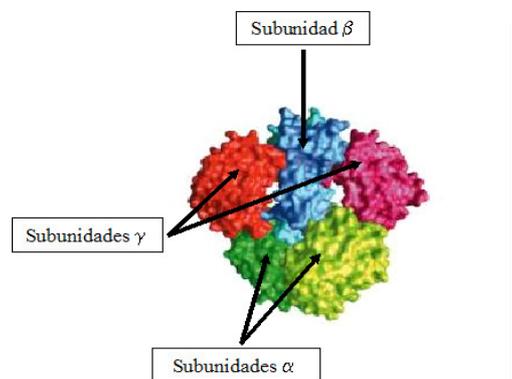
Las neurotrofinas son posibles candidatas para influenciar el linaje celular de las células madre. Esto se basa en el hecho de que las neurotrofinas y sus receptores se expresan durante el desarrollo del neuroepitelio, así como en cultivos de células madre. Las neurotrofinas estimulan la diferenciación neuronal por alteración en el balance de la expresión de los factores de transcripción bHLH Mash1 y Math1 (Ito y col., 2003).

La unión de las neurotrofinas a sus receptores tirosina kinasa (Trks) conducen a la activación de distintas rutas de señalización intracelulares, como son fosfoinositol-3'-kinasa (PI3K), fosfolipasa C3- γ (PLC- γ), y Ras (Kaplan y Miller, 2000).

1.2.1.1. NGF

Fue la primera neurotrofina identificada y, por lo tanto, la más conocida y estudiada. Fue descubierta en 1954 por Levi-Montalcini, que junto con Hamburger y Cohen y col., aisló la proteína y produjo el primer suero anti-NGF. Se descubrió de una forma accidental, al realizar un trasplante de un tumor y observar una invasión extraordinaria de las neuronas periféricas al tumor, identificándose el NGF como el causante de la inducción de la invasión. (Alberts, 2004). Su síntesis y la expresión de sus receptores, TrkA y p75, no está limitada a las neuronas, sino que otras células como los mastocitos y las células B también producen y sintetizan NGF. También se ha detectado el NGF en algunas neoplasias humanas (Fizman, 2003). La función principal del NGF es acelerar la proliferación de células progenitoras neurales ayudado del factor de crecimiento de los fibroblastos-2 (FGF-2) (Ito y col., 2003).

La estructura del NGF está bien establecida. Se trata de un complejo pentamérico de 130 kDa, con dos subunidades α , una subunidad β y dos subunidades γ (ver esquema 8). La actividad biológica se localiza en la subunidad β , también conocida como NGF 2,5S. Las otras dos subunidades actúan en la regulación del procesamiento, liberación y degradación de la subunidad β . La forma



Esquema 8: Estructura del NGF. Complejo pentamérico de 130 kDa, formado por una subunidad β , dos subunidades α y dos subunidades γ .

finalmente activa del β -NGF es un homodímero de 26,5 kDa (para revisión ver (Castellanos-Ortega y col., 1999)).

1.2.1.2. BDNF

Es una proteína de 13,6 kDa que promueve la supervivencia y diferenciación de las neuronas *in vitro*. Tiene un efecto tanto autocrino como paracrino en neuronas y células no neuronales (Snider, 1994). Se une al subtipo de receptor TrkB y media la supervivencia neuronal a través de la activación de este receptor (Fiszman, 2003). Muchos estudios demuestran que es un factor crítico para la regulación de la neurogénesis adulta en mamíferos, en la zona subgranular (SGZ) del hipocampo (Donovan y col., 2008). También está descrita su implicación en la sinaptogénesis, puesto que la administración de BDNF en cultivos primarios de neuronas neocorticales produce un incremento en la expresión de los receptores de glutamato, isoformas GluR1 y GluR-2/3 típicas de las sinapsis. Además, el estudio de ratones “*knockout*” de BDNF han confirmado la idea de que el BDNF es esencial para el desarrollo neural normal y la transmisión sináptica (Narisawa-Saito y col., 1999). Además, el BDNF aumenta la diferenciación de células madre neuronales, que forman neuroesferas *in vitro* y promueve la supervivencia de las neuronas corticales, así como la proliferación de neuronas en la zona subependimal (Ito y col., 2003).

1.2.1.3. NT-3

La NT-3 se conoce también como factor neurotrófico derivado del hipocampo (HDNF) y factor de crecimiento nervioso 2 (NGF-2). La secuencia de aminoácidos es igual en el hombre, el ratón y la rata, lo que produce una reactividad cruzada de anticuerpos entre las distintas especies (Maisonpierre y col., 1990). Su precursor tiene un peso molecular de 30 kDa. Sus receptores son TrkC y TrkA (Brodski y col., 2000). Se ha propuesto su implicación en la supervivencia y diferenciación de las neuronas sensoriales (ElShamy y Ernfors, 1997). Además, se conoce que promueve la diferenciación de las neuronas simpáticas (Brodski y col., 2000), así como que induce la diferenciación de células precursoras corticales y las oligodendrogliales (Ito y col., 2003). NT-3 induce la diferenciación neuronal actuando sobre células postmitóticas tempranas y es un factor de diferenciación para neuronas hipocampales calbindina positivas (Vicario-Abejon y col., 1995).

1.2.1.4. NT-4/5

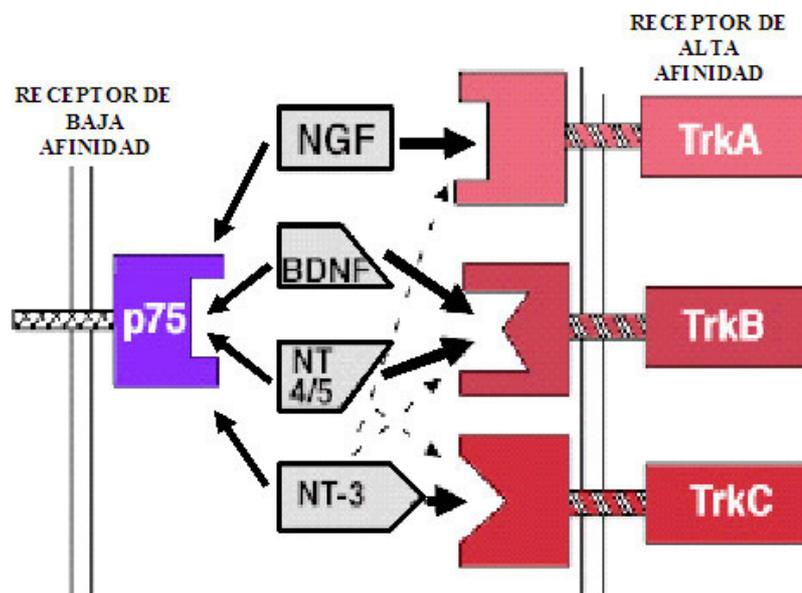
La NT-4/5 tiene un peso molecular de 14 kDa. Fue originalmente identificada en *Xenopus* y posteriormente en ratas y en el hombre. En mamíferos se la llamó en un primer momento Neurotrofina-5, para distinguirla de la NT-4 de *Xenopus* y cuando se comprobó que eran iguales se pasó a nombrarla NT-4/5.

Esta neurotrofina, junto con el BDNF y la NT-3, incrementa y aumenta la proliferación de neuronas del ganglio dorsal en cultivo, dado que aumenta significativamente la incorporación de bromo-desoxiuridina (BrdU) (Memberg y Hall, 1995). Junto al BDNF y a la NT-4/5, la NT-4/5 está implicada en la supervivencia de las neuronas de pollo en cultivo (Becker y col., 1998).

1.2.2. Receptores de las neurotrofinas

Se conocen dos tipos de receptores de las neurotrofinas: Trk y p75 (Carter y Roskams, 2002). Los receptores Trk, o receptores de alta afinidad, son proteínas monoméricas transmembranales de entre 120 y 160 kDa, con tres regiones: la extracelular o de unión al ligando, la intramembranal y la intracelular con actividad tirosina quinasa intrínseca (Barbacid, 1995). Los Trks son receptores tirosina quinasa que utilizan un complejo de sustratos y proteínas adaptadoras para la diferenciación, plasticidad y supervivencia promovida por las neurotrofinas (Friedman y Greene, 1999). Las neurotrofinas se unen también a otro receptor, que es un receptor universal denominado p75 o receptor de baja afinidad (ver esquema 9). Mientras que los receptores Trk transmiten señales de supervivencia, proliferación y diferenciación, los p75 transmiten señales de apoptosis (Meldolesi y col., 2000). Las señales de ambos receptores pueden sumarse u oponerse en función de la densidad relativa de cada tipo de receptor (Fizman, 2003).

TrkB, y TrkC se expresan abundantemente en neuronas del hipocampo y en el neocortex, mientras que TrkA está virtualmente ausente en las neuronas de estas áreas cerebrales. Sin embargo, los receptores TrkA están presentes en fibras colinérgicas aferentes de las neuronas basales del cerebro, hasta el hipocampo y la neocorteza, respectivamente. El receptor de las neurotrofinas p75 está también presente en estas fibras colinérgicas aferentes, mientras que está ausente en neuronas dentro del hipocampo y la neocorteza (Lessmann, 1998).



Esquema 9: Neurotrofinas y sus receptores.

Las interacciones primarias entre el receptor y la neurotrofina se muestran como líneas continuas y las interacciones secundarias y débiles, con líneas discontinuas. Modificado de Lindsay y col. (2002).

La primera proteína receptora con actividad tirosina quinasa específica conocida fue el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El receptor Trk fue originalmente detectado como un protooncogen de una proteína de fusión, de la cual 392 residuos N-terminales de la proteína Trk normal fueron reemplazados por secuencias de tropomiosina. El conocimiento de los distintos miembros de neurotrofinas y sus dianas facilitó la búsqueda de distintos Trks. Así, se conocen distintos miembros de la familia de Trks (ver Esquema 9):

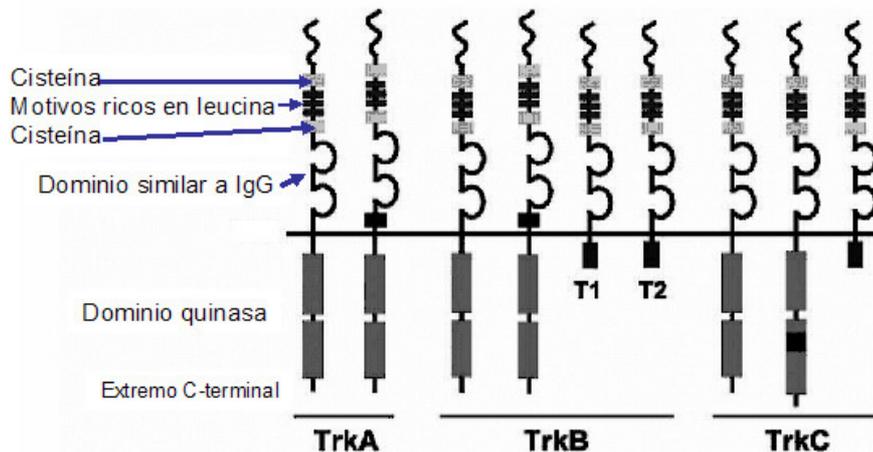
1) TrkA, denominado a menudo simplemente Trk porque fue el primero que se descubrió. Su ligando más específico es el NGF y posee isoformas activas que se diferencian por presentar una de ellas en su segmento extracelular una secuencia característica de 6 aminoácidos.

2) TrkB, que es el receptor al que se unen el BDNF y la neurotrofina 4/5 con mayor afinidad.

3) TrkC, que es el receptor al que se une la neurotrofina 3 con mayor afinidad (Barbacid, 1995).

La estructura de estos receptores está bien descrita, como se puede observar en el esquema 10. Los receptores Trk contienen una interesante combinación de motivos de adhesión celular en sus dominios

extracelulares, con tres motivos ricos en leucina en tándem flanqueados por dos cisteínas en su extremo amino-terminal y varios dominios Ig-G, los cuales son el mayor elemento de unión específica. Los receptores interactúan con su ligando a través del segundo dominio parecido a inmunoglobulinas (Patapoutian y Reichardt, 2001). El dominio intracelular comprende un dominio transmembrana, un dominio quinasa típico y un pequeño tallo carboxilo terminal de 15 residuos (Friedman y Greene, 1999). El dominio citoplasmático del receptor contiene varios sitios de fosforilación en tirosina, que funcionan como intermediarios en cascadas de señalización intracelular (Huang y Reichardt, 2003). Por otro lado, cada forma de receptor Trk emplea un juego distinto de residuos para interactuar con su correspondiente ligando (Ultsch y col., 1999). Los dominios extracelulares contienen, además, múltiples sitios de glicosilación. Esta glicosilación está localizada junto a una región determinada de la localización transmembranal de los Trks (Friedman y Greene, 1999). Un corte y empalme alternativo de los mRNA de TrkA, TrkB y TrkC conduce a la expresión de proteínas con diferencias en sus dominios extracelulares, que afectan a las interacciones de ligandos (Patapoutian y Reichardt, 2001).



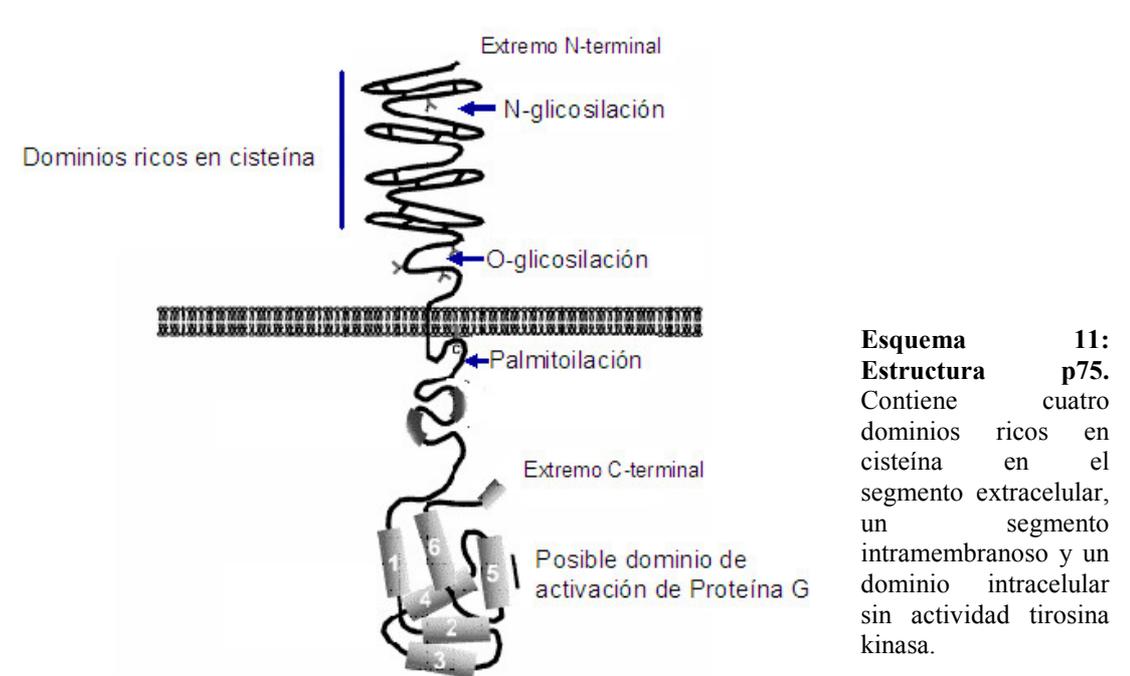
Esquema 10: Representación esquemática de la estructura de los Trk.

Los receptores Trk presentan una combinación de motivos de adhesión celular en su dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular formado por un dominio quinasa y un pequeño tallo carboxilo terminal.

El p75 es una glicoproteína transmembranal, monomérica, de 75 kDa, que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral, TNF (Chao, 1994) y que parece modificar la señal de los receptores Trk cuando se expresan ambos tipos de receptores. Cuando se expresa en ausencia de Trk, el p75 participa en la respuesta de las neurotrofinas mediando la muerte

apoptótica (para revisión véase (Castellanos-Ortega y col., 1999;Friedman y Greene, 1999). Se sabe que contiene pequeños dominios intracelulares que han sido descritos como iniciadores de señales apoptóticas (Culmsee y col., 2002).

El p75 tiene un segmento extracelular con cuatro dominios ricos en cisteína regularmente espaciados, un segmento intramembranal y un amplio dominio intracelular sin actividad tirosina quinasa (ver esquema 11). Se expresa ampliamente en las neuronas y la glía y no está presente en las neuronas colinérgicas estriales, que sólo expresan TrkA. Se une con una afinidad similar a todas las neurotrofinas (para revisión ver (Castellanos-Ortega y col., 1999); (Friedman y Greene, 1999).



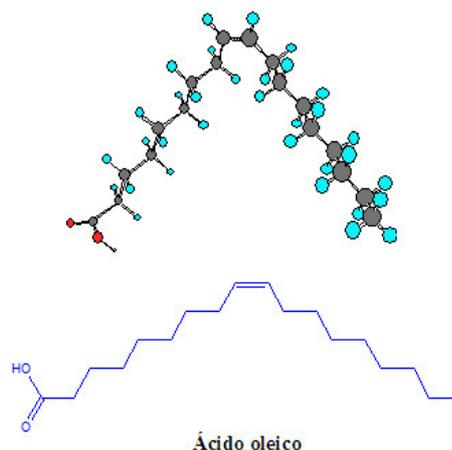
Se sabe que el p75 regula las conformaciones de los receptores Trk, a los cuales modifica actuando específicamente sobre la unión al ligando. Este hecho tiene un papel importante durante el desarrollo (Huang y Reichardt, 2003).

1.2.3. El ácido oleico

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha descrito que la albúmina, una proteína sérica presente en el cerebro exclusivamente durante el desarrollo, induce la síntesis de ácido oleico en astrocitos, el cual se comporta como un factor neurotrófico (Tabernero y col., 2001;Tabernero y col., 2002). Así, la presencia de ácido oleico promueve que las neuronas se

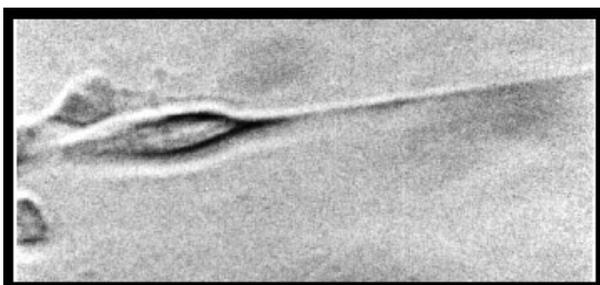
dispongan siguiendo los patrones que se observan *in vivo*. En este sentido, se ha observado cómo los somas neuronales se agrupan formando estructuras que se asemejan a la materia gris y prolongan sus axones hasta contactar con grupos de las neuronas adyacentes, dejando un espacio equivalente a la materia blanca en el SNC (Taberero y col., 2001).

El ácido oleico, o *cis*-9-octadecanoico, sintetizado por los astrocitos, se incorpora en los fosfolípidos de la membrana neuronal en forma de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Esta incorporación es dependiente de albúmina, lo que sugiere que la albúmina es utilizada como vehículo para el transporte del ácido oleico entre los astrocitos y las neuronas (Taberero 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, 2004) (ver esquema 12). En este sentido, la fluidez de la membrana



Esquema 12: Estructura del ácido oleico. Ácido graso de 18 átomos de carbono, con una insaturación en *cis* en el carbono 9, que produce un pliegue en la molécula.

es muy crítica para las neuronas, por lo que la incorporación de fosfolípidos que contienen oleico puede cambiar sustancialmente las propiedades de la membrana. En efecto, el ácido oleico se incorpora preferentemente en las bases de las prolongaciones somáticas denominadas neuritas (ver esquema 13), lo que sugiere que éstas requieren un incremento en la fluidez de la membrana en los sitios donde emergen nuevos axones y/o dendritas. De esta manera se facilita la formación de la membrana durante el crecimiento neurítico, a la vez que se incrementa la flexibilidad para la orientación de los axones (Taberero y col., 2001).



Esquema 13: Localización del ácido oleico incorporado por las neuronas en cultivo primario. El ácido oleico se incorpora, preferentemente, en las bases de las neuritas. Modificado de Taberero y col. (2001).

Aunque la diferenciación neuronal es un proceso extremadamente complejo, desde el punto de vista morfológico se caracteriza por el agrupamiento de los cuerpos celulares, seguido del crecimiento de las neuritas, que terminan diferenciándose en dendritas o axones. La presencia de ácido oleico produce la diferenciación morfológica de la neurona, caracterizada por la elongación de las neuritas y el agrupamiento de los cuerpos neuronales (Tabernero y col., 2001). Aunque no se conoce con precisión cómo se lleva a cabo el crecimiento de cada tipo de neurita, existen proteínas marcadoras específicas de su crecimiento, tales como la proteína asociada al crecimiento, GAP-43, para los axones y la proteína asociada a microtúbulos, MAP-2, para las dendritas.

1.2.3.1. Efecto del ácido oleico sobre la expresión de la MAP-2

Además del efecto diferenciador sobre la morfología neuronal, el ácido oleico produce un incremento en la expresión de la proteína MAP-2, marcadora de diferenciación dendrítica, que se ve acompañado también con un aumento en la expresión de su mRNA (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004). Cuando las neuronas se cultivan en presencia de ácido oleico, la MAP-2 se acumula bajo la membrana citoplasmática, así como a lo largo de las dendritas, mientras que en ausencia de ácido oleico la proteína se aprecia sólo en los puntos de partida de las neuritas.

El efecto causado por el ácido oleico sobre la expresión de la MAP-2 no se observa en presencia de otros ácidos grasos estructuralmente parecidos, tales como el ácido eláidico (18:1 Δ 9-doble enlace en *trans*) o el ácido palmítico (16:0), lo que demuestra la importancia del doble enlace en *cis* para que el efecto del ácido graso sea específico (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004).

1.2.3.2. Efecto del ácido oleico sobre la expresión de la GAP-43.

Así mismo, la presencia de ácido oleico induce la síntesis de la GAP-43, proteína marcadora de la diferenciación axonal (ver apartado 1.1.1.2.), que se distribuye a lo largo de los axones que contactan con las neuronas vecinas. De hecho, en presencia de ácido oleico no sólo aumenta la cantidad de GAP-43, sino que se detecta mayor cantidad de mRNA de la GAP-43 (Tabernero y col., 2001).

In vivo, la expresión de GAP-43 en el cerebro presenta un pico a los 7 días después del nacimiento (Velasco y col., 2003). Curiosamente, la expresión de la enzima responsable de la síntesis de ácido oleico, la estearil-CoA desaturasa (SCD), tiene un máximo de expresión en el tercer día de vida postnatal, lo que indica que ambos fenómenos se relacionan en el tiempo, lo que demuestra el papel del ácido oleico como factor neurotrófico *in vivo*.

Además, en experimentos previos en nuestro laboratorio, hemos demostrado que el ácido oleico induce la expresión de la GAP-43 a través de un mecanismo mediado por la proteína quinasa C, que es independiente de NGF pero sinérgico con NT-3 y NT-4/5 (Granda y col., 2003).

1.2.3.3. Mecanismo de acción del ácido oleico en la diferenciación neuronal

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha observado que el efecto del ácido oleico sobre el aumento de la expresión de la GAP-43 y de la MAP-2 tiene un mecanismo común, que consiste en la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Taberero y col., 2001; Granda y col., 2003; Rodríguez-Rodríguez y col., 2004). En este sentido, 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). De hecho, la presencia del inhibidor de la PKC, esfingosina, suprime los cambios morfológicos producidos en las neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico (Taberero y col., 2001; Rodríguez-Rodríguez y col., 2004). Asimismo, el aumento del mRNA, tanto de la GAP-43 como de la MAP-2, causado por la presencia de ácido oleico, se previene casi totalmente cuando se inhibe la PKC (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004).

Los procesos de desarrollo neural están controlados positiva y negativamente por múltiples factores de transcripción de la familia bHLH. Rodríguez y col (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004) han mostrado el efecto del ácido oleico sobre la inducción de algunos factores neurogénicos de transcripción, en concreto, del NeuroD2. Así, mientras que la expresión de NeuroD1 no presenta variaciones en sus niveles por la presencia del ácido oleico, el NeuroD2 aumenta significativamente en las neuronas tratadas con ácido oleico. Así mismo, la inhibición de la PKC por la esfingosina previene el aumento de NeuroD2 inducido por el ácido oleico. Además, la inhibición de la PKC por péptidos que se actúan como pseudosustratos de la enzima también previene el aumento de expresión del factor de transcripción NeuroD2 (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004). Por consiguiente, tanto el aumento en la expresión de las proteínas marcadoras

de la diferenciación neuronal, GAP-43 y MAP-2, como el aumento en la expresión del factor neurogénico NeuroD2, inducidos por el ácido oleico, están mediados por la activación de la PKC.

1.2.4 Otros factores neurotróficos

Las neurotrofinas han sido los factores neurotróficos mejor estudiados, pero existen otros, como es el caso del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y del factor neurotrófico ciliar (CNTF). La primera observación del comportamiento del CNTF como factor neurotrófico provino de su capacidad para mantener la supervivencia de neuronas parasimpáticas en los ganglios filiares (Stockli y col., 1989). También se sabe que es capaz de mantener la supervivencia en neuronas sensoriales (Simon y col., 1995), del cerebelo y del hipocampo (Larkfors y col., 1994). También previene la degradación de neuronas motoras tras una lesión y disminuye la progresión de enfermedades neuromusculares (Sendtner y col., 1997).

El GDNF fue descrito por primera vez como factor trófico para las neuronas dopaminérgicas (Lin y col., 1993). Ahora se sabe que promueve la supervivencia de muchos tipos de neuronas, tanto del SNC como del SNP (Heuckeroth y col., 1998). También es un agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Lapchak y col., 1997).

Desde hace algún tiempo se sabe que la estimulación eléctrica y la despolarización de la membrana, debidas a altas concentraciones de KCl, inhiben la muerte neuronal (Koike y col., 1989). Estudios recientes indican que la despolarización de la membrana activa una serie de vías de transducción de señales relacionadas con la supervivencia neuronal (Vaillant y col., 1999). Aún se desconoce si estas vías son las mismas que activan las neurotrofinas.

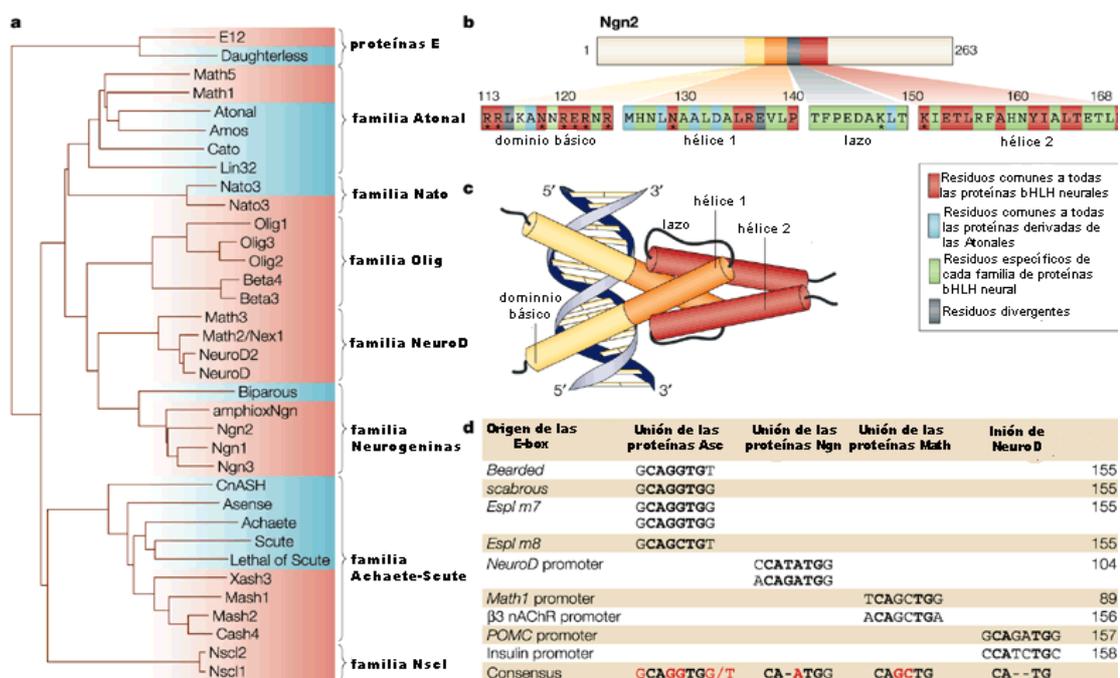
1.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PRONEURALES Y NEURALES

El desarrollo del sistema nervioso implica una fase inicial de crecimiento y división de los precursores y a continuación el proceso de diferenciación de las células postmitóticas. Los progenitores multipotenciales, que están localizados en diferentes posiciones, son capaces de generar los diferentes tipos neuronales y células gliales. Estudios genéticos en *Drosophila* y en modelos de vertebrados han demostrado la existencia de un pequeño número de *genes proneurales*, que codifican factores de transcripción de la familia bHLH y que son necesarios para iniciar el desarrollo de los linajes neurales (Bertrand y col., 2002).

a) Estructura y diversidad de los factores de transcripción bHLH

En *Drosophila* se han identificado cuatro genes proneurales denominados: *achaete (ac)*, *scute (sc)*, *scute letal (lsc)* y *asense (ase)*, cuyos productos de expresión comparten entre ellos secuencias similares. Un gen proneural más lejano, *atonal (ato)*, fue aislado recientemente y tiene también secuencias relacionadas con las de los genes del complejo *achaete-scute (asc)*. Algunos genes relacionados con *asc* y *ato* han sido encontrados en vertebrados (ver esquema 14). En éstos, la familia *asc* incluye al gen *ash1*, la cuál está presente en todas las especies observadas y otros tres genes, que curiosamente, han sido encontrados sólo en una clase de vertebrados (*Mash2* en mamíferos, *Cash4* en pollo y *Xash3* en Xenopus). En vertebrados, el número de genes relacionados con los genes *ato* de *Drosophila* es mayor, pero sólo dos de ellos (*Math1* y *Math5* en el ratón) tienen dominios bHLH suficientemente similares a los *ato* para ser considerados ortólogos. Otros genes relacionados con los *ato* han sido agrupados en distintas familias: familia de las neurogeninas (*ngn*), familia de los NeuroD y familia de los Olig (Kageyama y Nakanishi, 1997; Bertrand y col., 2002). Muchos de los genes proneurales de vertebrados son expresados exclusivamente o principalmente durante el desarrollo del sistema nervioso, lo que indica que las funciones pueden estar conservadas. Algunos de ellos se expresan en precursores neuronales en división y otros en células postmitóticas. En mamíferos, *Mash1*, *ngn/Math4* y *Math1* se expresan por precursores neurales, mientras que

NeuroD y *Math2/Nex-1* se expresan por células mitóticas. *Mash1* regula la diferenciación neuronal en precursores comunes de neuronas y células gliales. Después de *Mash1*, se sugiere que *NeuroD* actúa en la diferenciación neuronal terminal de células postmitóticas. *Mash1* y *NeuroD* se expresan secuencialmente y, en ausencia de *Mash1*, *NeuroD* desaparece. Por esto, la cascada *Mash1-NeuroD* puede regular secuencialmente los distintos estadios de diferenciación neuronal (Kageyama y Nakanishi, 1997). Dos miembros de la familia bHLH, *NeuroD* y *neurogenina*, tienen un papel crucial en la determinación y diferenciación de neuronas en vertebrados, siendo la neurogenina capaz de activar la expresión de *NeuroD*, de forma que el gen de la *neurogenina* actúa antes que el gen *NeuroD* (Liao y col., 1999).



Esquema 14: Estructura y propiedades de las proteínas bHLH. a) Dendrograma de las secuencias de los dominios bHLH de invertebrados (azul) y vertebrados (rojo). Las proteínas han sido agrupadas en distintas familias en base a la similitud de las secuencias de los dominios bHLH. b) Secuencia del dominio bHLH de la neurogenina2 (*ngn*) de ratón. El código de colores indica el grado de conservación de los aminoácidos entre las proteínas bHLH. Los asteriscos marcan los residuos que entran en contacto directo con el DNA. c) Representación esquemática de la estructura de un dímero de bHLH que está acoplado al DNA. La región básica encaja en el surco mayor del DNA, y muchos residuos de esta región están en contacto directo con las secuencias de la *caja E*. Las dos α -hélices de las dos partes forman un haz de 4 hélices. d) Secuencias de las *cajas E* que están presentes en los promotores de los genes diana y son específicamente reconocidos por las diferentes familias de proteínas bHLH neurales. Aunque todas las proteínas bHLH neurales de las distintas familias reconocen un hexámero común CANNTG, también pueden reconocer diferentes bases en las dos posiciones centrales, así como también en posiciones adyacentes. Modificado de Bertrand y col. (2002)

Las funciones de los factores bHLH Mash1, Math1, neurogenina y NeuroD, están reguladas por otro grupo de factores bHLH, Hes1 y Hes5. Estos últimos no solo reprimen la expresión del gen *Mash1* por unión directa a la caja N (*N box*, CACNAG), sino que también inhiben la actividad transcripcional de Mash1 a través de uniones competitivas a los heterodímeros bHLH formados por Mash1, E12 y E47. La vía de señalización Notch inhibe primariamente la diferenciación neuronal a través de la expresión de los genes *Hes1* y *Hes5* (Ito y col., 2003).

Por lo tanto, los genes neurogénicos bHLH de mamíferos se pueden clasificar en dos grupos, basándose en la homología de la secuencia de los patrones de expresión temporal y la ganancia y pérdida de función. El primer grupo, denominado “Factores de Determinación” son los que se expresan durante la neurogénesis temprana, de forma transitoria, en células progenitoras neurales multipotentes y proliferativas del sistema nervioso central en desarrollo y son los factores clave que determinan varios linajes celulares. En este grupo se encuentran: Mash1, Math1 y las neurogeninas 1 y 2. En el segundo grupo, denominado “Factores de Diferenciación”, se encuentran los miembros de la familia NeuroD (NeuroD, NeuroD2 y Nex-1), su expresión es persistente en el sistema nervioso central del adulto y su papel es promover y mantener la expresión de los genes de las neuronas maduras (Uittenbogaard y Chiaramello, 2002).

Los bHLH se caracterizan por tener dos α -hélices separadas por un lazo. Las hélices median en la dimerización y la zona básica adyacente se requiere para la unión con el DNA. Como todos los bHLH, las proteínas proneurales se unen al DNA formando complejos homodiméricos o heterodiméricos. Los factores de transcripción bHLH se unen a secuencias de DNA que contienen un motivo de hexanucleótidos, CANN TG, conocido como *Caja E* (“E-box”). La región básica encaja en el surco mayor del DNA y 7 de los 10 residuos de bHLH, que entran en contacto directo con el DNA, están localizados en esta región y los otros 3 están dispersos por toda la región HLH. Además, 9 de estos 10 residuos están completamente conservados en las diferentes familias de los bHLH neurales y ellos son los que se unen a las secuencias conservadas de las *cajas E* o a los residuos fosfato (ver esquema 14). (Bertrand y col., 2002).

b) Familia *NeuroD*

En vertebrados, los genes bHLH de la familia *NeuroD* tienen características de genes de diferenciación. *NeuroD* se requiere para la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células granuladas en el cerebelo y el

hipocampo. Así mismo, mutaciones de *Math2/Nex-1* o *NeuroD2* en el ratón también producen defectos en la diferenciación y supervivencia de las neuronas cerebelares e hipocampales. Los genes de la familia *NeuroD* actúan en los vertebrados más tardíamente que los genes proneurales, de una manera muy similar a la de *ase* y *cato* en *Drosophila* (Bertrand y col., 2002; Oda y col., 2005).

Los análisis predictivos de la estructura secundaria de los factores de transcripción de la familia NeuroD indican que poseen una estructura en α -hélice, rica en aminoácidos ácidos (25%), denominada TAD1, que se encuentra localizada entre los primeros 40 aminoácidos y una serie de giros β ricos en residuos de prolina y serina, denominados TAD2, que se encuentran localizados entre los aminoácidos 232 y 270 de la secuencia. El dominio TAD1 es específico de Nex-1, mientras que el dominio TAD2 es común a los tres miembros, NeuroD, NeuroD2 y Nex-1. Además, en los tres miembros aparece un dominio rico en ácido glutámico que se encuentra localizado cerca de la zona denominada bHLH (ver esquema 15). La actividad transcripcional de Nex-1 es dependiente de dos dominios de transactivación distintos, TAD1 y TAD2. El dominio TAD2 es esencial para la transactivación mediada por NeuroD y NeuroD2 (Uittenbogaard y col., 2003).



Esquema 15: Estructura de los NeuroD.

Según distintos análisis predictivos, se han descrito varios dominios en los factores de transcripción de la familia NeuroD. La secuencia TAD1 sólo aparece en Nex-1. La secuencia TAD2 es común a los 3 miembros de la familia. En la figura aparecen también indicados el dominio de localización nuclear (NL), así como el dominio bHLH, junto a los 12 residuos de ácido glutámico (E12). Modificado de Uittenbogaard y col. (2003).

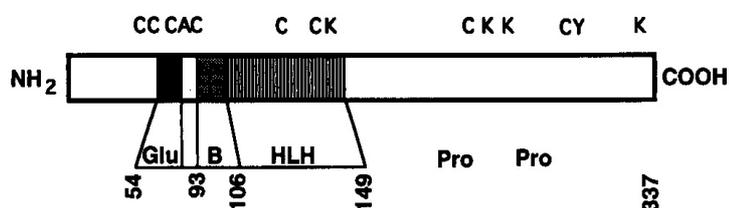
El factor de transcripción NeuroD se expresa ampliamente, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. En el sistema nervioso central del ratón, NeuroD se expresa en células granuladas del cerebelo, en el hipocampo y en las neuronas del sistema límbico. En el sistema nervioso periférico, NeuroD se expresa en neuronas sensoriales, pero no en neuronas autónomas. Además, también se requiere para el desarrollo de las neuronas sensoriales del oído interno en el ratón (Kim y col., 2001). La mutación del gen *NeuroD* en el hombre conduce a ataxia, sordera y a una forma de diabetes dominante denominada Diabetes Juvenil Tipo-6 (MODY-6). Los ratones “*knockout*” (nulos) de *NeuroD* desarrollan diabetes, el sistema nervioso parece normal (Longo y col., 2008), aunque se observan defectos

en las capas granuladas del cerebelo y el hipocampo (Konishi y col., 2000). Recientemente, se ha demostrado que NeuroD regula la expresión del receptor de las neurotrofinas TrkB, a nivel de la transcripción (Uittenbogaard y Chiaramello, 2005).

El factor de transcripción NeuroD2 tiene una expresión restringida al sistema nervioso central y está considerado como el responsable del mantenimiento y diferenciación de las neuronas (Konishi y col., 2000). Esta proteína se expresa no sólo en embriones y neonatos, sino también en adultos, donde se localiza sólo en la corteza cerebral, células piramidales del hipocampo, células granuladas del giro dentado y cerebelo. En el cerebelo se expresa sobre todo en células granulares y en las células de Purkinje. Además, esta proteína puede ser modulada por glicosilación o fosforilación. Así, NeuroD2 contiene múltiples sitios de fosforilación para la proteína kinasa C, la proteína kinasa A, caseína kinasa II y tirosinas kinasas (Kume y col., 1998). Se ha descrito, así mismo, que el NeuroD2 activa el promotor del receptor del fosfatidil inositol-3-fosfato tipo I (IP₃R1) (Konishi y col., 2000). NeuroD2 puede activar un gen marcador unido al promotor de GAP-43 (Kume y col., 1998). En los ratones nulos de *NeuroD2* está alterada la expresión del BDNF y la de miembros específicos de la cascada de las MAP Kinasas (Uittenbogaard y Chiaramello, 2005).

La expresión del gen *Nex-1* en el SNC comienza justo después de que las células neuronales hayan sido determinadas como tales y comienzan de forma paralela la diferenciación neuronal y a la sinaptogénesis. En el cerebro adulto, el *Nex-1* se expresa en regiones del cerebro que generalmente están asociadas con el aprendizaje y la formación de la memoria. *Nex-1* es uno de los factores de transcripción de la familia *NeuroD*, por lo tanto con una estructura del tipo bHLH, con dos α -hélices, un lazo que las une y una zona básica. Además tiene un dominio rico en ácido glutámico, que puede actuar como posible activador transcripcional y un extremo carboxílico rico en prolina. Existen varios sitios de fosforilación por la proteína kinasa A, la proteína kinasa C y proteínas kinasas dependientes de calcio-calmodulina (ver esquema 16). Se ha descrito que durante el desarrollo del cerebro de rata la expresión de *Nex-1* se localiza en el día E17 principalmente en el telencéfalo dorsal. La expresión de *Nex-1* se restringe a células migratorias, presumiblemente postmitóticas, las cuales forman la zona intermedia y la placa cortical. Los primeros transcritos de *Nex-1* se detectan en el día E14 (Bartholoma y Nave, 1994). En ratones nulos de *Nex-1* no se observan anomalías de comportamiento ni motoras, lo que indica que la función de *Nex-1* puede

estar compensada por otros factores de transcripción bHLH (Kume y col., 1998).

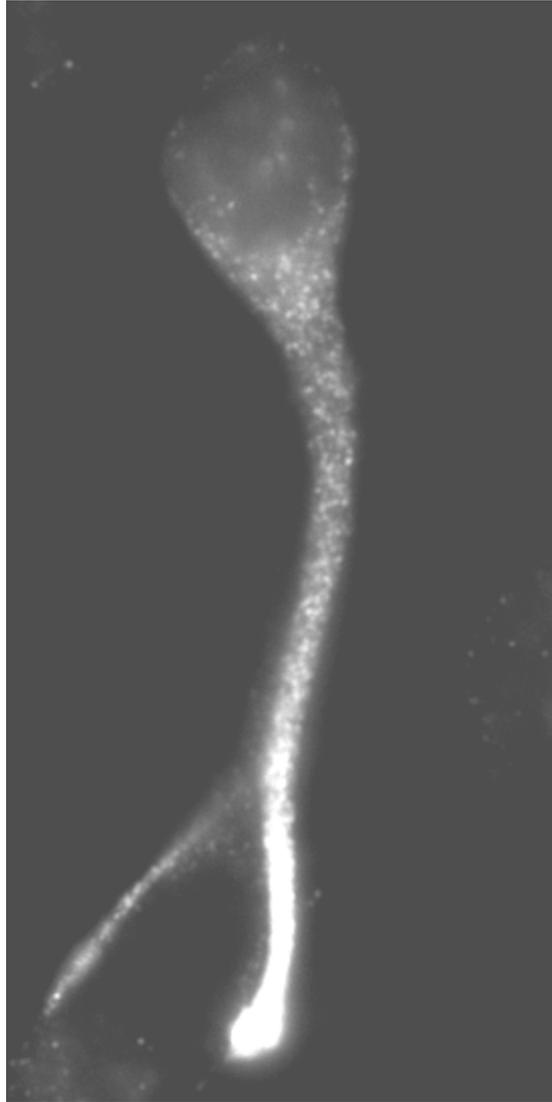


Esquema 16: Estructura primaria de Nex-1.

Estructura predefinida de los 337 aminoácidos de la proteína Nex-1. Glu, dominio rico en ácido glutámico (aminoácidos 54-70); B, dominio básico (aminoácidos 93-106); HLH, dominio hélice-lazo-hélice (aminoácidos 107-149); Pro, dominio rico en prolina. La aproximación de los posibles sitios de fosforilación deducidos de la estructura primaria están indicados en la parte superior de la figura: C, proteína kinasa C; A, proteína kinasa A; K proteína kinasa dependiente de calcio-calmodulina. Modificado de Bartholoma y col. (1994)

En células PC12, Nex-1 juega un importante papel en el crecimiento de las neuritas, así como en la capacidad de regenerar éstas en ausencia de NGF. La expresión constitutiva del Nex-1 en PC12 une la diferenciación neuronal a la parada del ciclo celular, en ausencia del NGF. Esto se lleva a cabo por la activación de genes específicos neuronales, como GAP-43, β III-tubulina, NeuroD y p21^{WAF1} (Uittenbogaard y Chiaramello, 2002). También está descrita, en células PC12, la implicación de Nex-1 en la sinaptogénesis, puesto que su expresión constitutiva produce un aumento de las proteínas sinápticas sinaptotagmina VII y sinaptogirina I, así como las proteínas localizadas dentro de la “densidad postsináptica”, tales como el PSD-95. Nex-1 también se encuentra implicado en la neurogénesis, aumentando proteínas asociadas a los microtúbulos (tau, MAP-1A, MAP-2A/B) y filamentos intermedios. También induce la expresión de factores de transcripción que juegan un papel importante durante la diferenciación neuronal, tales como el Mash-1 (Uittenbogaard y Chiaramello, 2004).

El ratón doble nulo Nex-1/NeuroD muestra un incremento en la muerte celular de las neuronas granuladas inmaduras del giro dentado, acompañado por una reducción significativa del tamaño global del hipocampo (Uittenbogaard y Chiaramello, 2005).



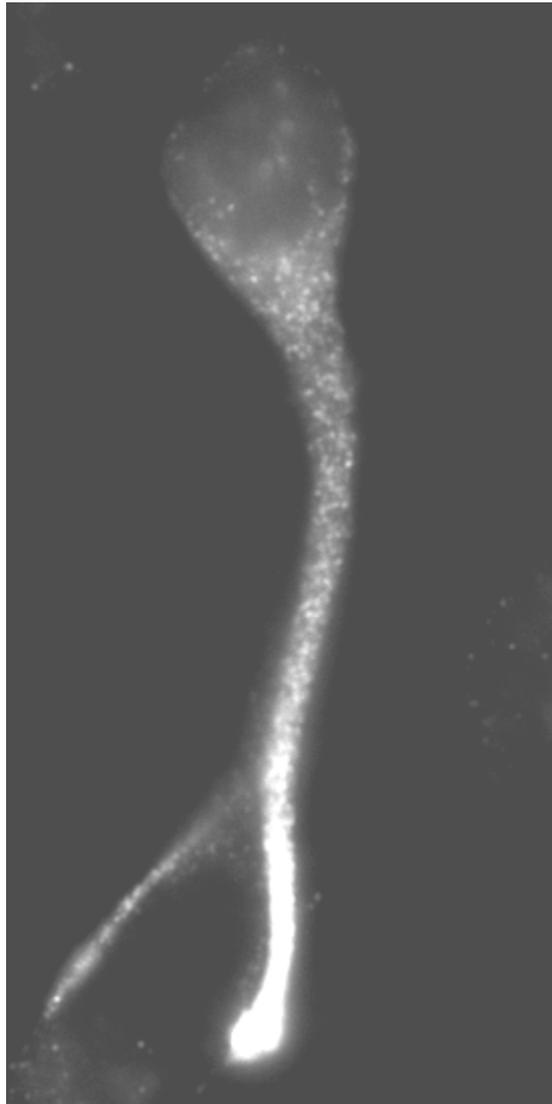
2. PLAN DE TRABAJO

Sin la elaboración de teorías no habría observaciones.

C. Darwin

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

1. Estudio del mecanismo de actuación del ácido oleico en la diferenciación neuronal. Posible implicación de los factores de transcripción bHLH. Papel de los receptores Trk.
2. Estudio del posible efecto del ácido oleico en la migración neuronal.
3. Estudio del posible efecto del ácido oleico en la formación de sinapsis.
4. Estudio de la posible colaboración entre el ácido oleico y las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 en la migración neuronal.
5. Estudio de la posible colaboración del ácido oleico y las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 en la formación de sinapsis.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

*Cualquier tecnología suficientemente avanzada es
indistinguible de la magia.*

Arthur C. Clarke

3.1. MATERIAL

3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario

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

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

Se emplearon fetos de 17,5 días de gestación para la preparación del cultivo primario de neuronas.

El estudio fue aprobado por la Universidad y se llevó a cabo siguiendo la normativa vigente sobre la experimentación con animales y de acuerdo con el reglamento del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

3.1.2. Medios instrumentales

- 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 Crisol (Selecta, Barcelona, España)
- El espectrofotómetro que se ha utilizado es modelo UV 120-02 (Shimadzu Co, Kyoto, Japón). Las cubetas utilizadas fueron de plástico, de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz (Elkay, Boston, U.S.A.).
- Los tejidos se homogeneizaron utilizando un *potter* con un pistilo ajustado suministrado por Afora (Madrid, España).
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman de mesa modelo TJ-6 (Beckman Instruments, Palo Alto, U.S.A.) y una centrífuga Eppendorf, modelo Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- 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 185 (Millipore Ibérica, Madrid, España).

- 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 Acrodisc de 0,2 μm de diámetro de poro (Pall Gelman Laboratory, Michigan, U.S.A.).
- El material de vidrio se esterilizó mediante calor seco, durante un mínimo de 10 horas, en una estufa Selecta modelo S-20, termostatizada a 170°C.
- El agua, el material de disección y el resto de utensilios que requerían asepsia, se esterilizaron por medio de calor húmedo en un autoclave modelo 437 (Selecta)
- Se han utilizado botellas de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono suministradas por la Sociedad Castellana de Oxígeno (Valladolid, España).
- La cabina de flujo laminar utilizada es un modelo TC48 (Gelaire Flor Laboratorios, Malean, U.S.A.)
- Para la tripsinización de las células se ha utilizado un baño Selecta modelo Precistern termostatizado a 37°C. Para otras aplicaciones a diversas temperaturas, se utilizó un baño modelo Haake Fisons GH con termostato acoplado, modelo Haake Fisons D8 (Haake, Berlín, Alemania), un baño termostatizado tipo fuera borda, modelo Tectron 100 (Selecta) y un bloque térmico para el calentamiento de tubos en seco (Selecta).
- Las células se mantuvieron en cultivo en los incubadores de CO₂ modelo IR 1500 Automatic CO₂ incubator (Gelaire Flor Laboratorios) o Galasy CO₂ (RS Biotech, Northants, Reino Unido).
- Las células se observaron periódicamente con un microscopio de contraste de fases, modelo Willovert II pH (Helmunt Hund GMBH, Wetzlar, Alemania) y se contaron con la ayuda de una cámara cuentaglobos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).
- Para la observación de las inmunocitoquímicas se empleó un microscopio invertido de fluorescencia, modelo Eclipse T2000 (Nikon Europe B.V., Badhoevedrop, Holanda) y un microscopio confocal modelo LSM510 (Zeiss) perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer (CSIC/Universidad de Salamanca, España).
- Las imágenes se captaron utilizando un programa informático TCS-SP (Leica Microscopy Systems Ltd, Heerbrugg, Suiza) y una cámara de vídeo digital Leica DC 350 F (Leica Microsystems).
- Los resultados de colocalización se analizaron empleando un programa de análisis de imagen (LSM 5 Image Browser).

- Para los análisis de transferencia tipo *Western* se utilizaron un equipo de electroforesis vertical y un sistema de electrotransferencia modelo “Mini Trans-Blot Transfer Cell”, modelo Mini-PROTEAN3 CELL, conectado a una fuente de alimentación modelo “PowerPac 300” (Bio-Rad).
- Para el revelado de las películas de autorradiografía se utilizó una máquina de revelado Kodak Medical X-Ray Processor 102. El programa de análisis de imagen utilizado fue *NIH Image* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.).
- Para llevar a cabo las reacciones de síntesis de cDNA se utilizó un termociclador modelo Techgene (Techner).
- Para la cuantificación del cDNA se utilizó un fluorímetro modelo Appliskan (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).
- Para los análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa se utilizó un termociclador modelo Mastercycler realplex⁴ (Eppendorf).
- Para la selección de los oligonucleóticos empleados en la PCR cuantitativa se utilizó el programa informático *Primer3*.
- Para analizar los resultados nos ayudamos de computadores Apple-Macintosh (Apple Computer España, Barcelona, España).

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 y crecimiento de los cultivos celulares

- El medio de cultivo para el crecimiento de las células procedió de la casa Sigma, y era tipo DMEM con la mezcla de nutrientes F-12 HAM en los cultivos primarios de neuronas.
- El suero fetal de ternero (FCS), usado para detener la tripsinización, procedió de la casa Gibco (Invitrogen, Barcelona, España).
- Los factores que se añadieron al medio definido para el cultivo de neuronas fueron transferrina, glutamina, piruvato e insulina (Sigma).

- 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 albúmina libre de ácidos grasos empleada en los cultivos, así como el ácido oleico, procedieron de la casa Sigma.
- Las neurotrofinas: factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4/5 (NT-4/5), procedieron de la casa Sigma.
- La membrana utilizada para dializar la albúmina fue adquirida en Sigma, igualmente, el sulfuro sódico empleado para el tratamiento previo de dicha membrana procedió de Sigma. El ácido sulfúrico 96% (v/v) utilizado en el tratamiento de la membrana fue adquirido en Panreac (Panreac Química S.A., Barcelona, España).
- Los filtros utilizados para la esterilización de la albúmina dializada eran de la marca Serum Acrodisc (Pall Gelman Laboratory).

3.1.3.2. Productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas específicas

- 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 cuantificación de proteínas, la solución de 30% acrilamida/Bis (29:1) para la preparación de geles para la electroforesis de proteínas y los marcadores de peso molecular de proteínas procedían de Bio-Rad.
- El N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato amónico (AMPS) utilizados en la preparación de los geles procedieron de la casa Sigma.
- Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm de tamaño de poro (Bio-Rad).
- El metanol utilizado en la preparación del tampón de transferencia tipo *Western* procedía de la casa comercial Merck.
- Para la detección de la proteína α -actinina se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón, para la detección de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2 se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo, para la detección de la proteína doblecortina (DCX) se utilizó un anticuerpo policlonal de cobaya y para la detección del receptor de glutamato, isoformas 2 y 3 (GluR-2/3), se

utilizó un anticuerpo policlonal de conejo. Todos estos anticuerpos primarios que procedían de la casa Chemicon Internacional.

- Los anticuerpos utilizados en la detección de la proteína asociada a los microtúbulos (MAP-2) y de la proteína asociada al crecimiento (GAP-43) eran monoclonales de ratón y procedían de la casa Sigma.
- El anticuerpo primario utilizado en la detección de la proteína GAPDH era monoclonal de ratón y procedía de la casa Ambion.
- El anticuerpo primario utilizado en la detección de la proteína TrkB era monoclonal de ratón y procedía de la casa BD Biosciences.
- El anticuerpo primario utilizado en la detección de la proteína TrkC era policlonal de conejo y procedía de la casa Santa Cruz Biotechnology.
- El anticuerpo primario utilizado en la detección de la sinaptotagmina I era policlonal de conejo y procedía de la casa Synaptic Systems.
- El anticuerpo primario utilizado en la detección de la proteína PSD-95 era monoclonal de ratón y procedía de la casa Affinity BioReagents.
- Los anticuerpos secundarios para los análisis de transferencia tipo *Western* fueron de anti-inmunoglobulina de ratón conjugados con peroxidasa y anti-inmunoglobulina de conejo conjugados con peroxidasa, que procedían de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, U.S.A.). El anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de cobaya conjugado con peroxidasa procedía de la casa Sigma.
- Los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón fueron Alexa Fluor-488 y procedían de la casa Invitrogen.
- Los anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 contra inmunoglobulina de conejo procedían de la casa Chemicon.
- El anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 contra inmunoglobulina de cobaya procedía de Invitrogen.
- Los reactivos de detección empleados formaban un kit de quimioluminiscencia suministrado por la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Los marcadores autofluorescentes empleados procedían de la casa Stratagene.
- Las películas de autorradiografía utilizadas para la determinación de la quimioluminiscencia fueron películas médicas de Rayos-X de la casa Fujifilm (Madrid, España).
- El medio de montaje utilizado para la localización inmunocitoquímica de las proteínas procedía de la casa Molecular Probes, INC. (Eugene, OR, U.S.A.).

- El 4',6-diamino-2-fenil-indol, dilactato (DAPI, dilactato) para el marcaje de los núcleos en las inmunocitoquímicas, procedía de la casa Invitrogen.

3.1.3.3. Productos utilizados en los experimentos para la detección del RNA mensajero

- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd. Pampisford, Reino Unido).
- El reactivo para la extracción de RNA (Trizol Reagent) procedía de Invitrogen Life Technologies (Barcelona, España).
- El dietilpirocarbonato (DEPC) utilizado para inactivar las RNAsas fue suministrado por Sigma.
- El RNAsin utilizado para inhibir las RNAsas fue suministrado por Ambion.
- Los reactivos y productos utilizados para la preparación de soluciones y tampones para Biología Molecular estaban libres de DNAsas y RNAsas y procedían de la casa Sigma.
- La *Turbo DNA-free*, para eliminar el DNA de las muestras de RNA extraído, fue suministrada por Ambion.
- La *SuperScript II Reverse Transcriptase* procedía de Invitrogen.
- Para las reacciones en cadena de la polimerasa se utilizó *DNA polimerasa* de la casa Biotools (Madrid, España).
- Para la cuantificación del cDNA se utilizó el kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA* fue suministrado por Invitrogen.
- Para las reacciones en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa se utilizó el kit *RealMasterMix* suministrado por Eppendorf.

3.1.3.4. Otros productos

- El paraformaldehído y el metanol utilizados para fijar las células procedían de la casa Merck.
- Otros productos y materiales no incluidos en las listas anteriores fueron de calidad estándar de laboratorio.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparación de cultivos celulares

3.2.1.1. Composición de las disoluciones

Todas las disoluciones empleadas se prepararon en agua ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2, excepto en los casos que se indique otro pH, y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro 0,22 μm).

Solución de Earle (EBSS)

NaCl	116	mM
KCl	5,4	mM
NaH ₂ PO ₄	1,0	mM
MgSO ₄	1,5	mM
NaHCO ₃	26	mM
Rojo fenol	10	mg/l
D-Glucosa	14	mM

Solución de disgregación (Solución A)

Albúmina (Fracción V)	3	$\mu\text{g/ml}$
DNAsa tipo I	20	$\mu\text{g/ml}$
EBSS	50	ml

Solución de tripsinización (Solución B)

Tripsina	0,25	$\mu\text{g/ml}$
DNAsa tipo I	60	$\mu\text{g/ml}$
Albúmina (Fracción V)	3	$\mu\text{g/ml}$
EBSS	20	ml

Medio definido para el cultivo de neuronas

DMEM + F-12 HAM (1:1) al que se añadió:

Insulina	5	$\mu\text{g/ml}$
Transferrina	100	$\mu\text{g/ml}$
Piruvato	1	mM
Penicilina G	50	U/ml
Estreptomicina	37,5	U/ml

Glutamina	2,5 mM
Albúmina	2 % (p/v)

Tampón Elliot

NaCl	122 mM
KCl	4,8 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,3 mM

Preparado en tampón fosfato sódico 10,8 mM, pH 7,6

3.2.1.2. Preparación de la solución de albúmina

Se preparó la albúmina utilizada en los medios de cultivos a partir de una solución madre de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 10% (p/v) en tampón Elliot. Se ajustó su pH a 7,37 y se dializó durante 24 horas en Elliot, en agitación, con tres renovaciones del tampón. Después de la diálisis se filtró la albúmina con un filtro especial de la marca Serum Acrodisc (Pall Gelman Laboratory) y se almacenó en alícuotas a -20°C. La membrana de diálisis se trató siguiendo las instrucciones del fabricante y aclaró con agua ultrapura durante 15 minutos.

3.2.1.3. Preparación del cultivo primario de neuronas

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

Tras limpiar los animales con etanol al 70%, se decapitaron y se les extrajo el cerebro, del que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Los cerebros se colocaron en una placa Petri que contenía solución A. El tejido se troceó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g. El tejido se incubó durante 15 minutos a 37°C, en la solución B que contenía tripsina. Posteriormente, se detuvo la tripsinización, añadiendo al tejido disgregado medio de cultivo más suero al 10%. Finalizada la tripsinización, el tejido se centrifugó durante 5

minutos a 500 x g. Tras retirar el sobrenadante, el tejido se resuspendió en la solución A y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada. Se recogió el sobrenadante y el tejido se sometió una vez más al tratamiento anterior. Se reunieron los 2 sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos, con aceleración y desaceleración suaves. Las células obtenidas se resuspendieron en medio definido. Una pequeña alícuota de esta suspensión celular se mezcló con azul de tripano al 0,2% (p/v) para la determinación del número de células y su viabilidad.

A continuación, las células se sembraron en placas Petri recubiertas con poli-L-lisina ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), en presencia de los distintos medios de cultivo, según se indica en cada experimento, a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/ cm^2 (excepto en los experimentos que se indique otra densidad) y se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO_2 . En estas condiciones se obtienen cultivos de neuronas de una pureza del 90-95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico contra el neurofilamento (Vicario y col., 1993).

3.2.2. Tratamientos celulares

En todos los experimentos las neuronas procedentes de fetos de 17,5 días de gestación se sembraron en medio definido, cuya composición fue descrita anteriormente. En los casos que se indica, una vez que las células se habían adherido a la placa, se añadieron al cultivo los siguientes factores: el factor de crecimiento nervioso (NGF, 100 ng/ml), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF 50 ng/ml), la neurotrofina 3 (NT-3, 50 ng/ml), la neurotrofina 4/5 (NT-4/5 50 ng/ml), o el ácido oleico (100 μM).

Las distintas neurotrofinas, NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5, fueron disueltas en medio definido. El ácido oleico se disolvió en albúmina al 2% (p/v).

3.2.3. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo *Western*

La separación electroforética de las proteínas presentes en las muestras se llevó a cabo mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (SDS-PAGE).

I. Extracción de proteínas

Como paso previo a la extracción de proteínas las células se lavaron varias veces con tampón fosfato salino (PBS).

Tampón fosfato salino (PBS)

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄	6,8 mM
KH ₂ PO ₄	1,7 mM
Ajustado a pH 7,4	

Las proteínas procedentes de las células en cultivo se recogieron en solución de extracción de proteínas: Tris 5mM a pH 6,8, que contenía SDS al 2%, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, antipaína 0,5 µM e inhibidor de tripsina 0,5 µM y aprotinina 3 U/ml. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 x g. Se recogió el sobrenadante y se mantuvo a -70°C hasta el momento de su utilización.

II. Cuantificación de proteínas

Se siguió el método de 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 Bradford (BioRad). Se agitó la mezcla en el vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se procedió a medir la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se determinó extrapolando en una recta patrón, realizada simultáneamente, con disoluciones entre 1 y 25 µg/ml de albúmina sérica bovina, en presencia de una concentración de SDS 0,002% (p/v), igual a la de las muestras.

III. Preparación de los geles

Los geles usados para la electroforesis fueron de poliacrilamida, de un grosor de 1,5 mm.

Gel de concentración (4%)

Tris-HCl, pH 6,8	0,125 M
Acrilamida/Bis	4% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
Persulfato de amonio (AMPS)	0,05% (p/v)
N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED)	0,05% (p/v)

Gel de separación (7,5%)

Tris-HCl, pH 6,8	0,375 M
Arcrilamida/Bis	7,5% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
Persulfato de amonio (AMPS)	0,05% (p/v)
N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED)	0,05% (p/v)

IV. Preparación de las muestras para la electroforesis

Una vez calculada la concentración de proteínas en las muestras, se resuspendieron 90 µg de proteínas en tampón de carga (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS al 2% (p/v), glicerol al 20% (p/v), azul de bromofenol 0,125 M y 1,4-ditiotreitol 3 mM). Se hirvió la mezcla durante 5 minutos y, tras realizar una rápida centrifugación, se mantuvieron en hielo. El tampón utilizado para la electroforesis fue: Tris 0,025 M, glicina 0,19 M a pH 8,6, con SDS al 0,1% (p/v). Las muestras se cargaron en los distintos pocillos del gel y se incluyeron marcadores de las siguientes masas moleculares: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa.

V. Electroforesis de proteínas

Se realizó a temperatura ambiente y a un voltaje de 80 V durante el tiempo que las proteínas tardaron en abandonar el gel de concentración (aproximadamente 30 minutos). A continuación se aplicó un voltaje de 100 V en el gel de separación, durante aproximadamente 90 minutos.

VI. Electrotransferencia

Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro. Para ello, se aplicó un voltaje de 50 V durante 2 horas, a temperatura ambiente, ó 20 V durante 12 horas a 4°C, de manera que las proteínas van pasando a la membrana atraídas por la carga

eléctrica positiva, quedando inmobilizadas en la misma posición que ocupaban en el gel.

Tampón de transferencia pH 8,6

Tris	0,025 M
Glicina	0,19 M
SDS	0,1 % (p/v)
Metanol	10% (v/v)

VII. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana

La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante tinción con Rojo Ponceau al 10% (v/v). A continuación, la membrana se bloqueó, durante 1 hora a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo al 10% (p/v) en PBS.

VIII. Inmunodetección

Tampón Tris salino (TBS), pH 7,5

Tris-base	20 mM
NaCl	500 mM

Solución de anticuerpos

FCS	10 % (v/v)
Azida sódica	0,02 % (p/v)
Lisina	0,1 M

Para detectar las proteínas en la membrana utilizando el kit de quimioluminiscencia se realizaron una serie de incubaciones con distintos anticuerpos a temperatura ambiente, durante 3 horas, o a 4°C, durante 12 horas, seguidas de varios lavados con tampón Tris salino (TBS) que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v). La membrana se incubó con el anticuerpo primario policlonal contra NeuroD1 (1:500), NeuroD2 (1:500), TrkC (1:500), sinaptotagmina I (1:500), GluR-2/3 (1:500), DCX (1:1000), o con un anticuerpo primario monoclonal contra GAPDH (1:2000), α -actinina (1:500), TrkB (1:500), todos en solución de anticuerpos. La α -actinina y la GAPDH se utilizaron como control de carga.

A continuación, se realizó una incubación con el anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de ratón (1:5000), contra la inmunoglobulina de conejo (1:10000) o contra la inmunoglobulina de cobaya (1:5000), conjugados con peroxidasa, a temperatura ambiente durante 1 hora. Estos anticuerpos secundarios se diluyeron en TBS. Posteriormente, la membrana se incubó durante un minuto con sustratos de la peroxidasa. En este momento tiene lugar una reacción de reducción del H_2O_2 en presencia de la peroxidasa. El luminol presente en la reacción se oxida, dando lugar a un compuesto que emite luz. Posteriormente, la membrana se expone a una película de autorradiografía que detecta la señal quimioluminiscente.

Las películas se revelaron, obteniéndose la banda correspondiente a la proteína objeto de estudio. Posteriormente se escanearon y se cuantificaron las bandas mediante el programa de análisis de imagen *NIH Image*.

3.2.4. Localización de proteínas celulares mediante inmunocitoquímica

Con el objetivo de determinar la localización celular de las proteínas PSD-95, GluR-2/3, sinaptotagmina I y DCX, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Después de varios lavados con PBS, se permeabilizaron con metanol a $-20^{\circ}C$ durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS y se realizaron sucesivas incubaciones seguidas de varios lavados con este tampón. Primeramente se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra PSD-95 (1:200) o con un anticuerpo primario policlonal contra GluR-2/3, sinaptotagmina I ó DCX, durante 12 horas, a $4^{\circ}C$.

A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón Alexa 488 (1:500), o con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de conejo conjugado con Cy3 (1:500) o con un anticuerpo policlonal de cobaya Alexa 488 (1:1000), durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la doble inmunocitoquímica de PSD-95 y sinaptotagmina I, se incubaron las células con una mezcla de los anticuerpos primarios contra inmunoglobulina de ratón de PSD-95 (1:200) y contra inmunoglobulina de conejo de sinaptotagmina (1:200), durante 12h a $4^{\circ}C$. A continuación, las células se incubaron con una mezcla de los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón Alexa 488 (1:500) y contra inmunoglobulina de conejo Cy3 (1:500) durante 1 hora, a temperatura ambiente.

Todos los anticuerpos utilizados en este caso se diluyeron en una solución de anticuerpos que contenía Triton X-100 al 0,1%.

En todos los casos, con objeto de visualizar los núcleos, las células se incubaron con DAPI (2,5 µg/mL en PBS) durante 5 minutos.

Seguidamente, en todos los casos, las células se trataron con un medio que preserva la fluorescencia (*SlowFade Gold Antifade Reagent*) y se cubrieron con un cubreobjetos. La colocalización se analizó utilizando un microscopio confocal.

3.2.5. Análisis del mRNA por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y no cuantitativa.

El cDNA del mRNA que codifica el factor de transcripción Nex-1 procede de la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), número de identificación: NM_001109237 (ver esquema 17).

1	cacttttttag	agatcaatga	gatagtgcag	atacacacag	atctagaggc	tccaggagac
61	gatgcgacac	tcagcctgaa	aagatttga	agatccaaaa	tgaaaactga	ttattqaatg
121	aaattaaaac	ctaaggtaaa	ttaaggttaa	agaacatgt	taacactacc	gtttgacgag
181	tctgtcgtaa	tgcccgaatc	ccagatgtgc	agaaagtttg	ctagacaatg	tgaggaccag
241	aaacaaatta	agaaaccaga	gagttttcca	aaacaagttg	tccttcgagg	aaagagcatc
301	aaagggccc	ccggagaaga	aaccgagaaa	gaggaggagg	aggaagacag	agaggaagaa
361	gatgagaatg	gcttgcccag	aaggagggt	ctcaggaaaa	aaaagaccac	caaactacga
421	ttggaaaagg	tcaagttcag	gagacagga	gccaatgcac	gagagagga	ccggatgcac
481	ggcctcaatg	atgctctgga	caatttgcga	aaagtgggcc	cctgttactc	taaaacccaa
541	aaactgtcca	aatagaaac	ttacggctg	gccaataatt	acatctgggc	actttctgaa
601	attctgagga	ttggcaagag	accggatctg	ctcacgttcg	tccaaaactt	atgca aaggt
661	ctttctcagc	caactacaaa	cttgggtggca	ggctgcttac	agctcaacgc	caggagtttc
721	ctgatgggtc	aggggtggga	ggctgcccac	cacacaaggt	caccctactc	cacattctac
781	ccaccctacc	acagccctga	gctggccact	ccccagggc	atgggactct	tgataattcc
841	aagtccatga	aaccctacaa	ttactgcagt	gcatatgaat	ccttctatga	aagtacttcc
901	cctgagtggtg	ccagccctca	gtttgaaggt	cccttaagtc	ctccccaat	taactataat
961	gggataat	ccctgaagca	agaagaacc	ttggactatg	gcaaaaatta	caattatggc
1021	atgcattact	gtgcagtgc	accaggggt	ccccttgggc	agggtgccat	gttcaggttg
1081	cccaccgaca	gccacttccc	ttacgactta	catctgcgca	gccaatctct	caactatgca
1141	gatgaattaa	atgcagtttt	tcataattaa	tgaggaaaat	gaaaataaac	agtggtcatt
1201	cacctcccac	tctaattaag	acaaagcaga	tgcttctggg	ctgagtaatt	ggcacaactc
1261	tatctaaggt	gtttactagt	ttctgaagtg	tgtttcaaag	attgtgaaca	ttttctatgt
1321	cataataaat	ctctttctgt	atgagaat	cttttctctc	cctcttctct	gtatcacact
1381	gtgatgat	tctctctctc	tcttactggc	aggatttttt	ctttcttgtt	ttagttcctt
1441	tcaaatccc	ttaatttggg	taacaaggcg	tcgaagagta	tgttgaggag	taaagacagc
1501	acacggcata	cttcgggtgc	tatttcgggt	gtacagttat	gatgaagatg	catgttataa
1561	aaaaatcaga	taagtaaaat	gtgtttataa	ttactaggac	tcataatagt	atctctgaaa
1621	tttttaggtt	ttaaactatc	aagagctaac	cctgaaatta	aaagacgcat	tcgaggatgt
1681	acaacaatat	caaaagctat	gcaattttct	gtttattagg	gacaaaacta	aatgtaatga
1741	ctattctctc	tcaagcgttt	tccagaggag	gaaacacagt	atttggggga	ggttatcagt
1801	gtcataat	ggggacaatt	aattcagtc	caaagaaaaa	tattagcact	tgttttgtat
1861	tgttcaggat	tcttctgtac	aggtttgtta	cggtgtataa	ttgtgttttc	catctagag
1921	tttaaaagca	attaaacata	gatatttcca	ctt		

Esquema 17: Secuencia del mRNA predefinido del Nex-1. Bases de datos *GenBank*

Diseñamos los oligonucleótidos específicos que actuaron de cebadores en la reacción de la PCR cuantitativa (en color azul); en rojo está marcada la parte de la secuencia que se amplificará posteriormente. También diseñamos oligonucleótidos específicos que actuaron como cebadores en la reacción de la PCR “standard” (en color verde); se subraya la parte de la secuencia que se amplificará posteriormente.

El cDNA del mRNA que codifica el receptor TrkA procede de la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), número de identificación: M85214 (esquema 18).

Diseñamos los oligonucleótidos específicos que actuaron de cebadores en la reacción de PCR (en color azul); en rojo está marcada la parte de la secuencia que se amplificará posteriormente.

1	gcggcggcgg	ccaggagcgc	acggacggcc	gcgcggcccc	agctagggcg	gcgccgcgc
61	gatgctgcga	ggccagcggc	acgggcagct	gggttggcat	cgccccggcg	cggggctagg
121	cggtctggtg	acttcgttga	tgttggtttg	tgcttgccgc	gcatcctgtc	gtgagacctg
181	ctgtcccgtg	ggccccctcg	ggttgcgctg	caccagggca	gggacctga	ataccctccg
241	cggcctgcgg	ggcgcggga	acctgacgga	gctctatgtg	gaaaaccagc	gggatctgca
301	acgcctggag	tttgaggacc	tgcaggccct	gggggagttg	agaagcctaa	ccatcgtgaa
361	gagtggctc	cgctttgtgg	ccctgatgc	cttcatttc	accctcgge	tcagtcaact
421	gaatctctcc	tccaatgctt	tggagtcctc	ctcctggaaa	actgtgcagg	gcctctccct
481	acaggacttg	accctgtcag	ggaaccact	gcactgttcc	tgtgccctat	tgtggctcca
541	gcgctgggag	caggaggatt	tgtgtggtgt	gtatacacia	aaagctcagg	gctctgggtc
601	tggagaccag	ttcctcccac	tgggacacia	caacagttgt	ggtgtaccct	cagtgaagat
661	ccagatgccc	aatgactctg	tggaaatggg	ggatgacggt	tttctgcagt	gccaggtgga
721	ggggcaggcc	ctacagcagg	ctgactggat	cctcacagag	ctggaaggga	cagccaccat
781	gaagaaatct	ggagatctgc	catccctggg	gctaactctg	gtcaatgtca	ccagtgatct
841	caacaagaag	aatgtgacgt	gctgggcaga	gaatgatgtg	ggccgggctg	aggtctctgt
901	ccaagtccag	gtctccttcc	cagccagtgt	gcatctgggg	aaagc gtgg	aacagcatca
961	ctggtgcatt	cccttctctg	tggacgggca	gccagcaccg	tccttgcgct	ggttcttcaa
1021	cggtctgtg	ctcaatgaga	ccagcttcat	cttcaactcag	ttcttggagt	cagcgtgac
1081	caatgagacc	atgggcatg	gctgccttcg	cctcaaccag	cccacgcatg	tcaacaacgg
1141	gaactacacc	ctgctggctg	ccaaccctca	tggccaggct	gctgcctcca	tcattggtgc
1201	ctttatggac	aacccttttg	agttcaacc	tgaggacccc	atccctgtct	ccttctcgcc
1261	agtggacact	aaacgacat	caagagaccc	agtggagaag	aaggacgaaa	caccttttgg
1321	ggtctctgtg	gctgtgggct	tggcctctc	cgccgcctc	ttcctttctg	ccctcctcct
1381	agtgctcaac	aaatgtggac	agaggagcaa	atattggatc	aaccgcccgt	ctgtgctggc
1441	gccagaggat	gggtgggcca	tgtccctaca	cttcatgaca	ctgggtggca	gttctctttc
1501	cctactgag	ggcaaaggct	cggactcca	gggccacatc	atggagaacc	cacagtactt
1561	cagtataacc	tgtgtccacc	atatcaagcg	ccaggacatc	attctcaagt	gggagctagg
1621	ggaaggagcc	tttggaaagg	tctttcttgc	tgagtgcctac	aaccttctga	atgatcagga
1681	caagatgctg	gtggctgtca	aggcactgaa	ggagacatct	gagaatgctc	gtcaggactt
1741	ccatcgtgag	gcagagctgc	tcacatgctc	acagcaccaa	cacatcgtac	gcttctttgg
1801	agtctgcacg	gaggggtggc	cattgctcat	ggtctctcag	tacatgcgcc	atggggacct
1861	caaccgttcc	ctccggtccc	acggacctga	tgcaaaactg	ctggctggcg	gcaaggatgt
1921	ggctcctggt	cctttgggccc	ttgggcagct	tctggctgtg	gctagccagg	tggctgctgg
1981	tatgggtgac	ctagccagcc	tgcactttgt	gcaccgggac	ctggccacac	gcaactgtct
2041	ggtgggtcag	ggactagtgg	tcaagattgg	agacttcggc	atgagcaggg	acatctacag
2101	cacagactac	taccgtgtgg	gaggtcggac	catgctgccc	atccgctgga	tgccctccaga
2161	gagcactctc	taccgcaagt	tacgacccga	gagtgatgtg	tggagcttcg	gggtggtgct
2221	ctgggagatc	ttcacctatg	gaaagcaacc	ctgggtaccag	ctctccaaca	ctgaggcgat
2281	cgagtgcata	acgcaggggc	gggagctgga	gcccgcggcg	gcctgccctc	ctgatgtcta
2341	gcacatcatg	cgcggctgct	ggcagctgga	gcccacaacag	cgccctcagc	tgaaggatgt
2401	gcacgcgcgg	ctgcaggcct	tggcacaggc	gccaccgagt	tacctggagc	ttctgggcta
2461	ggagtctgga	tgtcaggcta	ccctgggctc	cctcagcgcc	cagcagctat	cacactcaag
2521	tcttaccctc	agcatgtgga	ggggaccagc	aggcggggag	cagaggggtg	ctttgcttca
2581	tggccagcat	ccatcataat	agcaattata	tttattatcc	ctgaaaaaaa	aaa

Esquema 18: Secuencia del mRNA predefinido del TrkA. Bases de datos *GenBank*

```

1 atctgtgtgc gagtgcgtgt gcgtgcgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt
61 gtgtgagcgt gtgtgttttt ggatttcata ctaattttct ggagtttctg cccctgctct
121 gcgtcagccc tcacgtcact tcgccagcag tagcagaggc ggcgggcgcc gccggttaga
181 gccagtcgc tgcctcagct gctgttgctg ctctctcgcc gctctgctcc ctgctgctggc
241 tacgggagc cgggggagcc gcgccagacg tctctgtgg ccagggccgg cactgtcctg
301 ctaccgcagt tgctcccag cctgaggtg cgcaccgata tcgatatccg tgccggttta
361 gcggttctgc gacccaaaga gtccaggag agccaccgag tggcgctcg cgataggac
421 catgcagccg ccttgtgctg tggagcagcg gccctgatg tccagccac tgtgaacct
481 ttggtcagcg ccaacctgct cagccccagc accgacaggc tcagcctctg gtacgctct
541 ctcgccggga gccatcagc accaagcagc aagaggctc agggaaggcc tcccctctc
601 ggcgggggac gcctggctca gcgtaggag acgcactctg actgactggc actggcagct
661 cgggatgtcg cctggccga ggtggcatgg accgcctatg gcgctgctc ggggcttatg
721 cttgctggtc ttgggcttct ggagggttc tcttgctgc cccatgtcct gcaaatgcag
781 ctaaccatgg atttgggtga ccgagccttc tctggcctc gtggcatttc cgggttga
841 acctaacagc attgaccag agaacatcac gaaattctc attgcaaacc agaaaagggt
901 agaaatcatc aatgaagatg atgtcgaagc ttacgtggg ctgaaaaacc ttacaattgt
961 ggattccggc ttaaagttt tggttacaa ggctttctg aagaaccgca acctgcccga
1021 catcaatttc actcgaaca agctgacgag ttgtccag agacatttc gccacttga
1081 cttgtctgac ctgatcctga cgggtaatcc gttcacgtgt tctgtgaca tcatgtggct
1141 caagactctc caggagacga aatccagccc cgacactcag gatttattt gcctcaatga
1201 gagcagcaag aataccctc tggcgaacct gcagattccc aattgtggtc tgccgtctgc
1261 acgtctggcc gctcctaacc tcacggtgga ggaagggaag tctgtgacca ttcctgacg
1321 cgtcgggggt gacccgctcc ccaccttga ctgggacgtt gggaatttgg tttcacaaca
1381 catgaatgaa acaagccaca cacagggtc ctaaggata acaaacatt catcggatga
1441 cagtgggaaa caaatctct gtgtggcaga aaacctctc ggagaagatc aagactctgt
1501 gaacctcact gtgcattttg caccaacct cacatttct gaatctcaa cctcagacca
1561 ccaactggtc atcccattca ctgtgagagg caacccaag ccagcacttc agtggttcta
1621 caacggagcc atactgaatg aatccaagta catctgtacc aaaatacacg tcaccaatca
1681 cacggagtac cacggctgcc tcagctgga taacccact catatgaata atggagacta
1741 cacctaatg gccaaagt aatatggaa ggacgagaga cagattctg ctcaactcat
1801 gggccgctc ggagttgact atgagacaaa ccaaaattac cctgaagtc tctatgaaga
1861 ctggaccag ccaactgaca tcggggatac taaaaacaaa agtaatgaga tcccctccac
1921 ggatgttct gaccaaacca atcgggagca tctctcggtc tatgtgtggg tgggtattgc
1981 cctgtgtgta ggattctgcc tctgtgtgat gctgctctg ctcaagtgg cgagacatc
2041 caagtttgca atgaaaggcc cagcttccgt catcagcaac gacgatgact ctgccagccc
2101 tctccaccac atctcaacg ggagcaaac tccgtcttct tcggaggggc ggcccgatgc
2161 tgtcatcatt gggatgacca agatccctgt cattgaaac cccagacta tcggtatcac
2221 caacagccag ctcaagccgg acacatttgc tcagcacatc aagagacaca acatcgttct
2281 gaagagggag cttgggagaag gaccccttgg gaaagtctc ctagcggagt gctataacct
2341 ctgcccagc caggataaga tcctggtggc cgtgaagacg ctgaaggacg ccagcgacaa
2401 tgctcgcaag gactttcacc gcgaagccga gctgctgacc aacctccagc acgagcacat
2461 tgtcaagttc tacggtgtct gtgtggaggc cgaccactc atcatggtct ttgagtacat
2521 gaagcaggg gacctcaaca agttccttag ggcacacggg ccagatgacg tgcgtgatgg
2581 agagggtaac ccgccaccg agctgacgca gtgcagatg ctgcacatcg ctccagcaat
2641 cgcagcaggc atggtctacc tggcatccca acacttctg caccgagacc tggcaccgg
2701 gaaactgctg gtaggagaga acctgctggt gaaaattggg gacttcggga tgtcccggga
2761 tgatatacag accgactact accgggttgg tggccacaca atggttccca tccgatggat
2821 gcctccagag agcatcatgt acaggaaatt caccaccgag agtgacgtct ggagcctggg
2881 agttgtgttg tgggagatct tcacctacgg caagcagccc tgggatcagc tatcaaacaa
2941 cgaggtgata gaatgcatc cccagggcag agtccctcag cggcctcgca cgtgtccca
3001 ggaggtgtac gagctgatgc tgggagctg gcagcgggaa ccacacacaa ggaagaacat
3061 caagaacatc cacacactcc ttcagaactt ggccaaggcg tcgccctgct acctggacat
3121 cctaggctag actccctct ctcccagacg gcccttccca aggcacccct cagacctctt
3181 aactgccgct gatgtcacca ccttgcctgc ctctgctctg acagtgtta caagacaagg
3241 agcgctctc cggggtgagg cagtgcgcac tccccatcc acagacagta tccactgctc
3301 tctggctttg tcgctttctc tccctttggt ttgtttctt cttttgcca ttctccattt
3361 atttatttat ttatttat ttatttat ttatttat ttatttat ttatttat
3421 atttatttat ttatttat gtcttactg ctctcatggt ctccgctct ctccctgacc
3481 gatctggctt ctgtactcct atcactgta catagacaaa ggccttaaca accctgattt
3541 gttatatcag cagacactcc agtttgcca ccacaactaa caatgccttg ttgtattcct
3601 gcctttgatg tggatgaaaa aaagggaaaa aaaataatca aacatctgac ttaaaccgctc
3661 acttccgatg tacagacacg gggcgtttct atggattcac ttctatctat ctatttattt
3721 atttatctat ttatttat ctctctttg ttgttttccg gtggttttag cctgtgtatg
3781 agaagggaaa gtcatgtaca gtctgggaaa actttatctg tgggaaatgg aaaccagaag
3841 gggaaagaag ctttaccata aagcacagca ggagtgagac acagaaaagc cattggatca
3901 gccagagtcc gtctgcata ggaaaaccca gcagccatca ggctggagga tcatgttccg
3961 cactgacccc cgaggacct tctgagagg acacagaatg ttaacctctg catcatggac
4021 acagtttccg atcacagata ctggccttca atggaaaaaa aaaaaaaaaa aaccagata

```

Esquema 19: Secuencia del mRNA predefinido del TrkB. Bases de datos *GenBank*

El cDNA del mRNA que codifica el receptor TrkB procede de la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), número de identificación: NM_012731 (esquema 19).

Diseñamos los oligonucleótidos específicos que actuaron de cebadores en la reacción de PCR (en color azul); en rojo está marcada la parte de la secuencia que se amplificará posteriormente.

El cDNA del mRNA que codifica el receptor TrkC procede de la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), número de identificación: NM_019248 (esquema 20).

```

1  acccccctct cctctcctcc tcctcctctt ttttagaagc agcgatcggg gatggatgtc
61  tctctttggc cagccaagtg tagtttctgg cggattttct tgctgggaag cgtctggctg
121 gactatgtgg gctccgtgct ggcttgccct gcaaatgtg tctgcagcaa gactgagatc
181 aattgccggc ggccggacga tgggaacctc tttcccctcc tgggaaggca ggattcaggg
241 aacagcaatg ggaacgccag catcaacatc acggacatct caaggaatat cacttccata
301 cacatagaga actggcgggg cctgcacaca ctcaatgctg tggatatgga gctctacacg
361 ggactccaga agctgacatc caagaattct ggactccgga atattcagcc cagagccttt
421 gctaagaatc cccacttgcg ttatataaac ttgtcaagta accggctcac cacactctcc
481 tggcagctct tccagacgct gagtcttcgg gaattgagac tggagcagaa cttctcaac
541 tgcagctgtg acatccgctg gatgcagctg tggcaggaac agggggaggc acggctggac
601 agccagagcc tctactgcat cagtgctgat ggctcccaac tcccctctt ccgcatgaac
661 atcagtcagt gtgatctccc tgagatcagt gtgagtcacg tgaacctgac tgtccgagaa
721 ggagcaaatg ctgtaactac ttgtaatggc tctggctctc ctttgcctga gactggctgg
781 atagtaccg gactgcagtc catcaatact catcagacca atctgaactg gaccaatgta
841 catgccatca acttgaccct ggtgaatgtg acgagcgaag acaatggttt caccctgacg
901 tgcattgcag agaacgtggg gggcatgagc aatgccagcg ttgctctcac tgtctactac
961 cctccaagtg tggtagctt ggtggagcct gaggtacgcc tggaacattg cattgattt
1021 tgggtgctg gcaacccgac acccaagctg cattggctgt acaatggaca gccactgagg
1081 gaatccaaga tcattcatal ggactactac caggaggggt aagtctcaga gggctgctg
1141 ctcttcaaca agcccaccca ctacaacaat ggaactaca ccctcattgc taagaatgcc
1201 ctgggacacag ccaaccagca catcaacggc cacttctta aggagcctt ccagagagc
1261 acagatttct ttgactttga gtctgatgcy agccctacac ctctatacac tgtgaccac
1321 aaaccagagg aagacacttt tggggtgtcc atagcagttg gacttgctgc ttttgcctgc
1381 gtccttctgg tggctctctt tatcatgatc aacaagtacg gtcgacggtc caaatttggg
1441 atgaagggtc ctgtggctgt taccagtggt gaggaggact cagccagccc actgaccat
1501 atcaaccatg gcatcactac accctcatcg ctggatgctg ggcgggatac agtggcatt
1561 ggcatgactc gaattccagt cattgagaac cccaatatt tccgtcaggg acacaattgc
1621 cacaagccag acacatatgt tcaacacatc aagaggagag acatcgtgtt gaagagagaa
1681 ctgggtgagg gagcctttgg aaaggtcttc ctggctgagt gctacaatct aagcccacc
1741 aaagacaaga tgcttgggct agtgaaggcc ctgaaggatc ccaccttggc tgccaggaag
1801 gatttcaga gggaggccga gctgctcact aacctgcagc atgagcatat tgtcaaattc
1861 tatggggtct gtggtgatgg ggatccactc atcatggtct ttgaatacat gaagcatgga
1921 gacctgaaca agttcctcag ggcccatggg ccagatgcca tgatccttgt ggatggacag
1981 ccacgccagg ccaaggggga gctaggactc tcccagatgc tccacatcgc cagtcajata
2041 gctccggca tgggtgactt ggctcccag cactttgtgc accgggacct ggccaccagg
2101 aactgcctag ttggagccaa ccttctagtg aagattggag attttggcat gtcaggagac
2161 gtctacagta ctgattacta cagggtggga ggacacacca tgctccccat ccgctggatg
2221 ccacctgaaa gcatcatgta ccggaagttt accacagaga gtgatgtgtg gagcttggg
2281 gttattcttt gggagatctt tacctatggg aagcaacctt ggttccagct ctctaacaca
2341 gaggtcattg aatgcatcac ccaaggccgt gtcttgagga gacccagagt ctgccccaaa
2401 gaagtatatg atgtcatgct ggggtgctgg cagaggggaa cacaacagcg actgaatatt
2461 aaggagatct acaaaatcct ccattgctttg ggaaggcca cccaatcta cctggacatt
2521 cttggctagt ggtgactggg ggccaagcgt ttatactctg ttgctcctc tctcctgcc
2581 tcatctcttc ttttctctca cctcaactcc tttcgtccat ctttgaccga aacgaacatc
2641 ttcatataaa ctcaagtggc tgctacacat acaacactga at

```

Esquema 20: Secuencia del mRNA predefinido del TrkC. Bases de datos *GenBank*

Diseñamos los oligonucleótidos específicos que actuaron de cebadores en la reacción de PCR (en color azul); en rojo está marcada la parte de la secuencia que se amplificará posteriormente.

El cDNA del mRNA que codifica la proteína β -actina procede de la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), número de identificación: BC063166 (esquema 21).

Diseñamos los oligonucleótidos específicos que actuaron de cebadores en la reacción de PCR (en color azul); en rojo está marcada la parte de la secuencia que se amplificará posteriormente.

```

1  ggggtcgagt  ccgctgccac  ccgcgagtac  aaccttcttg  cagctcctcc  gtcgcccgtc
61  cacacccgcc  accagttcgc  catggatgac  gatatcgtg  cgctcgtcgt  cgacaacggc
121  tccggcatgt  gcaaggccgg  ctctcggggc  gacgatgctc  cccgggcccgt  cttcccctcc
181  atcgtgggcc  gccttaggca  ccaggggtgtg  atgggtggta  tgggtcagaa  ggactcctac
241  gtgggacgac  aggccagag  caagagaggc  atcctgacct  tgaagtacct  cattgaacac
301  ggcattgtca  ccaactggga  cgatatggag  aagatttggc  accacacttt  ctacaatgag
361  ctgctgtgtg  ccctgagga  gcaccctgtg  ctgctcaccg  aggcccctct  gaaccctaag
421  gccaaccgtg  aaaagatgac  ccagatcatg  tttgagaact  tcaacacccc  agccatgtac
481  gtagccatcc  aggctgtgtt  gtccctgtat  gctctgggtc  gtaccactgg  cattgtgatg
541  gactccggag  acggggtcac  ccacactgtg  cccatctatg  agggttacgc  gctccctcat
601  gccatcctgc  gtctggacct  ggctggccgg  gacctgacag  actacctcat  gaagatcctg
661  accgagcgtg  gctacagctt  caccaccac  agctgagaggg  aaatcgtgcg  tgacattaaa
721  gagaagctgt  gctatgttgc  cctagacttc  gagcaagaga  tggccactgc  cgcatcctct
781  tcctccctgg  agaagagcta  tgagctgcct  gacggtcagg  tcatcactat  cggcaatgag
841  cggttccgat  gccccgagge  tctcttcag  ccttccttcc  tgggtatgga  atcctgtggc
901  atccatgaaa  ctacattcaa  ttccatcatg  aagtgtgacg  ttgacatccg  taaagacctc
961  tatgccaaca  cagtgtgttc  tgggtggcacc  accatgtacc  caggcattgc  tgacaggatg
1021  cagaaggaga  ttactgccct  ggctcctagc  accatgaaga  tcaagatcat  tgctcctcct
1081  gagcgcaagt  actctgtgtg  gattgtgggc  tctatcctgg  cctcactgtc  caccttccag
1141  cagatgtgga  tcagcaagca  ggagtacgat  gagtccggcc  cctccatcgt  gcaccgcaaa
1201  tgcttctagg  cggactgtta  ctgagctgcg  ttttacacct  tttctttgac  aaaaacctaac
1261  ttgcccacaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaa

```

Esquema 21: Secuencia del mRNA predefinido de la β -actina. Bases de datos *GenBank*

I. Extracción del RNA total de cultivos neuronales

Para la extracción del RNA de las células en cultivo 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 2 minutos a temperatura ambiente, finalizada la cual se centrifugaron las muestras a 12000 \times g durante 15 minutos a 4°C. 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 a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 \times g durante 15 minutos a 4°C. 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 \times g, durante 5 minutos a 4°C. El precipitado de

RNA se dejó secar parcialmente a temperatura ambiente y se disolvió en agua DEPC estéril, incubándolo después a 60°C durante 10 minutos.

El RNA purificado se trató con *Turbo DNA-free*, para eliminar las posibles trazas de DNA que quedasen, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, se añadieron 0,1 volúmenes de b Turbo DNAsa y 1 µl de Turbo DNAsa (2U/µl) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadieron 0,1 volúmenes del reactivo DNAsa de inactivación y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Se centrifugaron las muestras a 10000 x g durante 1,5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

II. Transcripción inversa del RNA total obtenido.

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en viales estériles de 0,2 ml, suministrados por la casa Biotools. Se aplicó un protocolo de transcripción en un solo paso, utilizando el kit suministrado por Invitrogen (*SuperScript II Reverse Transcriptase*). Para ello, se tomó 1 µl del RNA total, al que se añadieron 4 µl de Random Hexamers Primers (RHP) y 6 µl de agua DEPC. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a 70°C, en un baño termostático y, posteriormente se mantuvo a 4°C durante 2 minutos. A continuación, se añadió una mezcla de reacción que consistió en:

- 4 µl del tampón de reacción (5x)
- 2 µl de DTT (0,1 M)
- 1 µl de una mezcla de desoxirribonucleótidos 10 mM (cada uno)
- 1 µl de un inhibidor de RNAsas (suministrado por la casa comercial Ambion)
- 0,66 µl de transcriptasa inversa de Invitrogen (200 U/µl)
- 0,34 µl de H₂O DEPC

Una vez preparada la mezcla, se programó el termociclador para llevar a cabo la reacción de síntesis del cDNA:

- 20°C / 10 minutos
- 42°C / 45 minutos
- 99°C / 3 minutos

Una vez finalizada la reacción, se añadió H₂O DEPC hasta un volumen final de 50 µl.

III. Reacción en cadena de la polimerasa no cuantitativa

Para la reacción en cadena de la polimerasa no cuantitativa (PCR) utilizamos un kit de *DNA polimerasa*, suministrado por Biotools, siguiendo las indicaciones de la casa. Preparamos una mezcla que contenía:

90 ng cDNA sintetizado
5 μ l Buffer Mg^{2+} free (10x)
1 μ l dNTP-mix (10 mM)
2 μ l Cl_2Mg (50 mM)
2 μ l cebador 3' (10 μ M)
2 μ l cebador 5' (10 μ M)
35 μ l H_2O estéril
1 μ l DNA polimerasa (1 U/ μ l)

Una vez preparada la mezcla, se programó el termociclador para llevar a cabo la reacción de síntesis de la PCR, comenzando con una desnaturalización inicial, seguida de varios ciclos compuestos de desnaturalización, anillamiento y elongación. Para terminar se programó un tiempo de elongación final. Las temperaturas y tiempos utilizados en cada caso se muestran a continuación:

PCR Nex-1: 94°C/5 minutos

94°C/30 segundos
55°C/30 segundos
72°C/45 segundos } 25 ciclos

72°C/5 minutos

PCR TrkA: 94°C/5 minutos

94°C/30 segundos
55°C/1 minutos
72°C/1 minuto 30 segundos } 35 ciclos

72°C/5 minutos

PCR TrkB:	94°C/5 minutos	
	94°C/30 segundos	} 35 ciclos
	60°C/1 minuto	
	72°C/1 minuto 30 segundos	
	72°C/5 minutos	
PCR TrkC:	94°C/5 minutos	
	94°C/30 segundos	} 35 ciclos
	57°C/1 minuto	
	72°C/1 minuto 30 segundos	
	72°C/5 minutos	
PCR β -actina:	94°C/5 minutos	
	94°C/30 segundos	} 27 ciclos
	55°C/30 segundos	
	72°C/45 segundos	
	72°C/5 minutos	

IV. Cuantificación del cDNA

Para la cuantificación del cDNA sintetizado se utilizó el kit *Quant-it PicoGreen dsDNA* (Invitrogen), un colorante de ácidos nucleicos ultrasensible para cuantificar DNA de doble cadena, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, mezclamos 6,5 μ l de cDNA procedente de la transcriptasa inversa con el reactivo Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent (200x) y TE (20x) hasta un volumen final de 125 μ l. Se mezcla bien y se determina la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. La concentración del cDNA se determinó extrapolando en una recta patrón, realizada simultáneamente con diluciones entre 1ng y 500 ng de DNA del fago Lambda, aportado por el kit.

V. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Para la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (PCR cuantitativa) utilizamos el kit *Real Master Mix* (Eppendorf), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Preparamos una mezcla de reacción que contenía:

90 ng/ml del cDNA sintetizado

0,4 µl del cebador 3' 10µM

0,4 µl del cebador 5' 10 µM

9 µl de la mezcla que contiene RealMasterMix (2,5x), acetato de magnesio 10mM (concentración final 4mM) y dNTPs 1mM con dUTP (concentración final 4mM)

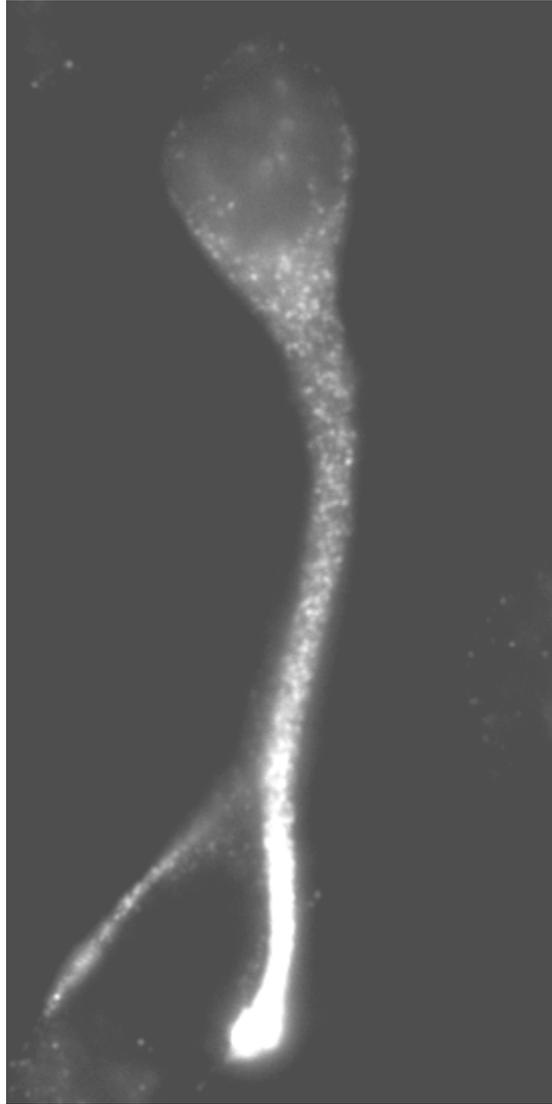
1 µl SYBR Green (20x)

y completamos hasta un volumen final de 20 µl con H₂O

DEPC

Una vez preparada la mezcla de reacción, se programó el termociclador de manera que se llevaran a cabo 40 ciclos, con 45 segundos a 61,4°C (T^a de anillamiento) y 45 segundos a 48°C (T^a de polimerización).

Una vez terminada la reacción, se determinaron los valores de CT (del inglés “*cycle threshold*”) y se determinó el número de copias extrapolando en una recta patrón realizada con unas concentraciones conocidas de amplicón.



4. RESULTADOS

*Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los
frutos.
Aristóteles*

4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO OLEICO

En trabajos previos de nuestro laboratorio se puso de manifiesto que el ácido oleico, sintetizado por los astrocitos, se comporta como un factor neurotrófico induciendo la diferenciación neuronal. Así, el ácido oleico induce la diferenciación morfológica de las neuronas caracterizada por el agrupamiento de los cuerpos celulares y la extensión de forma radial de las neuritas. Molecularmente, este ácido graso induce la expresión de proteínas marcadoras de la diferenciación dendrítica y axonal, como son la proteína asociada a los microtúbulos (MAP-2) y la proteína asociada al crecimiento (GAP-43), respectivamente (ver apartado 1.2.3 de la Introducción). En este trabajo tratamos de investigar el mecanismo de acción del ácido oleico en esta diferenciación neuronal.

4.1.1. Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión de los receptores de las neurotrofinas, Receptores tirosina kinasa (Trks)

En estudios realizados en nuestro laboratorio, se ha demostrado la existencia de un efecto sinérgico entre el ácido oleico y las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de GAP-43 (Granda y col., 2003). Con objeto de investigar si el ácido oleico incrementaba la expresión de los receptores de las neurotrofinas y de esta manera se lograba el efecto sinérgico, en este trabajo hemos evaluado la expresión de las diferentes isoformas de Trks, en ausencia y en presencia de ácido oleico.

Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 100 μ M. Se recogió el RNA a las 24 y 48 horas de cultivo, con objeto de estudiar el efecto del ácido oleico sobre los niveles de mRNA de los receptores TrkA, TrkB y TrkC.

En la figura 1A, se observa que no existe expresión del transcrito de TrkA, ni a las 24, ni a las 48 horas de cultivo, ni en ausencia, ni en presencia de ácido oleico. Sin embargo, se observa expresión de los transcritos de TrkB y TrkC, tanto a las 24, como a las 48 horas de cultivo, en las cuales, además, se aprecia un ligero aumento en la expresión de ambos receptores en presencia de ácido oleico.

Para corroborar el posible efecto del ácido oleico sobre la expresión de los receptores TrkB y TrkC, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M. Se recogieron las proteínas a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo, y se estudió la expresión de TrkB y TrkC mediante transferencia tipo *Western*.

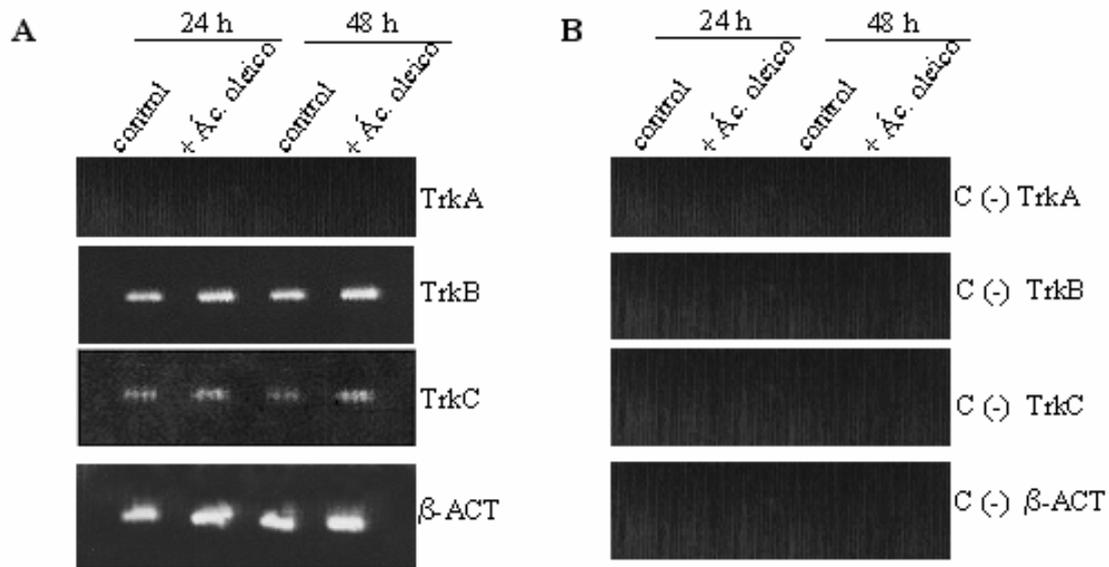


Figura 1: Efecto del ácido oleico sobre el mRNA de los receptores TrkA TrkB y TrkC.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 100 μ M (+Ác. oleico). Las muestras de RNA se extrajeron a las 24 h y 48 h. y el RNA tratado con DNasa, a 37°C durante una hora. Posteriormente, se realizó la RT-PCR, como se describe en Material y Métodos. (A) Con cebadores específicos para amplificar TrkA, TrkB, TrkC y b-actinina, como control de carga. Se realizaron controles negativos en los cuales a la misma muestra se le realizó una PCR (B) para asegurarnos de la ausencia de amplicones procedentes del DNA genómico.

En la figura 2A, se observan dos bandas, una correspondiente a la isoforma completa del receptor TrkB (150 kDa), y otra, que corresponde a la isoforma truncada de TrkB (100 kDa) sin dominio tirosina kinasa. Al cuantificar los resultados (figura 2B) comprobamos que la isoforma correspondiente al truncado no cambia su expresión en ninguna de las condiciones experimentales. Sin embargo, al analizar la banda correspondiente a la isoforma completa, se puede observar que ésta aumenta con el tiempo de cultivo y, además, se aprecia un ligero aumento (20%), de la expresión, producido por ácido oleico, que es significativo, a las 24 horas de cultivo. En la figura 2C se representa la evolución de la expresión de la isoforma completa de TrkB, en presencia y en ausencia de ácido oleico. Se puede observar como la expresión de la isoforma completa de TrkB aumenta con el tiempo de cultivo, tanto en ausencia como en presencia de ácido oleico, de manera que a las 48 y 72 horas se produce un incremento: del 75% y del 95%, respectivamente, respecto a la expresión encontrada a las 6 horas en ausencia de ácido oleico, y del 55% y del 75%, respectivamente, respecto a la expresión encontrada a las 6 horas en presencia de ácido oleico.

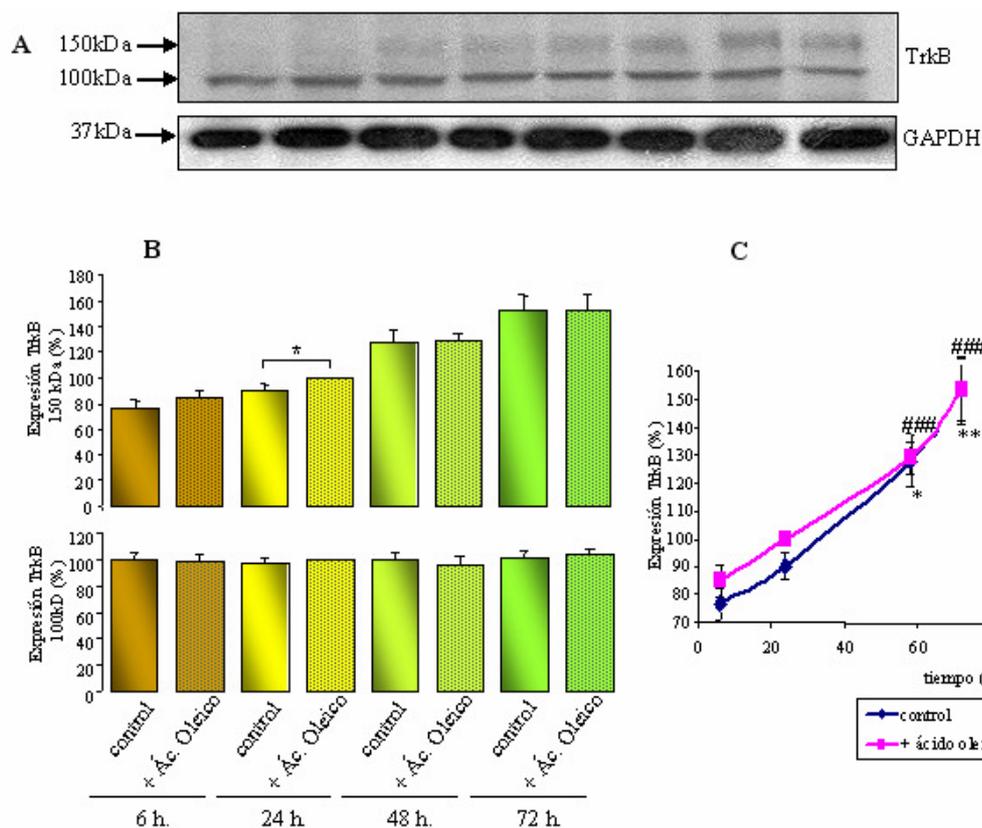


Figura 2: Efecto del ácido oleico sobre la expresión del receptor TrkB.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). Las proteínas se extrajeron a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo. La expresión del receptor TrkB se determinó por transferencia tipo Western, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. (A) Western Blot de TrkB. Aparecen dos bandas correspondientes a las dos isoformas del receptor TrkB, la isoforma completa (150 kDa) y el truncado (100 kDa). (B) Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto la condición de ácido oleico 24h y son medias \pm SEM de 10 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$ (*t de Student*). (C) Evolución de la expresión de la isoforma completa del receptor TrkB a distintos tiempos de cultivo. Se realizó un ANOVA con un post-test de Bonferroni. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos a las 6 horas de cultivo en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$ y ** $p < 0,01$. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos a las 6 horas de cultivo en presencia de ácido oleico se expresa como ### $p < 0,001$.

En la figura 3A se observan dos bandas, una correspondiente a la isoforma completa del receptor TrkC (150 kDa) y otra, que corresponde a la isoforma truncada de TrkC (100 kDa), sin dominio tirosina kinasa. Al analizar los resultados (figura 3B) se puede comprobar que la isoforma correspondiente al truncado no cambia su expresión en ninguna de las condiciones experimentales. Lo mismo ocurre al analizar la banda correspondiente a la isoforma completa de TrkC, ya que se observa que no existen diferencias significativas en la expresión del receptor TrkC al suplementar las neuronas con ácido oleico, a ninguno de los tiempos

estudiados. En la figura 3C se representa la evolución de estos datos. Se observa que la expresión de la isoforma completa de TrkC no cambia a lo largo del tiempo en ninguna de las condiciones estudiadas. Además, se puede observar que a 24, 48 y 72 horas, la expresión de la isoforma completa de TrkC es ligeramente superior en presencia de ácido oleico, respecto a su ausencia, aunque las diferencias no son significativas.

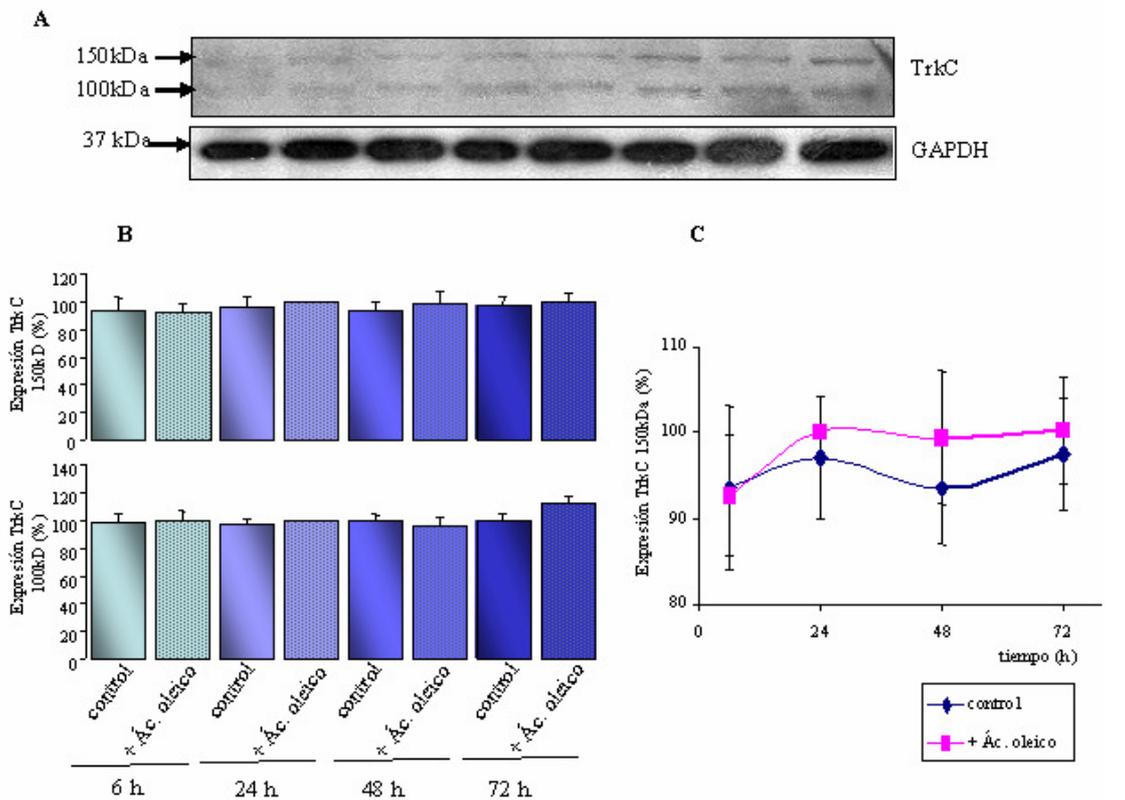


Figura 3: Efecto del ácido oleico sobre la expresión del receptor TrkC.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). Las proteínas celulares se extrajeron a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo. La expresión del receptor TrkC se determinó por transferencia tipo Western, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. (A) Western Blot de TrkC. Aparecen dos bandas correspondientes a las dos isoformas del receptor TrkC, la isoforma completa (150 kDa) y el truncado (100 kDa). (B) Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición de ácido oleico 24h y son medias \pm SEM de 10 experimentos (*t de Student*). (C) Evolución de la expresión de la isoforma completa del receptor TrkC a distintos tiempos de cultivo.

4.1.2. Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2

Trabajos previos se ha demostrado que los procesos de desarrollo neural están controlados, positiva y negativamente, por múltiples factores de

transcripción de la familia bHLH. A los miembros de la familia NeuroD, se les denomina factores de diferenciación y son: NeuroD, NeuroD2 y Nex-1. Su expresión es persistente en el sistema nervioso central del adulto y su papel es promover y mantener la expresión de los genes de las neuronas maduras (Uittenbogaard y Chiaramello, 2002). En este sentido, Rodríguez y col. (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004) han mostrado el efecto del ácido oleico sobre la inducción de algunos factores de transcripción neurogénicos, en concreto, NeuroD2.

En este estudio quisimos conocer si, además de NeuroD2, otros factores de transcripción estaban implicados en el efecto del ácido oleico. Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M. Se recogieron las proteínas a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo, para comprobar el efecto del ácido oleico sobre la expresión de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2, utilizando para ello una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

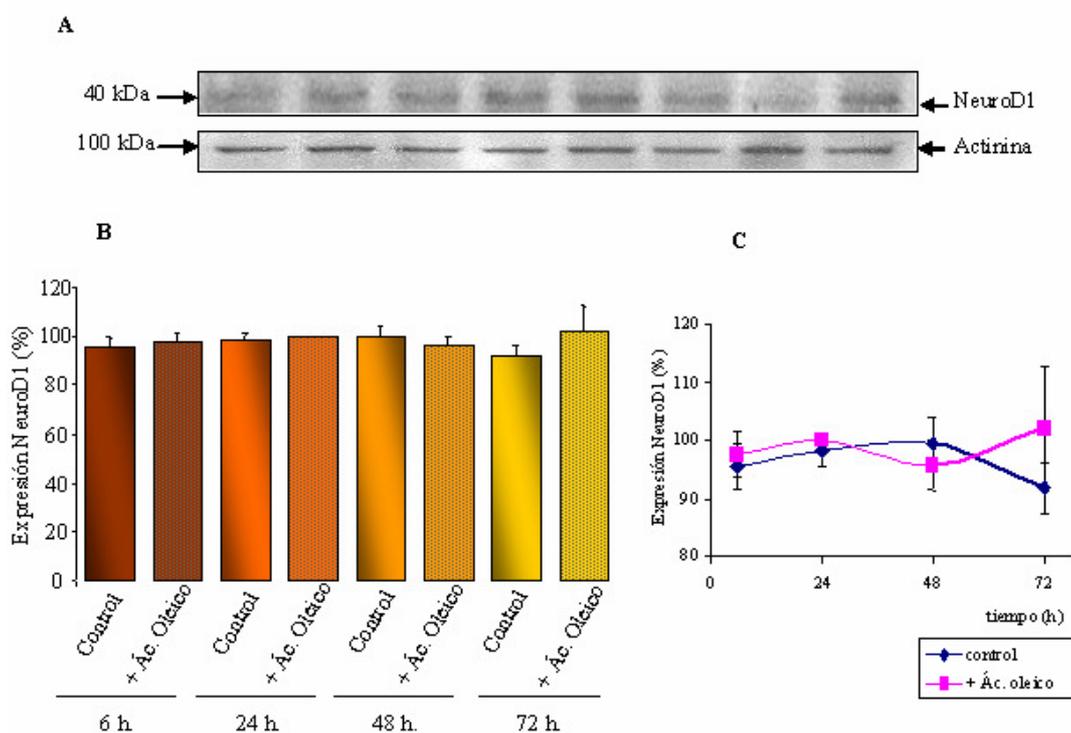


Figura 4: Efecto del ácido oleico sobre la expresión del factor de transcripción NeuroD1.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). Las proteínas se extrajeron a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo. La expresión de NeuroD1 se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. (A) *Western Blot* de NeuroD1. Como control de carga se utilizó actinina. (B) Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición de ácido oleico 24h y son medias \pm SEM de 10 experimentos (*t de Student*). (C) Evolución de la expresión del NeuroD1 a distintos tiempos de cultivo.

Como se puede ver en la figura 4 (A y B), la expresión de NeuroD1 no sufre ninguna variación cuando las neuronas son suplementadas con ácido oleico, a ninguno de los tiempos de cultivo estudiados. En la figura 4C se muestra la evolución de estos datos y se observa que no existen variaciones significativas de la expresión de NeuroD1 a lo largo del tiempo de cultivo, ni en ausencia ni en presencia de ácido oleico.

En la figura 5 (A y B), se observa que el ácido oleico sólo incrementa la expresión de NeuroD2 a las 72 horas de cultivo, produciendo un aumento del 20%. En la figura 5C se puede observar que este efecto se debe a que el ácido oleico previene el descenso de la expresión de NeuroD2, que sí que se produce en la condición control entre las 48 y 72 horas de cultivo, siendo este descenso del 30% en ausencia de ácido oleico.

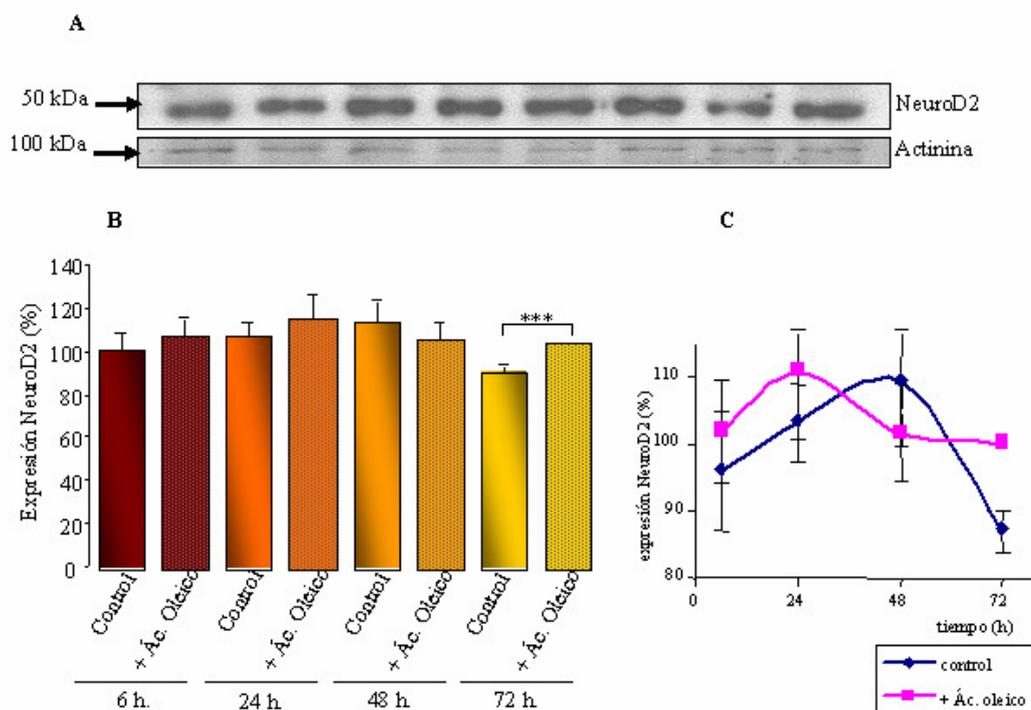


Figura 5: Efecto del ácido oleico sobre la expresión del factor de transcripción NeuroD2.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). Las proteínas celulares se extrajeron a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo. La expresión de la proteína NeuroD2 se determinó por transferencia tipo Western, tal y como se describe en Material y Métodos. (A) Western Blot de NeuroD2; como control de carga se utilizó actinina. (B) Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la condición de ácido oleico 24h y son medias \pm SEM de 10 experimentos. La significatividad frente a la ausencia de ácido oleico se expresa como $*** < 0,001$ (*t de Student*). (C) Evolución de la expresión de NeuroD2 a distintos tiempos de cultivo.

4.1.3. Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión del factor de transcripción Nex-1

En experimentos con células PC12, se demostró que el factor de transcripción Nex-1 se une al promotor de la proteína marcadora de diferenciación axonal, la proteína asociada al crecimiento GAP-43. Además, induce la síntesis de proteínas de los microtúbulos (por ejemplo, MAP-2A/B), de proteínas implicadas en la sinapsis (por ejemplo, sinaptotagmina) e, incluso, aumenta la expresión del factor de transcripción NeuroD, ya que Nex-1 es el primero de los factores de la familia de los NeuroD en expresarse (Uittenbogaard y Chiaramello, 2002; Uittenbogaard y col., 2003; Uittenbogaard y Chiaramello, 2005). De hecho, la expresión del gen *Nex-1* comienza justo después de que las células neuronales sean determinadas en el SNC y comienzan de forma paralela la diferenciación neuronal y la sinaptogénesis. Por todo ello, decidimos estudiar el efecto del ácido oleico sobre la expresión de Nex-1 en los primeros momentos de cultivo.

Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M. Se recogió el RNA a las 0, 3, 6 y 9 horas de cultivo, para comprobar el efecto del ácido oleico sobre la expresión del factor de transcripción Nex-1, utilizando para ello una Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR), o una Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR), como se describe en Material y Métodos.

En la figura 6A se observa cómo el ácido oleico aumenta la expresión del transcrito de Nex-1, tanto a las 6 como a las 9 horas de cultivo, mientras que la expresión del transcrito de la β -actinina no se modificó. Para corroborar estos resultados realizamos una qPCR. En la figura 6B se muestra un “experimento tipo”, en el cual se observa que el ácido oleico incrementa la expresión de Nex-1 a las 3, 6 y 9 horas. La expresión más alta se observó a las 3 horas de cultivo, sufriendo un descenso a continuación. Este experimento se repitió 3 veces, obteniéndose resultados similares.

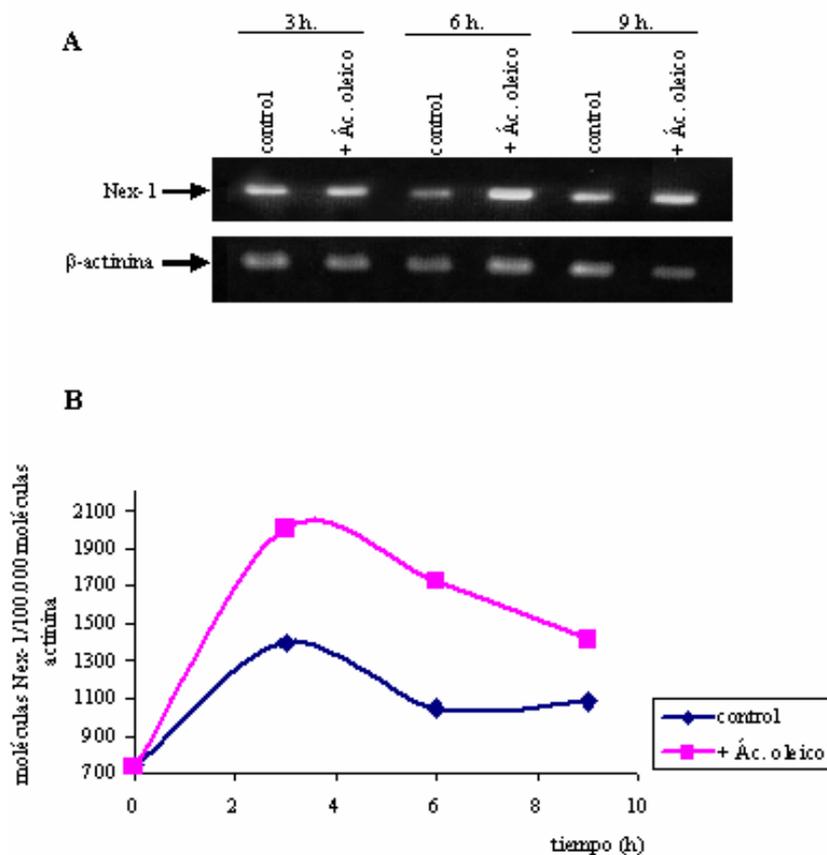


Figura 6: Efecto del ácido oleico sobre la expresión del factor de transcripción Nex-1.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). El RNA se extrajo a las 3, 6 y 9 horas de cultivo, mediante trizol. Posteriormente se realizó una transcripción inversa, como se describe en Material y Métodos. (A) PCR convencional de Nex-1. El cDNA obtenido se analizó realizando una Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional, como se describe en Material y Métodos, tanto para el factor de transcripción Nex-1 como para la b-actinina. (B) PCR cuantitativa de Nex-1. El cDNA obtenido se analizó por PCR cuantitativa, como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como moléculas de Nex-1 por 100.000 moléculas de actinina. La figura muestra los resultados de un experimento tipo.

4.1.4. Estudio del efecto de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2

Según han descrito algunos autores, (Medina y col., 2004; Calella y col., 2007), las vías de señalización de las neurotrofinas y sus receptores, y los factores de transcripción de la familia NeuroD, en concreto el NeuroD1, están interrelacionadas. Además, Liu y col. (2004) (Liu y col., 2004) describieron que el factor de transcripción NeuroD1 se une al promotor de TrkB, aumentando su expresión.

Dado que el ácido oleico induce la expresión de NeuroD2 (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004) (figura 5) y que existe un efecto sinérgico de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 con el ácido oleico sobre la expresión de GAP-43 (Granda y col., 2003), decidimos estudiar el efecto de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2, para saber si éstos estaban implicados en el efecto sinérgico.

Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M. Además, las neuronas se suplementaron con las neurotrofinas NT-3 (50 ng/ μ l) ó NT-4/5 (50 ng/ μ l), en los casos que se indica. Se recogieron las proteínas a las 72 horas de cultivo para comprobar el efecto del ácido oleico y de las neurotrofinas sobre la expresión de los factores de transcripción NeuroD1 y NeuroD2, utilizando para ello una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

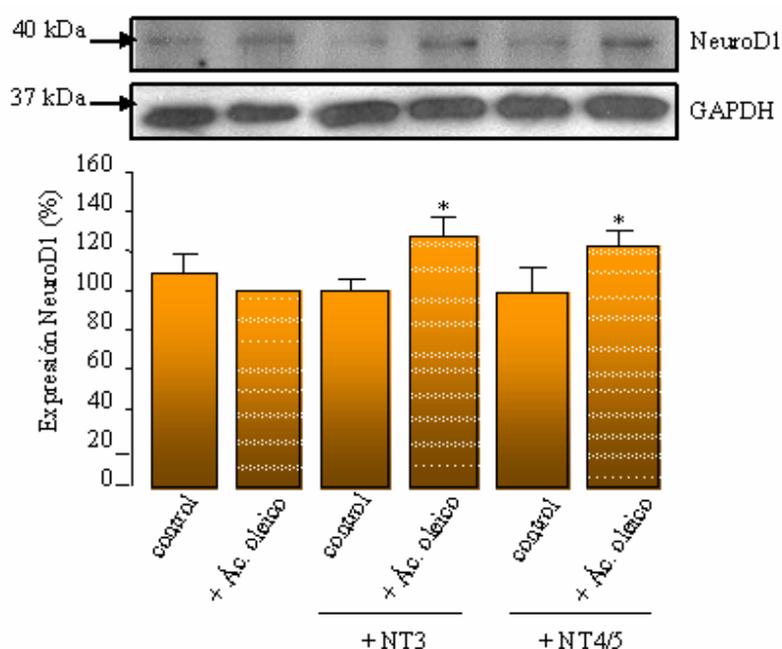


Figura 7: Efecto de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión del factor de transcripción NeuroD1, en presencia y en ausencia de ácido oleico.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NT-3 50 ng/ μ l ó NT-4/5 50 ng/ μ l. Las proteínas celulares se extrajeron a las 72 horas de cultivo. La expresión del NeuroD1 se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,05$ (*t de Student*).

En la figura 7 se puede observar cómo el ácido oleico no tiene ningún efecto sobre la expresión del factor de transcripción NeuroD1; tampoco se observa con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 en ausencia de ácido oleico. Por otro lado, se observa un efecto sinérgico, tanto de la NT-3 como de la NT-4/5, con el ácido oleico sobre la expresión de NeuroD1, produciéndose un aumento del 20%, cuando las neuronas se cultivaron en presencia de ácido oleico y de NT-3 o NT-4/5.

Como se puede ver en la figura 8, al cultivar las neuronas en presencia de ácido oleico, la expresión de NeuroD2 aumentó un 20%. Sin embargo, ni la neurotrofina NT-3, ni la NT-4/5 modificaron la expresión de NeuroD2 de forma significativa, ni en ausencia ni en presencia de ácido oleico.

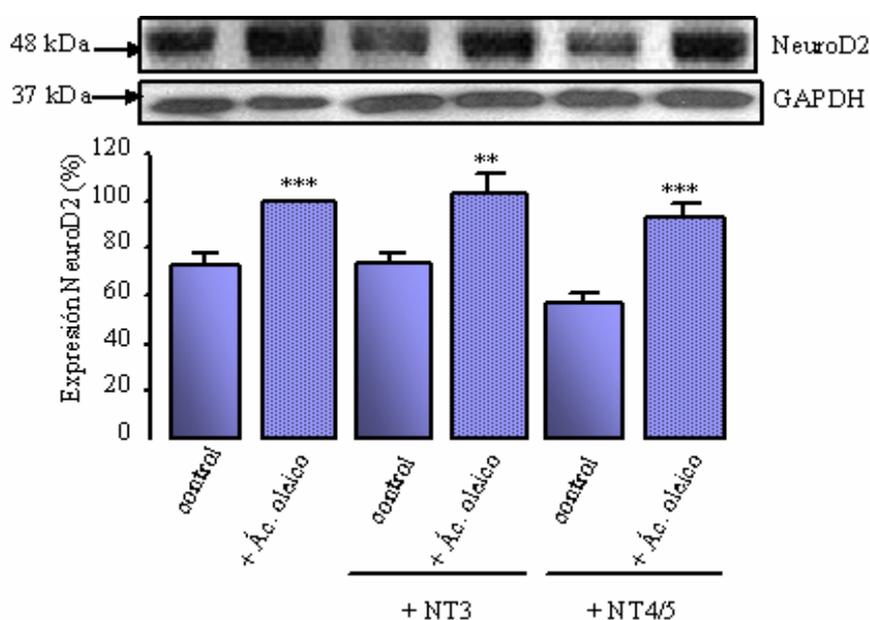


Figura 8: Efecto de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión del factor de transcripción NeuroD2, en presencia y en ausencia de ácido oleico.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NT-3 50 ng/ μ l ó NT-4/5 50 ng/ μ l. Las proteínas celulares se extrajeron a las 72 horas de cultivo. La expresión del NeuroD2 se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ (*t de Student*).

4.2. EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO EN LA MIGRACIÓN NEURONAL

En trabajos previos en nuestro laboratorio, se observó que las neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico sufren un agrupamiento por los cuerpos celulares y la extensión de forma radial de las neuritas. Este agrupamiento sigue un patrón similar al que se observa *in vivo*, de forma que los somas neuronales se agruparían formando estructuras similares a la materia gris y prolongarían sus axones hasta contactar con otras neuronas adyacentes, dejando en medio un espacio equivalente a la materia blanca del SNC (Taberner y col., 2001). Esta distribución de las neuronas en presencia al ácido oleico sugiere la posible implicación de este factor neurotrófico en el proceso de migración neuronal.

Para comprobar esta hipótesis empleamos la doblecortina (DCX), miembro de la familia de las MAPs (Moore y col., 2006), como marcador de migración neuronal.

Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM . Se recogieron las proteínas a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo para comprobar el efecto del ácido oleico sobre la expresión de la doblecortina, utilizando para ello una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

Como se observa en la figura 9 (A y B), el ácido oleico aumentó significativamente la expresión de la DCX a las 24 y 48 horas de cultivo, produciéndose un aumento del 30% y del 20%, respectivamente. No aparecen diferencias a tiempos más cortos (6 horas) y desaparecen a tiempos mayores (72 horas). La figura 10C muestra la evolución de la expresión de la DCX en ausencia y en presencia de ácido oleico. Se observa que la expresión de la DCX aumenta a lo largo del cultivo. Además, las neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico tienen un perfil de expresión de DCX que alcanza los niveles máximos antes que las neuronas cultivadas en ausencia de ácido oleico.

Las variaciones en la expresión de la DCX pueden estudiarse por inmunocitoquímica, lo que nos da una idea de la localización intracelular de la proteína. Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM . Las células se fijaron a las 24, 48 y 72 horas de cultivo y, posteriormente, se realizó la inmunocitoquímica, como se describe en Material y Métodos.

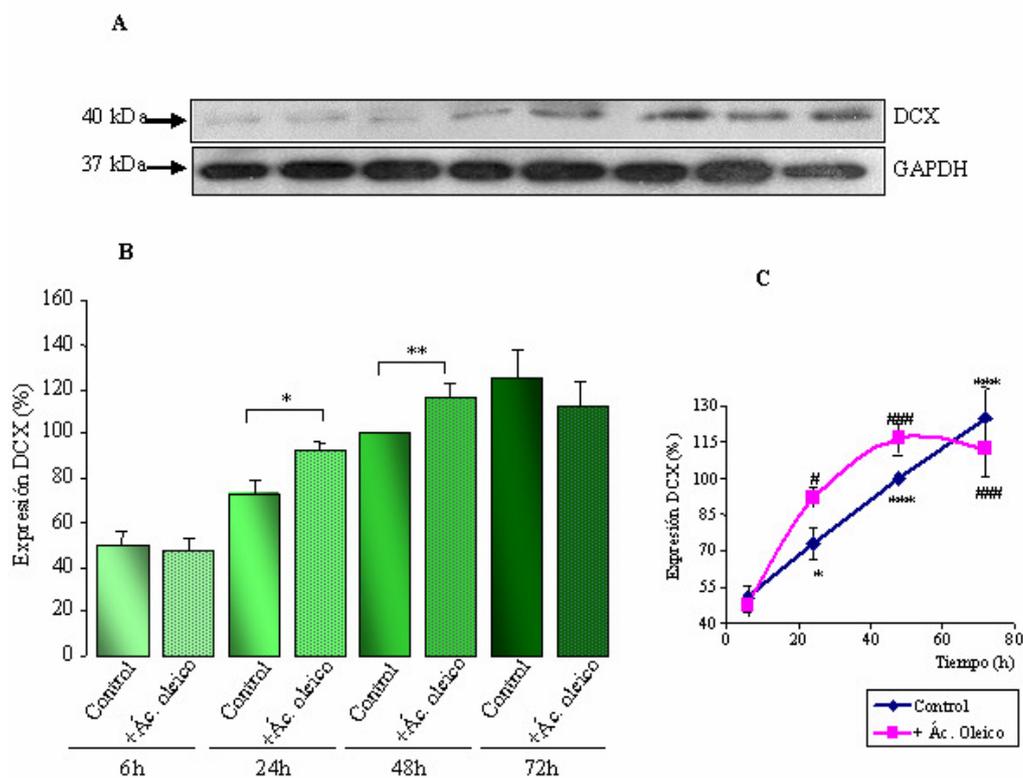


Figura 9: Efecto del ácido oleico sobre la expresión de la DCX.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). Las proteínas se extrajeron a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo. (A) Western Blot de DCX. La expresión de la proteína DCX se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. (B) Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto la condición control 48h y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$ y ** $p < 0,01$ (*t de Student*). (C) Evolución de la expresión de DCX a distintos tiempos de cultivo. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos a las 6 horas en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos a las 6 horas en presencia de ácido oleico se expresa como # $p < 0,05$ y ### $p < 0,001$. Se realizó un ANOVA y un post-test de Bonferroni.

La figura 10 muestra la expresión y localización de la DCX. La proteína se localiza tanto en el cuerpo celular como en las neuritas. Como se puede observar, las neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico presentaron una mayor intensidad de fluorescencia, tanto en el cuerpo celular como en las neuritas, comparando con la situación control a las 24 y 48 horas.

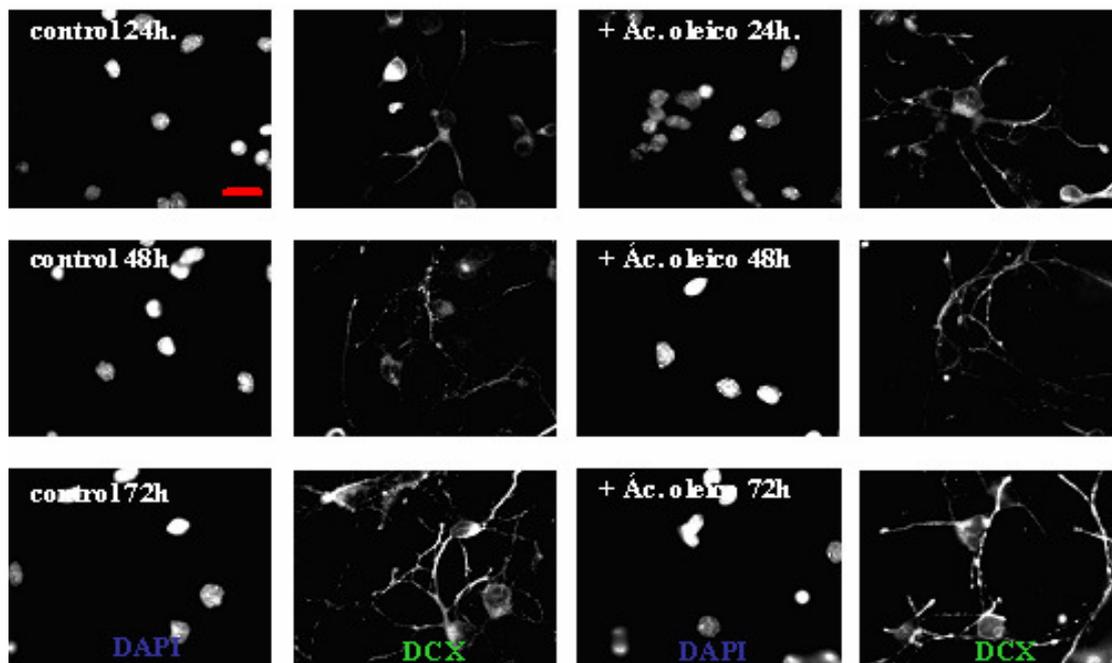


Figura 10: Efecto del ácido oleico sobre la localización de la DCX.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). A distintos tiempos de cultivo (24h, 48h y 72h) las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de la DCX, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra DCX y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando la DCX y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

4.3. EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO EN LA SINAPTOGÉNESIS

Cuando las neuronas llegan a su destino final, después de la migración, comienzan a generar prolongaciones dendríticas y axónicas que las capacitan para recibir contactos de otras células. A estos contactos entre neuronas se los conoce como sinapsis. La mayoría de las sinapsis consisten en una región especializada en la parte axónica presináptica, una región receptora en una dendrita postsináptica y una estrecha hendidura entre ambas regiones (Kalil, 1990). Tanto en la parte presináptica, como en la parte postsináptica, se encuentran localizadas proteínas específicas que llevan a cabo la formación de la sinapsis y que sirven como proteínas marcadoras de la presencia de sinapsis. Se estudiaron 3 marcadores sinápticos: sinaptotagmina, como marcador presináptico, y GluR-2/3 y PSD-95, como marcadores postsinápticos (Ullian y col., 2001; Christopherson y col., 2005; Goritz y col., 2005).

4.3.1. Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión y localización de la sinaptotagmina I

La sinaptotagmina I es una glicoproteína de membrana que se encuentra localizada en las vesículas presinápticas, por lo que se puede utilizar como marcador presináptico (Ullian y col., 2001; Christopherson y col., 2005). Tiene dos dominios de unión al calcio y la unión del calcio desencadenará la exocitosis de la vesícula. Por todo ello nos propusimos estudiar el efecto del ácido oleico sobre la expresión de la sinaptotagmina I.

Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM . Se recogieron las proteínas a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo y se realizó una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

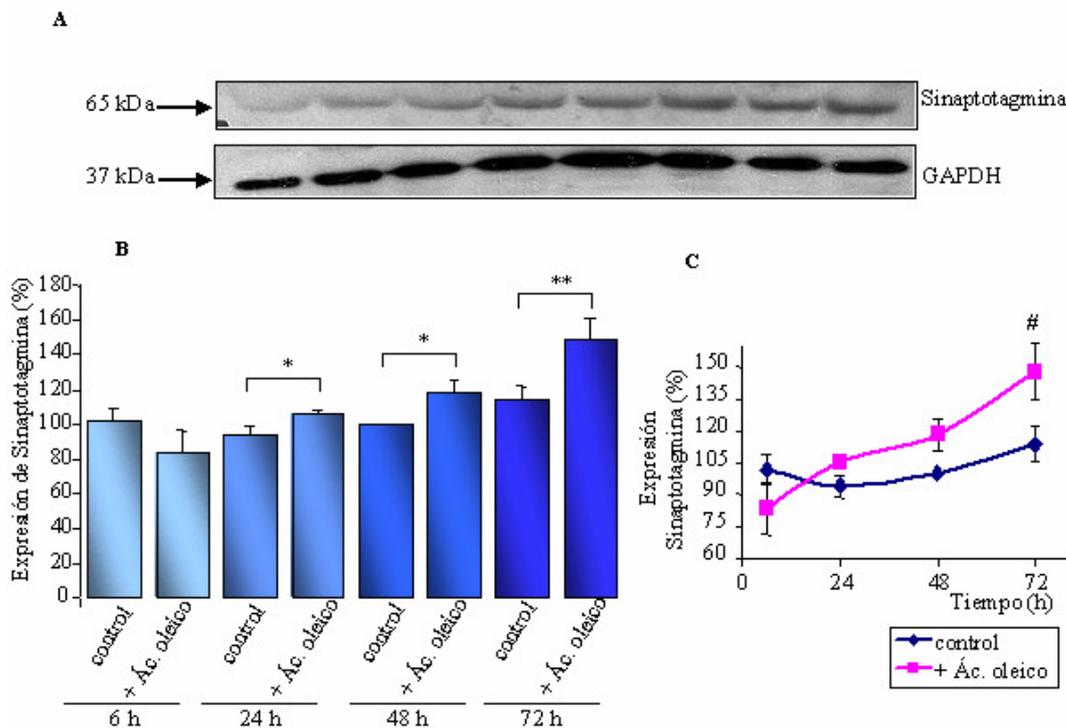


Figura 11: Efecto del ácido oleico sobre la expresión de la sinaptotagmina I.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). Las proteínas se extrajeron a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo. La expresión de la sinaptotagmina se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. (A) Western Blot de la sinaptotagmina. Como control de carga se utilizó GAPDH. (B) Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la condición control 48h y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia del ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$ y ** $p < 0,01$ (*t de Student*). (C) Evolución de la expresión de sinaptotagmina I a distintos tiempos de cultivo. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos a las 6 horas de cultivo en presencia de ácido oleico se expresa como # $p < 0,5$. Se analizaron los resultados por ANOVA con un post-test de Bonferroni.

Como se puede ver en la figura 11 (A) y (B), el ácido oleico aumenta la expresión de la sinaptotagmina I a las 24, 48 y 72 horas de cultivo, produciéndose un aumento del 10%, 20% y del 40%, respectivamente. En la figura 11C se observa que la curva de expresión de la sinaptotagmina I tiene mayor pendiente cuando las neuronas están cultivadas en presencia de ácido oleico que cuando no lo están. De hecho, en ausencia de ácido oleico no se observa ninguna variación significativa en la expresión de la sinaptotagmina I a lo largo del tiempo.

Para estudiar las variaciones en la expresión y la localización intracelular de la sinaptotagmina I realizamos una inmunocitoquímica. Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM . Las células se fijaron a las 48 y 72 horas de cultivo y se realizó una inmunocitoquímica, como se describe en Material y Métodos,

En la figura 12 se puede observar cómo las neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico presentan una mayor intensidad de fluorescencia, tanto en el cuerpo celular como sobre todo, en las neuritas, que se observan con mayor nitidez en presencia de ácido oleico.

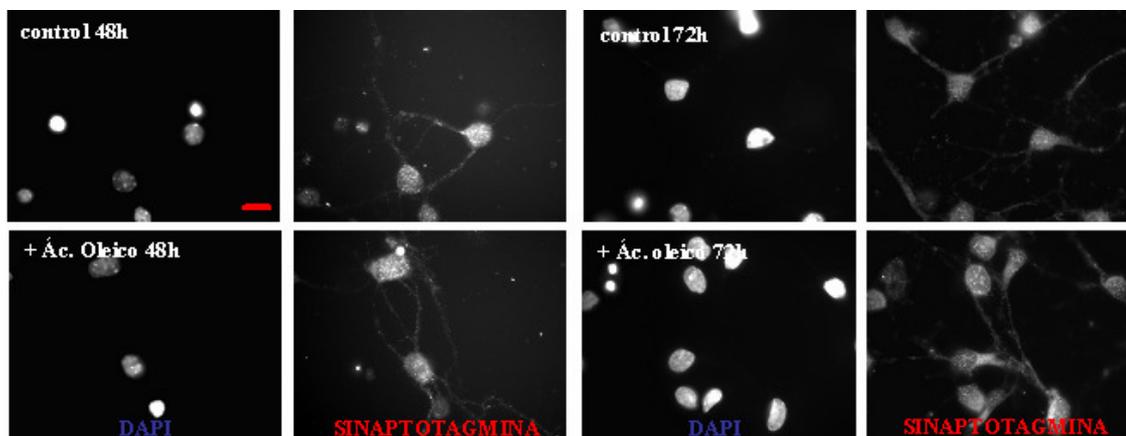


Figura 12: Efecto del ácido oleico sobre la localización de la sinaptotagmina I.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). A distintos tiempos de cultivo (48h y 72h) las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de la sinaptotagmina I, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra sinaptotagmina I y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando la sinaptotagmina I y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

4.3.2. Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión y localización del receptor de glutamato, en sus isoformas 2 y 3 (GluR-2/3)

El principal neurotransmisor excitador en el cerebro es el glutamato, que ejerce sus acciones a través de receptores ionotrópicos, que son canales permeables a cationes, y metabotrópicos. Estos últimos constituyen una familia de receptores acoplados a proteínas G (ver Introducción 1.1.1.5.4). El receptor de glutamato GluR-2/3 pertenece a la familia de receptores AMPA, dentro del grupo de los ionotrópicos. Teniendo en cuenta la importancia del glutamato en la sinapsis y la posibilidad de utilización de uno de sus receptores más comunes como marcador postsináptico, decidimos estudiar el posible efecto del ácido oleico sobre la expresión de GluR-2/3 (Ullian y col., 2001; Christopherson y col., 2005; Goritz y col., 2005).

Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M. Se recogieron las proteínas a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo, y se realizó para ello una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

Como se puede observar en la figura 13 (A y B), el ácido oleico aumenta significativamente la expresión de GluR-2/3 a las 24, 48 y 72 horas de cultivo, apareciendo un aumento de, aproximadamente, el 20% en cada uno de estos tiempos, mientras que a tiempos cortos (6 horas) no se observó ningún efecto. La figura 13C muestra la evolución de la expresión de GluR-2/3. En presencia de ácido oleico, la curva tiene una tendencia ascendente y prácticamente lineal y se encuentran siempre niveles de expresión más altos que en la curva correspondiente a la expresión de GluR-2/3 en ausencia de ácido oleico.

Las variaciones en la expresión del GluR-2/3 pueden ser también estudiadas por inmunocitoquímica, lo que nos da una idea de su localización intracelular. Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M. Las células se fijaron a las 48 y 72 horas de cultivo y, posteriormente, se realizó la inmunocitoquímica como se describe en Material y Métodos.

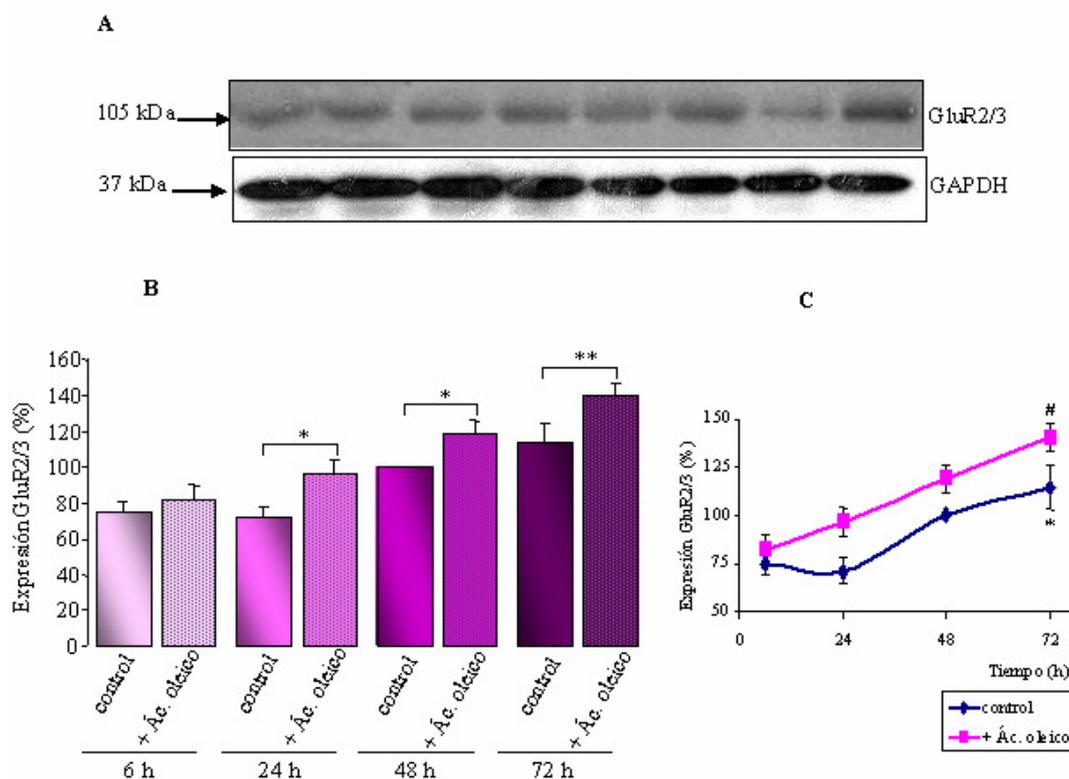


Figura 13: Efecto del ácido oleico sobre la expresión del receptor GluR-2/3.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). Las proteínas se extrajeron a las 6, 24, 48 y 72 horas de cultivo. La expresión de GluR-2/3 se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. (A) Western Blot del GluR-2/3. Como control de carga se utilizó GAPDH. (B) Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la condición control 48h y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia del ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$ y ** $p < 0,01$ (*t de Student*). (C) Evolución de la expresión de GluR-2/3 a distintos tiempos de cultivo. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos a las 6 horas de cultivo en ausencia del ácido oleico se expresa como * $p < 0,05$. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos a las 6 horas de cultivo en presencia de ácido oleico se expresa como # $p < 0,05$. Los resultados se analizaron por ANOVA, con un post-test de Bonferroni.

Las variaciones en la expresión y localización del GluR-2/3 se muestran en la figura 14. Se observa cómo la proteína se localiza fundamentalmente en el cuerpo celular y en las dendritas. Como se puede observar, las neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico presentan mayor intensidad de fluorescencia y, por tanto, se ven más claramente las neuritas en estas condiciones.

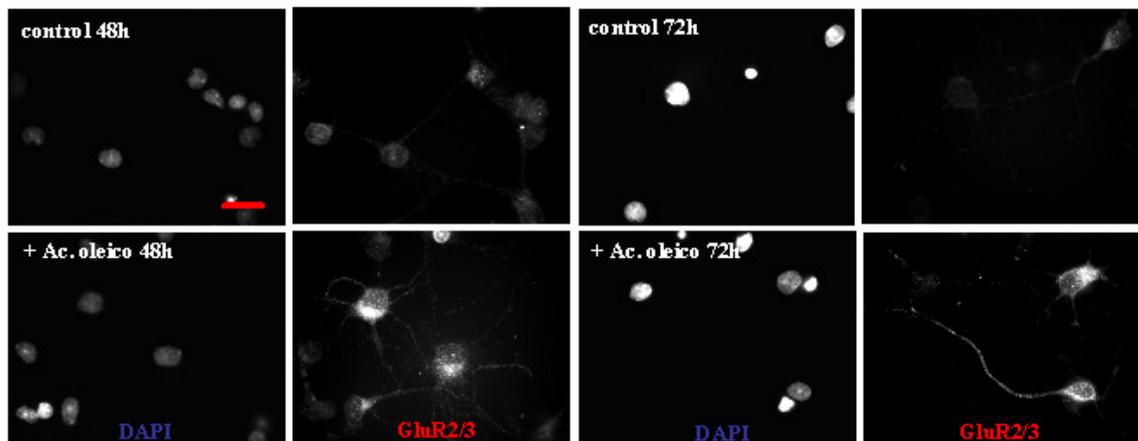


Figura 14: Efecto del ácido oleico sobre la localización del receptor GluR-2/3.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). A distintos tiempos de cultivo (48h y 72h) las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia del GluR-2/3, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra GluR-2/3 y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando el GluR-2/3 y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

4.3.3. Estudio del efecto del ácido oleico sobre la expresión y localización de la “Densidad Postsináptica”, PSD-95

El PSD-95 (Densidad Post-sináptica de 95 kDa), denominada también como SAP90 (proteína asociada a la sinapsis de 90 kDa), pertenece a la familia de proteínas asociadas a la membrana de la densidad postsináptica y se utiliza como marcador post-sináptico (Ullian y col., 2001; Christopherson y col., 2005).

Para estudiar las variaciones en la expresión y la localización intracelular del PSD-95 se realizó una inmunocitoquímica, como se describe en Material y Métodos. Las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM . Las células se fijaron a las 48 y 72 horas de cultivo y, posteriormente, se realizó la inmunocitoquímica.

La figura 15 muestra la expresión y localización de PSD-95 a distintos tiempos de cultivo, en ausencia y en presencia de ácido oleico. La proteína se localiza, fundamentalmente, en el cuerpo celular y en las neuritas. Como se puede observar, las neuronas cultivadas en presencia de ácido oleico mostraron una mayor intensidad de fluorescencia, apreciándose mayor número de neuritas.

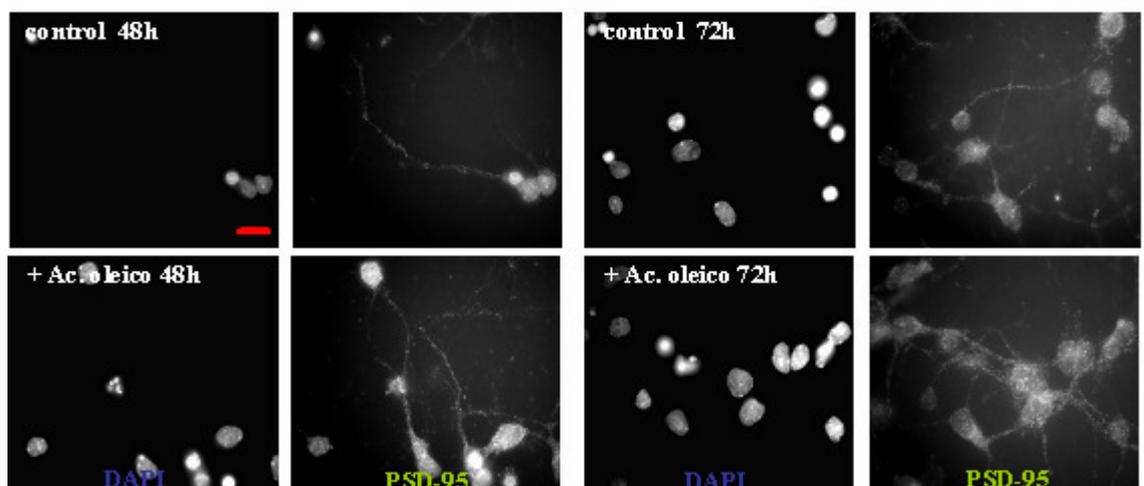


Figura 15: Efecto del ácido oleico sobre la localización de la proteína PSD-95.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM . A distintos tiempos de cultivo (48h y 72h) las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia del PSD-95, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario monoclonal contra PSD-95 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando el PSD-95 y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

4.3.4. Estudio del efecto del ácido oleico en la formación de sinapsis

Para estudiar la posible funcionalidad de las proteínas sinápticas expresadas por las células en cultivo, estudiamos la formación de los denominados “puntos individuales de sinapsis”, es decir, la colocalización de las proteínas sinaptotagmina I y PSD-95 (marcadores pre y post-sinápticos, respectivamente) (Christopherson y col., 2005). Para ello, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM . Las células se fijaron a las 72 horas de cultivo y, posteriormente, se realizó una doble inmunocitoquímica para PSD-95 y sinaptotagmina I, como se describe en Material y Métodos.

La figura 16 muestra cómo la fluorescencia correspondiente a PSD-95 (B y F) y a la sinaptotagmina I (C y G) aumenta en presencia de ácido oleico. Además, se puede observar que en la condición control, cuando estudiamos la colocalización de los dos marcadores (D), no se encuentra ni colocalización (amarillo), ni cercanía entre los distintos puntos. Sin embargo, en presencia de ácido oleico, al estudiar la colocalización de los dos marcadores (H), se observa la existencia de colocalización (amarillo) y la cercanía entre ambas proteínas.

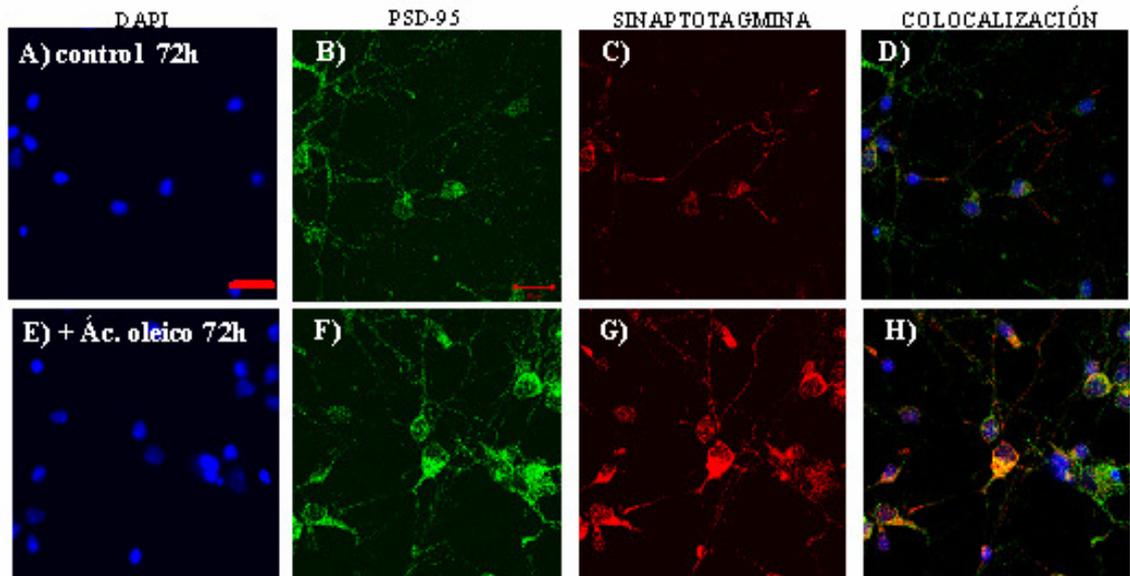


Figura 16: Efecto del ácido oleico sobre la colocalización de los marcadores de sinapsis, sinaptotagmina I y PSD-95.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). A las 72 horas de cultivo las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de PSD-95 y de sinaptotagmina I, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario monoclonal contra PSD-95, un anticuerpo primario policlonal contra sinaptotagmina I, un anticuerpo secundario monoclonal conjugado con Alexa488 y un anticuerpo secundario policlonal conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal, mostrando la sinaptotagmina I, el PSD-95 y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

En la figura 17 se muestra, de forma ampliada, la zona marcada, tanto en la condición control (A) como en la condición en presencia de ácido oleico (B). Se observa que con ácido oleico aparecen los denominados “puntos individuales de sinapsis” (amarillo), mientras que en la situación control (A) no aparece prácticamente ninguno.

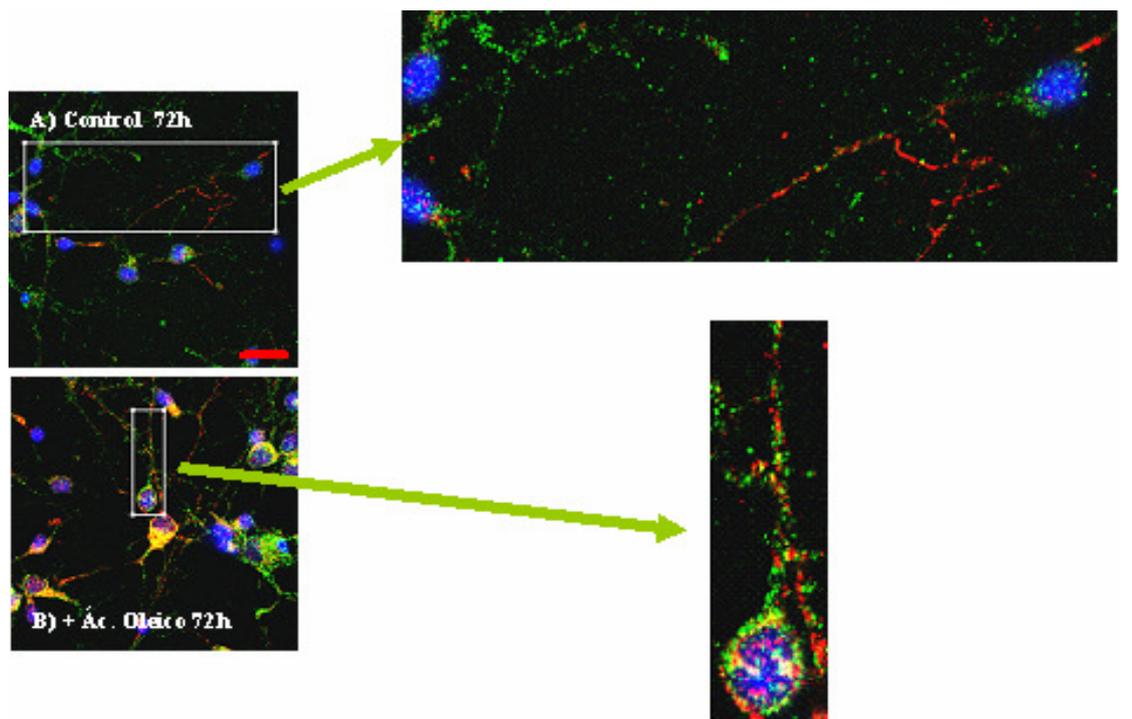


Figura 17: Ampliación de la figura (17 D y H) que muestra efecto del ácido oleico sobre la colocalización de los marcadores de sinapsis sinaptotagmina I y PSD-95.

En la ampliación aparecen los denominados puntos individuales de sinapsis (en amarillo), en los que colocalizan la proteína presináptica sinaptotagmina I y la proteína postsináptica PSD-95.

4.4. EFECTO DE LAS NEUROTROFINAS SOBRE LA MIGRACIÓN NEURONAL INDUCIDA POR EL ÁCIDO OLEICO

Dado que las neurotrofinas están implicadas en la proliferación de los neuroblastos y la maduración neuronal, afectando y manteniendo el fenotipo neuronal, y puesto que el ácido oleico actúa también como un factor neurotrófico, nos propusimos estudiar la posible implicación de las neurotrofinas en la migración neuronal producida por el ácido oleico. Para ello estudiamos tanto la expresión como la localización de la doblecortina, (DCX) marcadora de migración neuronal.

Para estudiar el efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión de la proteína DCX, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM ., suplementando, en los casos que se indique, con NGF 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Al cabo de 24 ó 48 horas de cultivo se extrajeron las proteínas y se realizó una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

Además, para estudiar el efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión y la localización subcelular de la proteína DCX, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μM , suplementando en los casos que se indique, con BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Al cabo de 24 ó 48 horas de cultivo las células se fijaron y, posteriormente, se realizó una inmunocitoquímica, como se describe en Material y Métodos.

En la figura 18 se puede observar el efecto del ácido oleico sobre la expresión de la DCX a las 24 horas de cultivo (aproximadamente 10%). Por otro lado, ni el NGF, ni el BDNF tuvieron ningún efecto sobre la expresión de DCX, inhibiendo, incluso, el efecto del ácido oleico cuando las neuronas se cultivaron en presencia de ambos. Sin embargo, tanto la NT-3 como la NT-4/5, por sí solas, aumentaron significativamente la expresión de DCX en un 20% en comparación con la condición control. Estos efectos sobre la DCX no parecen ni sumatorios, ni sinérgicos con los del ácido oleico.

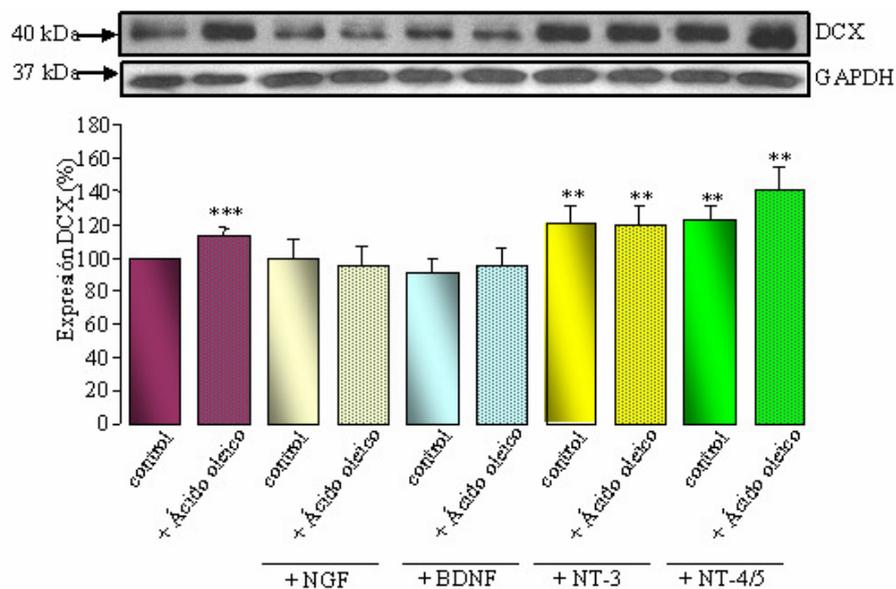


Figura 18: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de la doblecortina (DCX), en presencia y en ausencia de ácido oleico, a las 24h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NGF 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Las proteínas se extrajeron a las 24 horas de cultivo. La expresión de la proteína DCX se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia del ácido oleico se expresa como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ (*t de Student*).

En la figura 19 se muestra la localización de la DCX a las 24 horas de cultivo. Se observa que la fluorescencia correspondiente a la DCX se encuentra localizada, fundamentalmente, en el cono de crecimiento y en las neuritas. Además, también se puede observar que la intensidad de la fluorescencia es mayor en presencia de ácido oleico y de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, y marcándose, sobre todo, las terminaciones axónicas, mientras, que el BDNF, no tiene ningún efecto sobre la expresión y localización de la DCX.

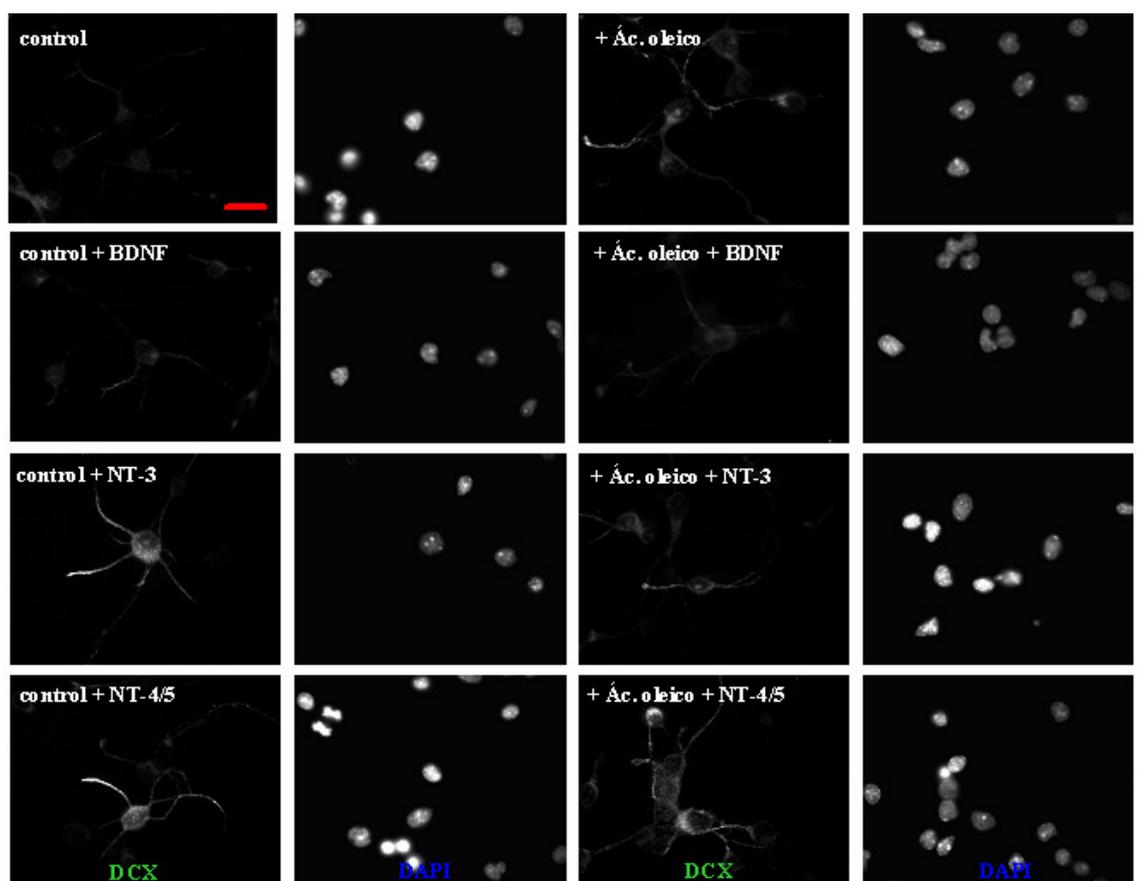


Figura 19: Efecto de las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la localización de la proteína DCX, en presencia y en ausencia de ácido oleico a las 24h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indica, las células se incubaron también en presencia de BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ó NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. A las 24h de cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de la DCX, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra DCX y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando la DCX y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

En la figura 20 se observa el aumento de la expresión de la DCX en presencia de ácido oleico a las 48 horas de cultivo (aproximadamente 20%). Por otro lado, el NGF no produjo ningún efecto sobre la expresión de DCX, inhibiendo, incluso, el efecto del ácido oleico cuando las neuronas se cultivaron en presencia del NGF y el ácido graso. Además, cuando las neuronas se cultivaron en presencia de ácido oleico y BDNF se observó un aumento del 50% en la expresión de la DCX, lo que no se produjo cuando las neuronas se cultivaron sólo en presencia de BDNF. Por su parte, tanto la NT-3 como la NT-4/5, por sí solas, aumentaron un 20% la expresión de DCX. Además, estos efectos fueron sumatorios al efecto del ácido oleico sobre la DCX.

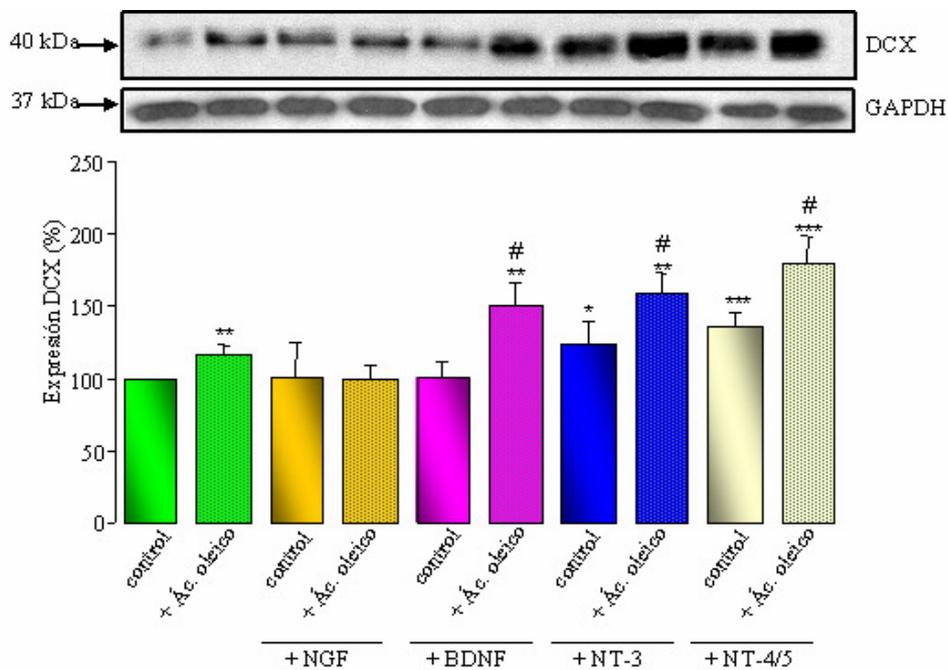


Figura 20: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de la doblecortina (DCX), en presencia y en ausencia de ácido oleico a las 48h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Las proteínas se extrajeron a las 48 horas de cultivo. La expresión de la DCX se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias frente a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 se expresan como # $p < 0,5$ (*t de Student*).

En la figura 21 se muestra la localización de la DCX a las 48 horas de cultivo. La fluorescencia correspondiente a la DCX se encuentra localizada, fundamentalmente, en el cono de crecimiento y en las neuritas. Se puede observar que, en presencia de ácido oleico, la intensidad de la fluorescencia es mayor. Así mismo, la presencia de NT-3 y NT-4/5 también aumenta la intensidad de la fluorescencia. De hecho, la mayor intensidad de fluorescencia se alcanza cuando las neuronas crecen en presencia de ácido oleico y NT-3 o NT-4/5. La presencia de NT-4/5 promueve un cambio en la distribución de DCX, que aparece punteada a lo largo de las neuritas. Aunque el BDNF por sí solo no produce ningún aumento en la intensidad de la fluorescencia, sí se observa un aumento de la fluorescencia en presencia de BDNF y ácido oleico.

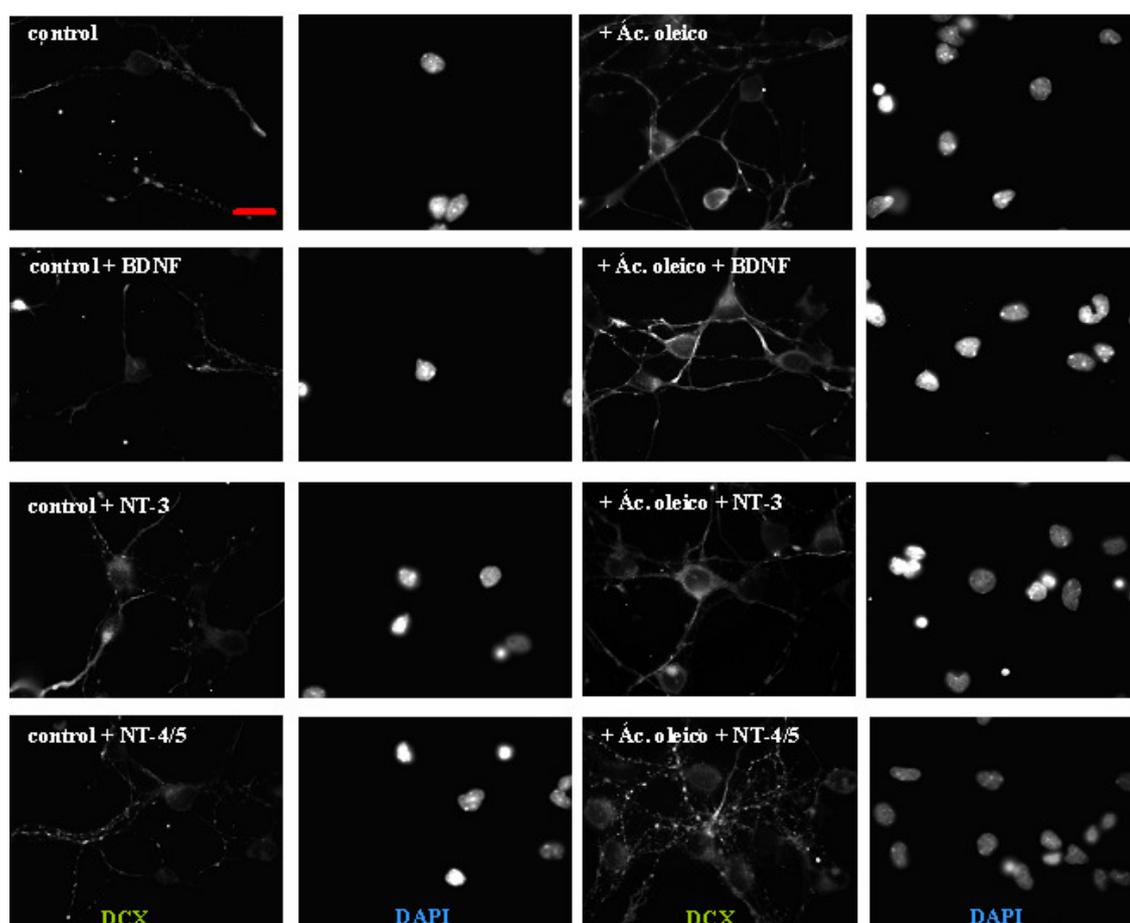


Figura 21: Efecto de las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la localización de la DCX, en presencia y en ausencia de ácido oleico, a las 48h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indica, las células se incubaron también en presencia de BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ó NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. A las 48h de cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de la DCX, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra DCX y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando la DCX y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

4.5. EFECTO DE LAS NEUROTROFINAS SOBRE LA SINAPTOGÉNESIS PROMOVIDA POR EL ÁCIDO OLEICO

Recientemente se ha descrito que las neurotrofinas están implicadas en la regulación de la expresión de las proteínas pre y post-sinápticas en las neuronas bipolares del ganglio espinal (Flores-Otero y col., 2007). Teniendo en cuenta esto y el efecto del ácido oleico sobre los distintos marcadores pre y post-sinápticos, decidimos estudiar el posible efecto de las neurotrofinas en la sinaptogénesis y su posible colaboración con el ácido oleico.

4.5.1. Estudio del efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión y localización de la sinaptotagmina I

Para estudiar el efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión de la sinaptotagmina I, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M, suplementando, en los casos que se indique, con NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Al cabo de 24 ó 48 horas de cultivo se extrajeron las proteínas y se realizó una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

Para estudiar el efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión y la localización subcelular de la sinaptotagmina I, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M, suplementando, en los casos que se indique con NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Al cabo de 24 ó 48 horas de cultivo las células se fijaron y, posteriormente, se realizó una inmunocitoquímica como se describe en Material y Métodos.

En la figura 22 se observa cómo a las 24 horas de cultivo existe un aumento del 20% de la expresión de la sinaptotagmina I en presencia de ácido oleico. Este aumento de expresión se encuentra inhibido por la adición de NGF o BDNF, los cuales no tienen efecto sobre la expresión de la proteína en ausencia de ácido oleico. Sin embargo, las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 producen un aumento significativo de la expresión de la sinaptotagmina I en ausencia del ácido oleico (30% y del 70%, respectivamente). Este efecto no es aditivo con el producido por el ácido oleico.

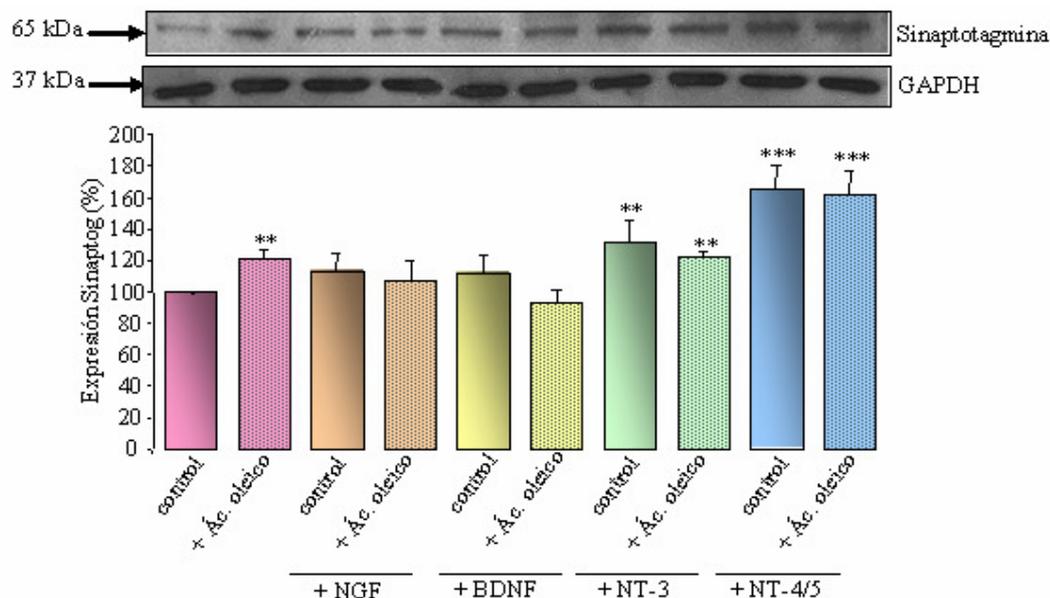


Figura 22: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de la sinaptotagmina I, en presencia y en ausencia de ácido oleico a las 24h de cultivo.

Las neuronas se incubaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Las proteínas celulares se extrajeron a las 24 horas de cultivo. La expresión de la sinaptotagmina I se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia del ácido oleico se expresa como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ (*t de Student*).

En la figura 23 se muestra la localización de la sinaptotagmina I a las 24 horas de cultivo. La fluorescencia correspondiente a la sinaptotagmina I se encuentra localizada fundamentalmente en el cuerpo celular de las neuronas, así como en las neuritas. Se puede observar la existencia de un aumento en la intensidad de la fluorescencia en presencia de ácido oleico, así como en las neuronas que se encuentran suplementadas con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5. Ni el NGF ni el BDNF producen ningún efecto sobre la expresión y la localización de la sinaptotagmina I.

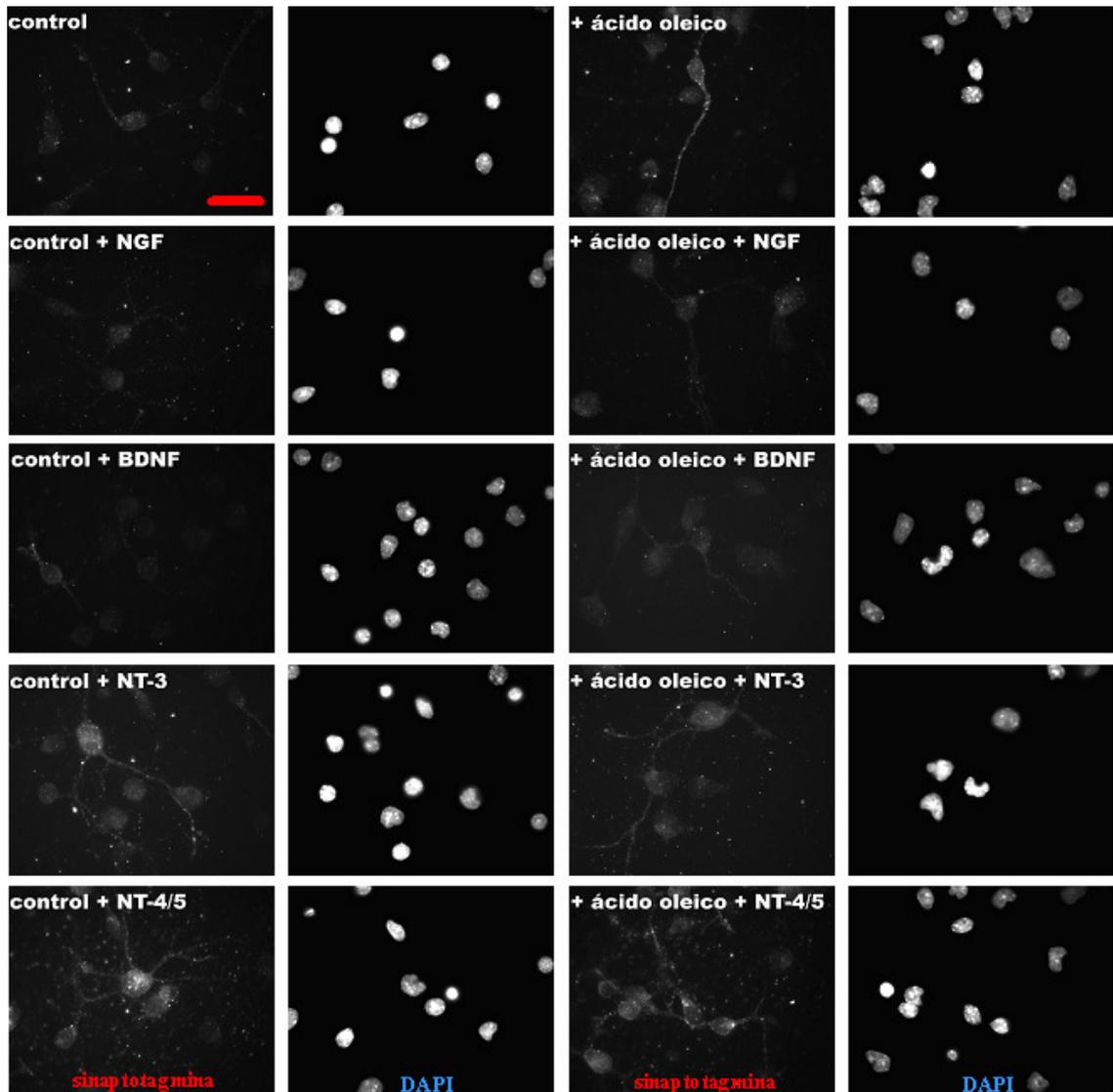


Figura 23: Efecto de las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la localización de la sinaptotagmina I, en presencia y en ausencia de ácido oleico a las 24h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indica, las células se incubaron también en presencia de NGF 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. A las 24h de cultivo las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de la sinaptotagmina, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra sinaptotagmina I y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando la sinaptotagmina I y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

En la figura 24 se puede observar la expresión de sinaptotagmina I a las 48 horas de cultivo. Se observa un aumento de, aproximadamente, el 25% de la expresión de la sinaptotagmina I en presencia de ácido oleico. El NGF no produjo ningún efecto sobre la expresión de la proteína, ni en ausencia

ni en presencia de ácido oleico. Tanto BDNF, como NT-3 y NT-4/5 produjeron un aumento significativo de la expresión de la sinaptotagmina I, en ausencia de ácido oleico, del 20%, 50% y 60%, respectivamente. Este aumento de expresión no es aditivo con el efecto del ácido oleico.

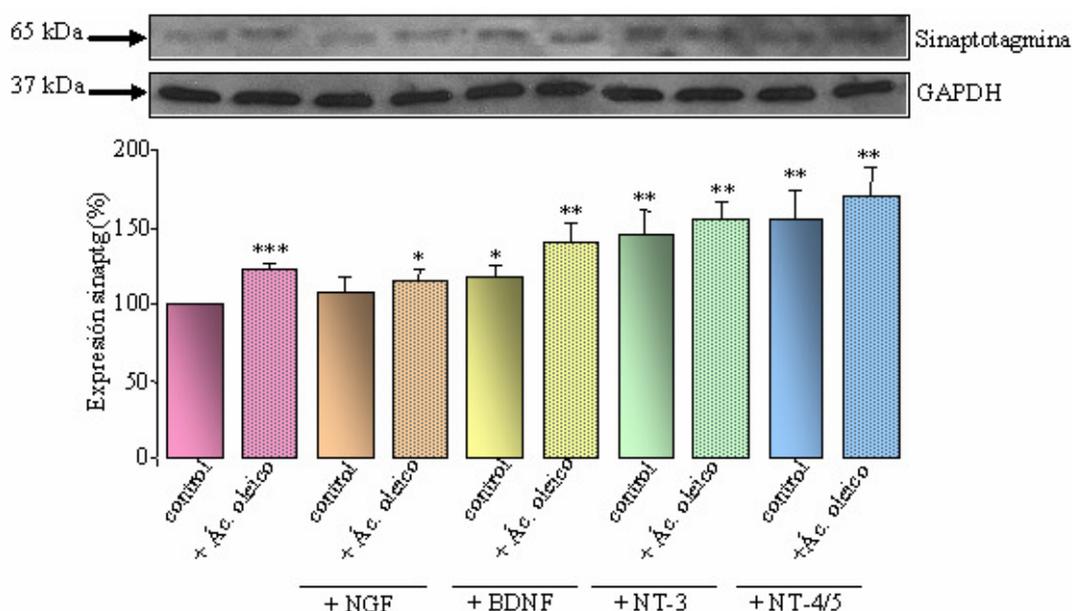


Figura 24: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de la sinaptotagmina I, en presencia y en ausencia de ácido oleico a las 48h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Las proteínas celulares se extrajeron a las 48 horas de cultivo. La expresión de la sinaptotagmina I se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ (*t de Student*).

En la figura 25 se muestra la localización de la sinaptotagmina I a las 48 horas de cultivo. La fluorescencia correspondiente a la sinaptotagmina I se encuentra localizada, fundamentalmente, en el cuerpo celular de las neuronas, así como en las neuritas. Se puede observar un aumento de la intensidad en la fluorescencia en presencia de ácido oleico, así como en las neuronas que se encuentran suplementadas con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5. En los casos en los que la fluorescencia es mayor, se pueden observar muy bien las prolongaciones neuronales.

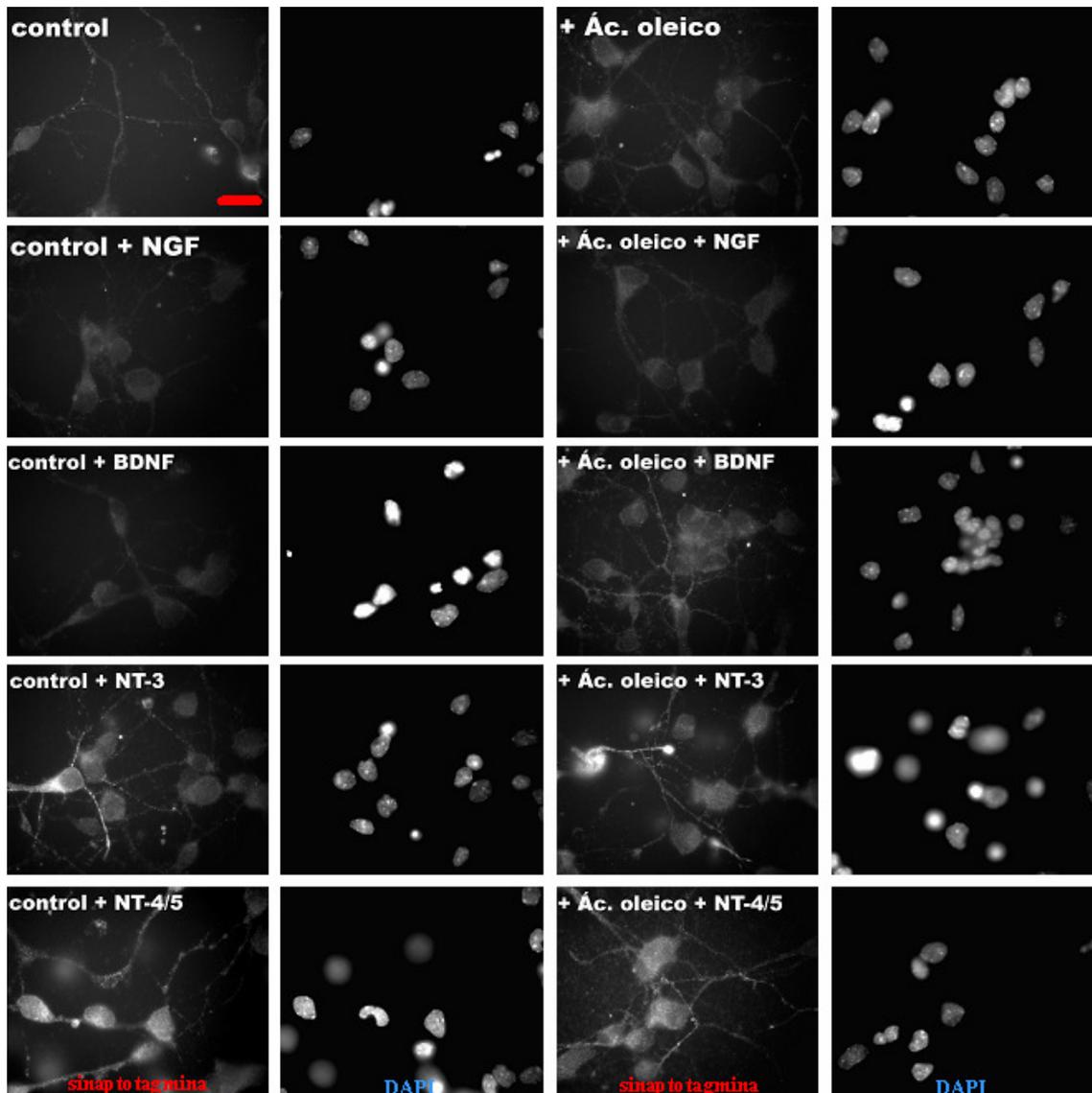


Figura 25: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la localización de la sinaptotagmina I, en presencia y en ausencia de ácido oleico a las 48h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). En las condiciones que se indica, las células se incubaron también en presencia de NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l ó NT-4/5 50 ng/ μ l. A las 48h de cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de la sinaptotagmina I, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra sinaptotagmina I y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando la sinaptotagmina I y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μ m.

4.5.2. Estudio del efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión y localización del receptor de glutamato, en sus isoformas 2 y 3, (GluR-2/3)

Para estudiar el efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión del receptor de glutamato GluR-2/3, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M, suplementando en los casos que se indique, con NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Al cabo de 24 ó 48 horas de cultivo se extrajeron las proteínas y se realizó una transferencia tipo *Western*, como se describe en Material y Métodos.

Para estudiar el efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la expresión y la localización subcelular del receptor GluR-2/3, las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M, suplementando, en los casos que se indique, con NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Al cabo de 24 ó 48 horas de cultivo las células se fijaron y, posteriormente, se realizó una inmunocitoquímica, como se describe en Material y Métodos.

A las 24 horas de cultivo (figura 26) se puede observar el aumento de, aproximadamente, el 40% en la expresión del receptor GluR-2/3, en presencia de ácido oleico. Las neurotrofinas NGF y BDNF no produjeron ninguna modificación significativa ni en ausencia ni en presencia de ácido oleico. Sin embargo, las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 producen un aumento significativo sobre la expresión del GluR-2/3 del 40% y del 20%, respectivamente, no siendo este efecto aditivo al producido por el ácido oleico.

La figura 27 muestra la localización de GluR-2/3 a las 24 horas de cultivo. La fluorescencia correspondiente al GluR-2/3 se encuentra localizada fundamentalmente en las neuritas. Se puede observar un aumento de la intensidad en la fluorescencia en presencia de ácido oleico, así como en las neuronas que se encuentran suplementadas con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5. Cuando la intensidad de la fluorescencia es mayor podemos observar también, mucho más nítidas, las neuritas.

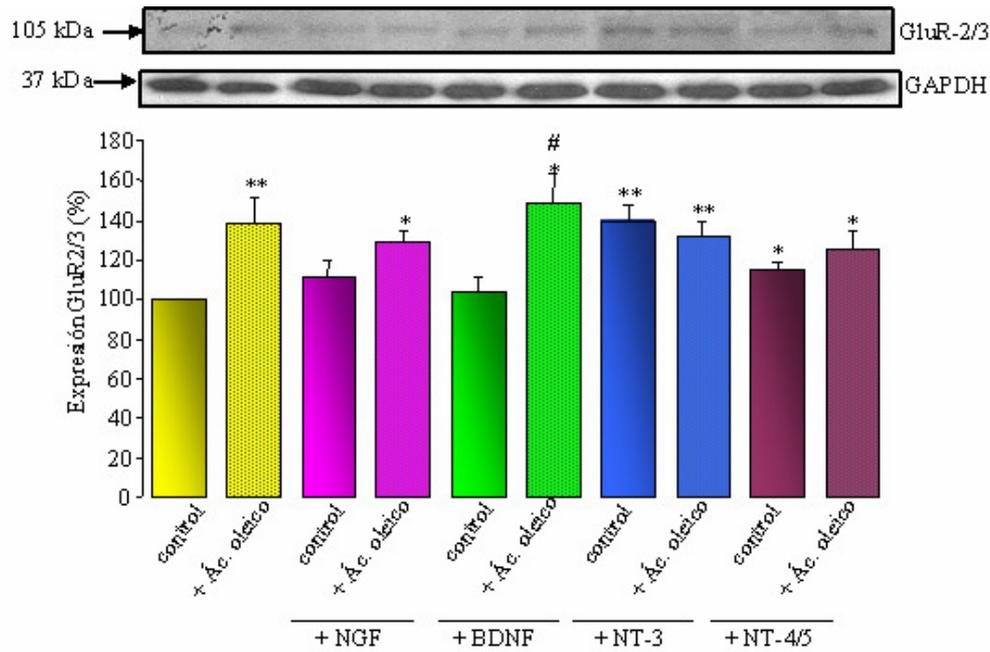


Figura 26: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión del receptor de glutamato en sus isoformas 2 y 3 (GluR-2/3), en presencia y en ausencia de ácido oleico, a las 24h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NGF 100 ng/ μl , BDNF 50 ng/ μl , NT-3 50 ng/ μl o NT-4/5 50 ng/ μl . Las proteínas se extrajeron 24 horas de cultivo. La expresión del GluR-2/3 se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$ y ** $p < 0,01$. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de las distintas neurotrofinas se expresa como # $p < 0,5$ (*t de Student*).

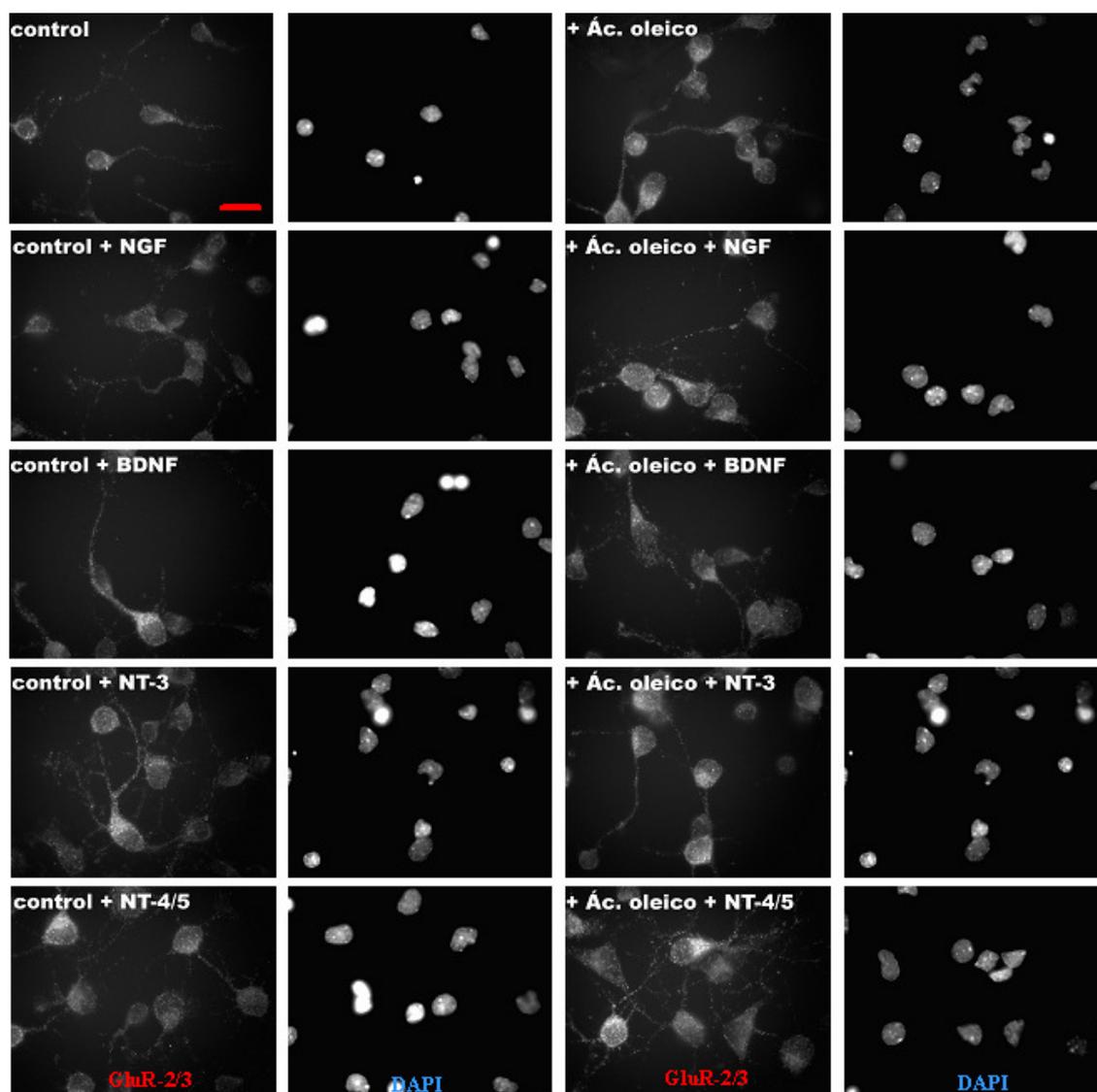


Figura 27: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la localización del receptor GluR-2/3, en presencia y en ausencia de ácido oleico, a las 24h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indica, las células se incubaron también en presencia de NGF 100 ng/ μl , BDNF 50 ng/ μl , NT-3 50 ng/ μl o NT-4/5 50 ng/ μl . A las 24h de cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de GluR-2/3, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra GluR-2/3 y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando el GluR-2/3 y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

A las 48 horas de cultivo (figura 28) se observa un aumento de, aproximadamente, el 20% en la expresión de GluR-2/3, en presencia de ácido oleico. El NGF no produce ningún aumento de la expresión de la proteína, inhibiendo, incluso, el efecto del ácido oleico. Por otro lado, tanto BDNF como NT-3 y NT-4/5, producen un aumento significativo de la

expresión del GluR-2/3, del 30%, 10% y 40%, respectivamente. Este aumento no es aditivo con respecto al del ácido oleico.

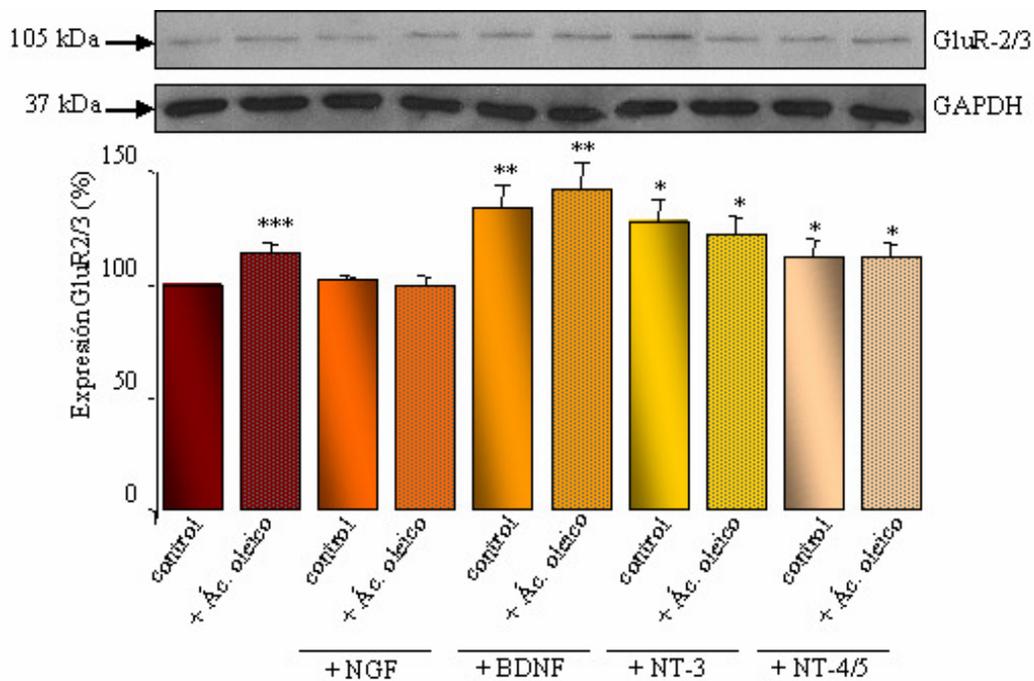


Figura 28: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión del receptor de glutamato en sus isoformas 2 y 3 (GluR-2/3), en presencia y en ausencia de ácido oleico, a las 48h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μ M (+Ác. oleico). En las condiciones que se indican, las neuronas se incubaron también en presencia de NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Las proteínas celulares se extrajeron a las 48 horas de cultivo. La expresión de GluR-2/3 se determinó por transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *NIH image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la banda de la condición control y son medias \pm SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias respecto a los valores obtenidos en ausencia de ácido oleico se expresa como * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ (*t de Student*).

La figura 29 muestra la localización de GluR-2/3 a las 48 horas de cultivo. Como puede observarse, la fluorescencia correspondiente al GluR-2/3 se encuentra localizada fundamentalmente en las neuritas. Se puede observar, asimismo, un aumento de la intensidad en la fluorescencia en presencia de ácido oleico, así como en las neuronas que se encuentran suplementadas con las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4/5.

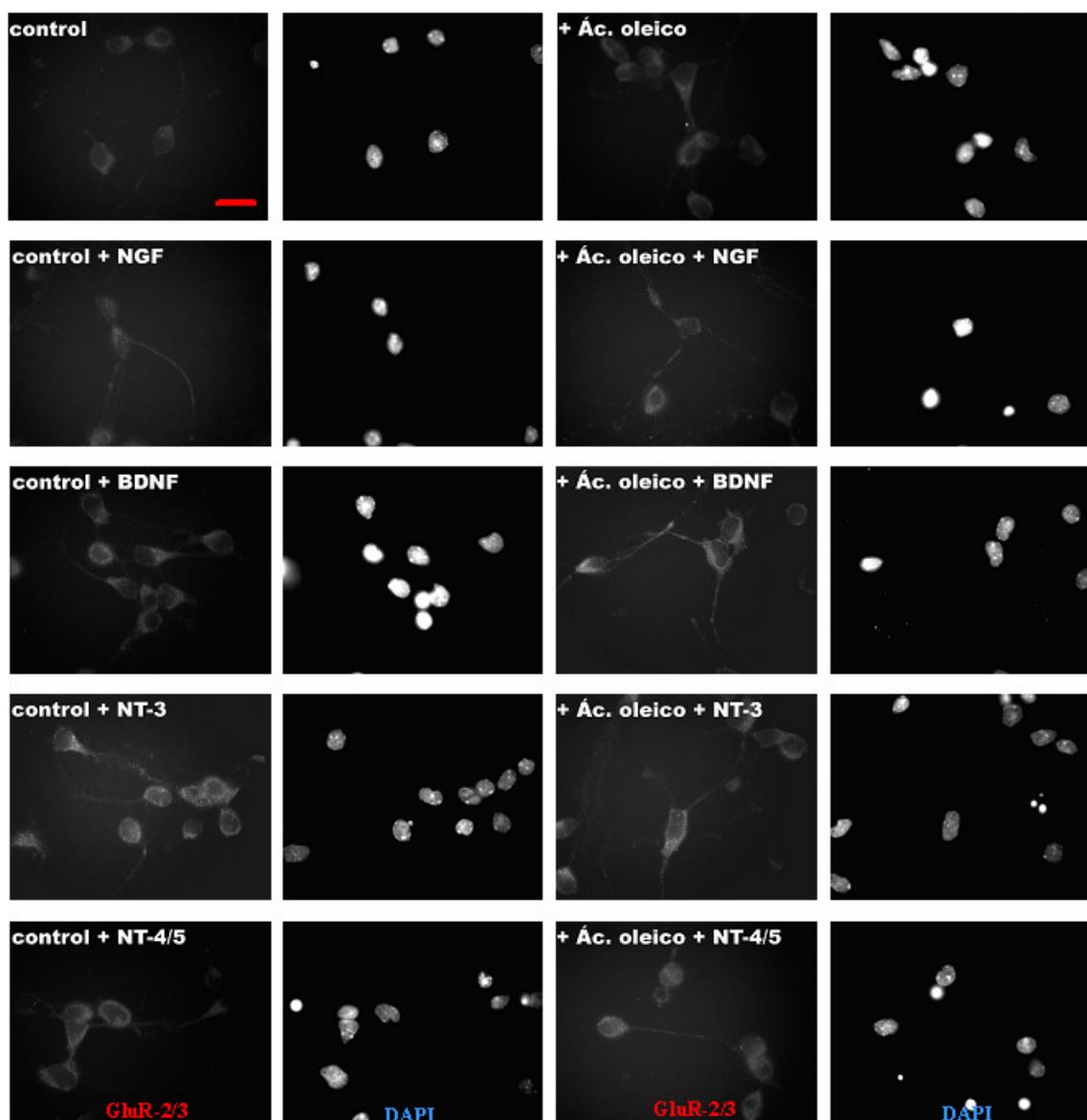


Figura 29: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la localización del receptor GluR-2/3, en presencia y en ausencia de ácido oleico, a las 48h de cultivo.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indica, las células se incubaron también en presencia de NGF 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. A las 48h de cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia de GluR-2/3, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario policlonal contra GluR-2/3 y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Se tomaron fotografías con una cámara digital conectada al microscopio de fluorescencia, mostrando el GluR-2/3 y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 20 μm .

4.5.3. Estudio del efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico sobre la formación de sinapsis

Para estudiar la posible funcionalidad de las proteínas sinápticas expresadas por las células en cultivo y el efecto de las neurotrofinas y el ácido oleico, estudiamos la formación de los denominados “puntos individuales de sinapsis”, estudiando la colocalización de las proteínas sinaptotagmina I y PSD-95 (marcadores pre y post-sinápticos, respectivamente) (Christopherson y col., 2005). Las neuronas se cultivaron en ausencia o en presencia de ácido oleico 50 μ M, suplementando, en los casos que se indique, con NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. Al cabo de 72 horas de cultivo las células se fijaron y, posteriormente, se realizó una inmunocitoquímica, como se describe en Material y Métodos.

En la figura 30 se puede observar que en presencia de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, existe un aumento de la expresión de sinaptotagmina I (K y N). Se observa, asimismo, que los puntos de fluorescencia correspondientes a las dos proteínas se encuentran más cercanos, llegando incluso a aparecer colocalización (L y O; Amarillo), mientras que ni NGF ni BDNF presentan ningún efecto.

En la figura 31 se puede observar que el ácido oleico aumenta significativamente la expresión de sinaptotagmina I (E) y PSD-95 (D). Además, se observa un aumento de la colocalización (amarillo) cuando se suplementan las neuronas con las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 (I, L, O y R).

En la figura 32 se muestran, de forma ampliada, las figuras 30 y 31, en las cuales la colocalización (amarillo) es mayor. Se puede observar que el número de puntos amarillos (colocalización) aumenta significativamente en presencia de NT-3 (B) y NT-4/5 (C), en comparación con la situación control (A). Además, también se puede observar que los puntos amarillos (colocalización), correspondientes a los “puntos individuales de sinapsis”, aumentan significativamente en presencia de ácido oleico y las neurotrofinas BDNF (E), NT-3 (F) y NT-4/5 (G). La colocalización aparece, sobre todo, en los axones.

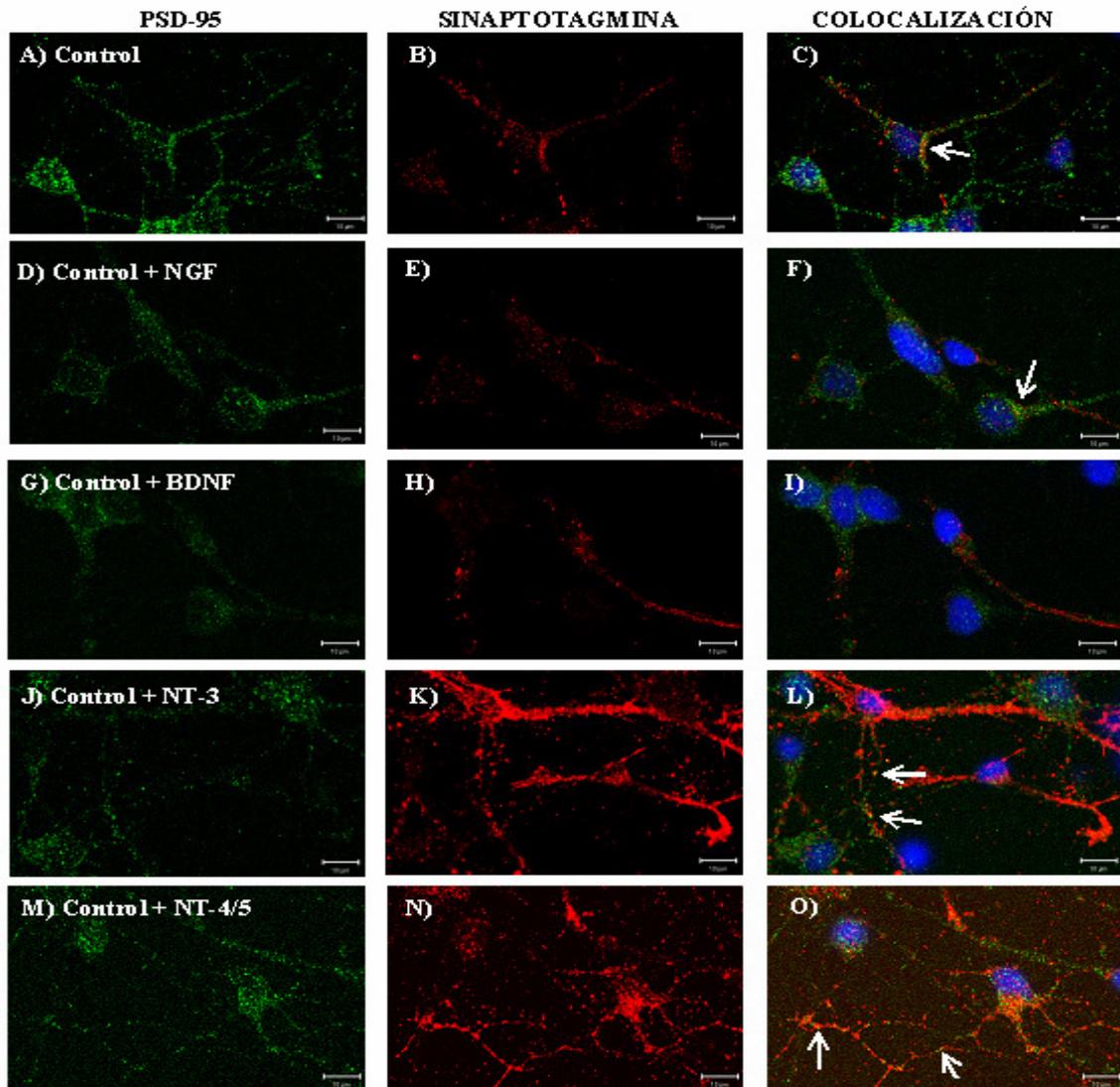


Figura 30: Efecto de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 sobre la colocalización de los marcadores de sinapsis, sinaptotagmina y PSD-95.

Las neuronas se cultivaron en medio definido (control), y se incubaron en presencia de NGF 100 ng/ μ l, BDNF 50 ng/ μ l, NT-3 50 ng/ μ l o NT-4/5 50 ng/ μ l. A las 72 horas de cultivo las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia del PSD-95 y de sinaptotagmina I, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario monoclonal contra PSD-95, un anticuerpo primario policlonal contra sinaptotagmina I, un anticuerpo secundario monoclonal Alexa488 y un anticuerpo secundario policlonal conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal, mostrando el PSD-95, la sinaptotagmina I y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 10 μ m.

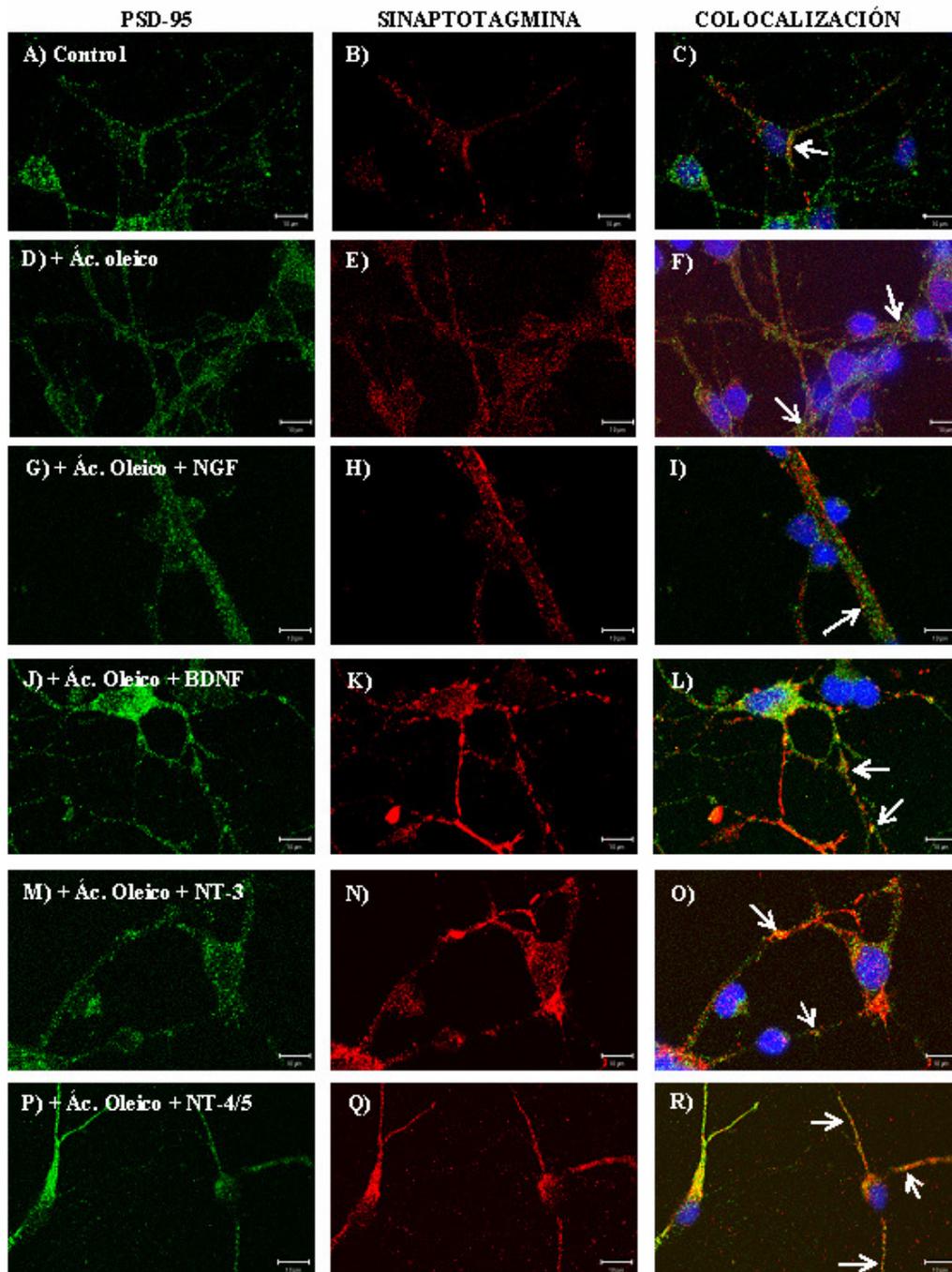


Figura 31: Efecto del ácido oleico y las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5, sobre la colocalización de los marcadores de sinapsis, sinaptotagmina I y PSD-95.

Las neuronas se cultivaron en medio definido, en ausencia (control) o en presencia de ácido oleico 50 μM (+Ác. oleico). En las condiciones que se indica, las células se incubaron también en presencia de NGF 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, BDNF 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, NT-3 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o NT-4/5 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. . A las 72h de cultivo las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y, tras ser permeabilizadas con metanol a -20°C , se determinó inmunocitoquímicamente la presencia del PSD-95 y de sinaptotagmina I, tal y como se describe en Material y Métodos. Se emplearon un anticuerpo primario monoclonal contra PSD-95, un anticuerpo primario policlonal contra sinaptotagmina I, un anticuerpo secundario monoclonal conjugada con Alexa488 y un anticuerpo secundario policlonal conjugado con Cy3. Los núcleos se visualizaron con DAPI. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal, mostrando el PSD-95, la sinaptotagmina I y los núcleos del mismo campo. La barra de calibrado corresponde a 10 μm .

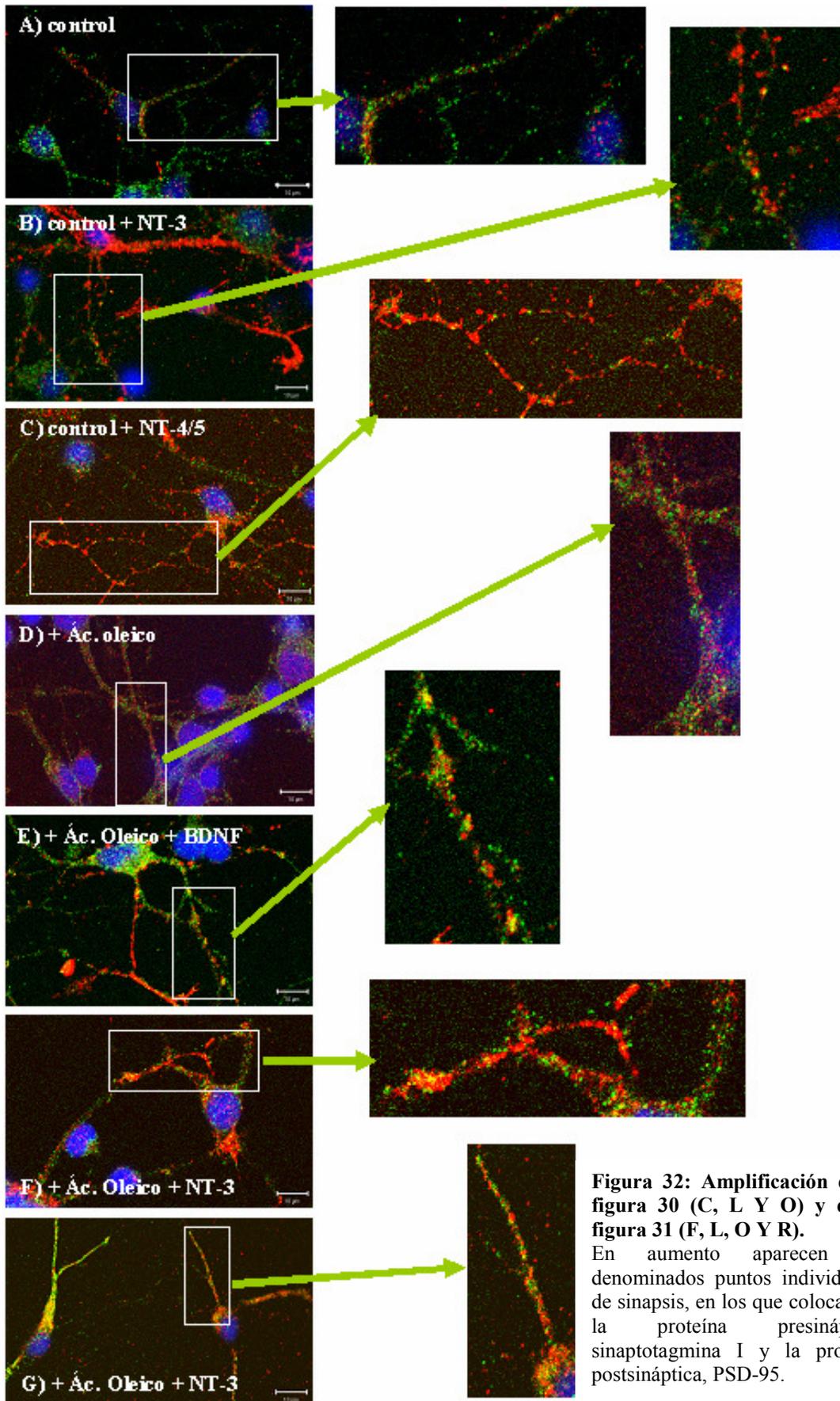
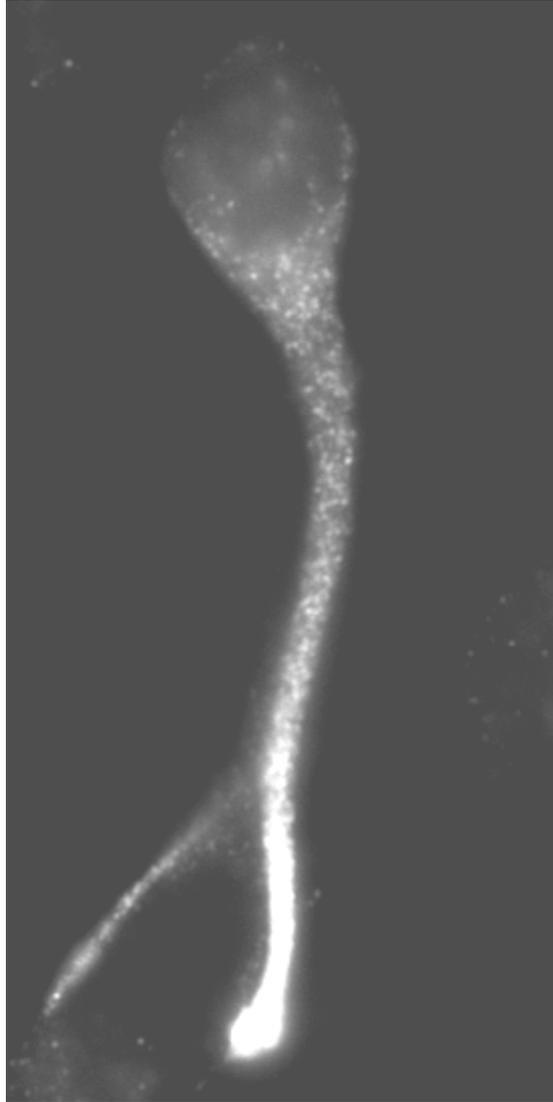


Figura 32: Amplificación de la figura 30 (C, L Y O) y de la figura 31 (F, L, O Y R).
 En aumento aparecen los denominados puntos individuales de sinapsis, en los que colocan la proteína presináptica, sinaptotagmina I y la proteína postsináptica, PSD-95.



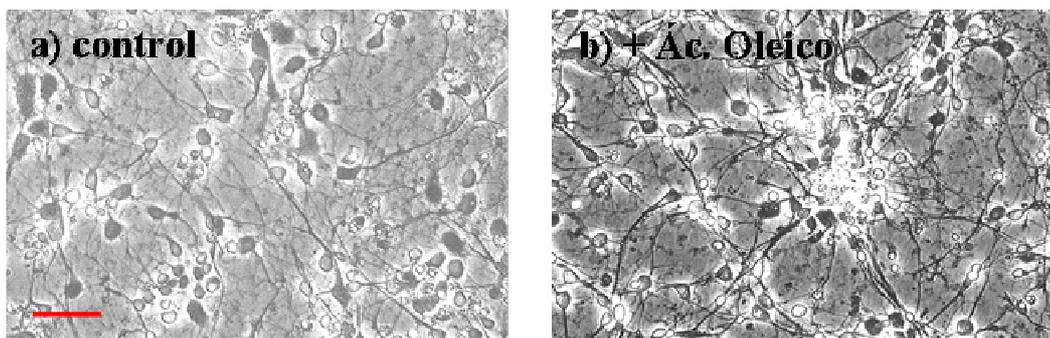
5. DISCUSIÓN

En el cerebro adulto, las vías nerviosas son fijas e inmutables, todo puede morir, nada puede regenerarse.

Santiago Ramón y Cajal (1928)

5.1. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO OLEICO

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que los astrocitos sintetizan y liberan ácido oleico que, una vez captado por las neuronas, promueve la diferenciación neurítica (Tabernero y col., 2001; Tabernero y col., 2002). En este sentido, el ácido oleico promueve la agregación de las neuronas en grupos que emiten axones y dendritas, formando una red celular similar a la materia blanca y la materia gris del Sistema Nervioso Central (ver esquema 22) (Tabernero y col., 2001). Esta diferenciación, promovida por el ácido oleico, también se detecta a nivel molecular por el aumento de la síntesis de proteínas marcadoras del crecimiento axonal y dendrítico, tales como la proteína asociada al crecimiento, GAP-43 (Tabernero y col., 2001), y la proteína asociada a los microtúbulos, MAP-2, respectivamente (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004). Es necesario resaltar que ambas proteínas, GAP-43 y MAP-2, son específicas del desarrollo neuronal, puesto que su expresión queda muy reducida durante la vida adulta. De hecho, la GAP-43 sirve de andamiaje para la construcción de los axones, desapareciendo una vez que finaliza el desarrollo del Sistema Nervioso (Benowitz y Routtenberg, 1997; Oestreicher y col., 1997). La MAP-2 parece cumplir un papel similar en la construcción de las dendritas, al permitir la estabilización de los microtúbulos durante su ensamblaje. Posteriormente, la MAP-2 es sustituida por otras proteínas de la misma familia que se encargarán, a largo plazo, de la estabilidad de los microtúbulos (Sánchez y col., 2000).



Esquema 22: El ácido oleico produce el agrupamiento de las neuronas por los somas, emitiendo de forma radial los axones.

La región promotora de la GAP-43 está formada por 7 cajas E (E1 a E7), organizadas en 2 grupos, un grupo distal (E3 a E7) y un grupo proximal (E1 y E2), de forma que su expresión está regulada directamente por los factores de transcripción bHLH (Chiaramello y col., 1996). En este sentido, se ha descrito que uno de los factores de transcripción de la familia bHLH, el Nex-1, está implicado en la expresión tanto de la GAP-43, como de la

MAP-2 (Uittenbogaard y Chiaramello, 2005). Asimismo, el ácido oleico aumenta la expresión de NeuroD2, un factor de transcripción perteneciente también a la familia bHLH. Por todo ello decidimos estudiar la posible implicación de estos factores de transcripción (NeuroD1, NeuroD2 y Nex-1) en el efecto neurotrófico del ácido oleico.

Como muestra la figura 4, el ácido oleico no produce ningún efecto sobre la expresión del factor de transcripción NeuroD1. Sin embargo, se puede observar que el ácido oleico aumenta significativamente la expresión del factor de transcripción NeuroD2 (figura 5). Esto concuerda con el hecho de que el NeuroD2 actúa sobre el promotor de la GAP-43, produciendo su activación, mientras que el NeuroD1 no presenta ningún efecto sobre el mencionado promotor (McCormick y col., 1996). Además, hay que tener en cuenta que estos factores de transcripción están regulados no solo por ellos mismos, sino también por el factor de transcripción Nex-1. En este sentido, nuestros resultados indican (figura 6) que el ácido oleico aumenta la expresión del mRNA de Nex-1 a tiempos cortos, lo que sugiere que está implicado en la ruta de señalización del ácido oleico. Posiblemente el Nex-1 está situado antes que el NeuroD2 en la ruta de señalización, puesto que el efecto del ácido oleico sobre Nex-1 se produce a tiempos más cortos que sobre el NeuroD2.

5.2. EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO SOBRE LA MIGRACIÓN Y LA FORMACIÓN DE SINAPSIS

Teniendo en cuenta que el ácido oleico promueve la agregación de las neuronas en grupos, los cuales emiten axones y dendritas que forman una red celular similar a la materia blanca y gris del sistema nervioso central (ver esquema 22) (Taberner y col., 2001), decidimos estudiar el posible mecanismo del ácido oleico sobre la migración de las neuronas. Para ello hemos estudiado un marcador específico de la migración neuronal, la doblecortina (DCX). La DCX es una proteína asociada a los microtúbulos, que se encuentra ampliamente expresada en neuronas en migración (Gleeson y col., 1999). Además, está regida por los factores de transcripción bHLH antes mencionados (Ge y col., 2006).

En este sentido, nuestros resultados indican (figuras 9 y 10) que la presencia de ácido oleico produce la agrupación de las neuronas, a la vez que se observa un aumento significativo en la expresión de la DCX. Este hecho sugiere que el ácido oleico no sólo actúa como factor neurotrófico produciendo la diferenciación de axones y dendritas, sino que también está

implicado en los procesos de migración neuronal, posiblemente a través de los factores de transcripción de la familia NeuroD.

Por otro lado, y dado que el ácido oleico está implicado en el crecimiento de los axones y dendritas, decidimos estudiar si el ácido oleico inducía la formación de la sinapsis. Utilizamos tres marcadores sinápticos: el PSD-95 y el GluR-2/3 como marcadores post-sinápticos, y la sinaptotagmina I como marcador pre-sináptico. La sinaptotagmina I (ver apartado 1.1.1.5.3) es un sensor del ión calcio, localizada en la sinapsis con objeto de regular la liberación de neurotransmisores (Koh y Bellen, 2003).

En este sentido, nuestros resultados indican (ver figuras 11 y 12) que el ácido oleico produce un aumento de la expresión de la sinaptotagmina I. Estos resultados sugieren que el ácido oleico promueve la síntesis de sinaptotagmina I con objeto de colaborar en la formación de las estructuras pre-sinápticas.

Basándonos en que los receptores de glutamato (GluR) median la mayoría de las neurotransmisiones rápidas excitatorias en el cerebro de los mamíferos y, por lo tanto, está localizado en la mayoría de las sinapsis (ver apartado 1.1.1.5.4), decidimos estudiar la posible implicación del ácido oleico en la expresión y localización del receptor GluR-2/3 como uno de los marcadores específicos post-sinápticos.

Por otro lado, el PSD-95 es un miembro de la superfamilia de proteínas asociadas a membrana (ver apartado 1.1.1.5.5), que actúan como controladores de la función de la sinapsis excitatorias (Beique y col., 2006). Además, el PSD-95 interacciona con vesículas que contienen proteínas destinadas a la membrana post-sináptica, lo que hace de él un buen marcador post-sináptico (Groc y Choquet, 2006).

En este sentido, nuestros resultados indican que la presencia del ácido oleico aumenta la expresión tanto de GluR-2/3 (figuras 13 y 14), como de PSD-95 (figura 15), lo que sugiere que el ácido oleico media en la formación de las estructuras post-sinápticas.

Teniendo en cuenta que el ácido oleico puede estar implicado no sólo en el aumento de la expresión de las proteínas marcadoras de sinapsis, sino que también puede estar actuando como mediador en la formación de la propia sinapsis, decidimos estudiar la posible colocalización de la sinaptotagmina I y el PSD-95. Basándonos en los estudios de Christopherson y col. (Christopherson y col., 2005), consideramos que en la doble

inmunocitoquímica para sinaptotagmina I y PSD-95, los puntos amarillos de colocalización, denominados “puntos individuales de sinapsis”, corresponden con sitios de sinapsis funcional simple. En este sentido, nuestros resultados indican (figuras 16 y 17) que el ácido oleico produce un aumento del número de puntos amarillos, indicando la posible colocalización de la sinaptotagmina I y el PSD-95 inducida por el ácido oleico. De ser así, el ácido oleico no sólo promueve la formación de las estructuras pre y post-sinápticas sino que indica la aproximación de ambas estructuras en el espacio.

Es necesario mencionar que el factor de transcripción Nex-1 induce la expresión del PSD-95, así como de otras proteínas implicadas en la liberación de neurotransmisores, tales como son la sinaptotagmina VII (Uittenbogaard y Chiaramello, 2004). En este sentido, podría sugerirse que el ácido oleico actúa sobre la sinaptogénesis aumentando la expresión de las proteínas pre y post-sinápticas, a través del factor de transcripción Nex-1.

5.3. INFLUENCIA DE LAS NEUROTROFINAS SOBRE LOS EFECTOS DEL ÁCIDO OLEICO

En experimentos previos de nuestro laboratorio (ver apartado 1.2.3) comprobamos que el ácido oleico muestra un efecto sinérgico con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de GAP-43 (Granda y col., 2003). Las neurotrofinas son factores neurotróficos (ver apartado 1.2.1) muy importantes en el desarrollo del Sistema Nervioso (Castellanos-Ortega y col., 1999). En este sentido, las neurotrofinas están implicadas en la neurogénesis, migración neuronal, crecimiento de axones y dendritas, sinaptogénesis, mielinización, expresión fenotípica de neurotransmisores y en la apoptosis (Snider, 1994; Chan y col., 2001). Además, recientemente se ha descrito que las neurotrofinas juegan un importante papel en la regulación de proteínas pre y post-sinápticas, al menos en las neuronas bipolares del ganglio espinal (Flores-Otero y col., 2007).

Según se ha descrito, (Medina y col., 2004; Calella y col., 2007), las vías de señalización de las neurotrofinas y la de los factores de transcripción de la familia NeuroD están relacionadas entre sí. Así mismo, las neurotrofinas estimulan la diferenciación neuronal por alteración del balance de expresión de los factores de transcripción bHLH (Ito y col., 2003). Por otro lado, Liu y col. (Liu y col., 2004) han descrito que el factor de transcripción NeuroD1 se une al promotor del receptor de las neurotrofinas TrkB, aumentando su expresión. Basándonos en estos resultados,

decidimos estudiar la posible implicación del factor de transcripción NeuroD1 en el efecto sinérgico del ácido oleico con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de GAP-43.

Nuestros resultados indican que, tanto el ácido oleico como las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, no tienen por sí solos ningún efecto sobre la expresión del NeuroD1 (figuras 4 y 7). Sin embargo, el ácido oleico y las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, conjuntamente, ejercen un claro efecto sobre la expresión del NeuroD1. Sin embargo, las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 (figura 8) no producen ningún efecto, ni solas ni en presencia de ácido oleico, sobre la expresión del NeuroD2. Todo esto parece indicar, por consiguiente, que es el factor de transcripción NeuroD1, y no el NeuroD2, el que está implicado en el efecto sinérgico del ácido oleico y las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la expresión de la GAP-43. En este sentido, el NeuroD2 estaría implicado en el mecanismo de acción del ácido oleico, pero no en el de las neurotrofinas.

Teniendo en cuenta la interacción del ácido oleico y las neurotrofinas a través de los NeuroD1 y NeuroD2, decidimos estudiar la posible implicación de las neurotrofinas y el ácido oleico en la migración neuronal. Nuestros resultados indican (figuras 18, 19, 20 y 21) que las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 tienen un efecto individual directo sobre la doblecortina (DCX). Además, se observa que el efecto del ácido oleico sobre la expresión de la DCX es sumatorio con respecto al de las neurotrofinas, lo que sugiere que el ácido oleico y las neurotrofinas actúan por distintas vías. Por consiguiente, se puede sugerir que el ácido oleico colabora con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 en el proceso de migración neuronal.

Por otro lado, es sobradamente conocido que las neurotrofinas regulan la plasticidad neuronal y el desarrollo de las sinapsis, así como la propia transmisión sináptica, aunque su mecanismo de acción no es del todo conocido (Thoenen, 1995; Narisawa-Saito y col., 1999). Así pues, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la posible interacción entre el ácido oleico y las neurotrofinas en la expresión de las proteínas marcadoras de sinapsis: GluR-2/3, sinaptotagmina I y PSD-95.

En este sentido, nuestros resultados muestran (figuras 22, 23, 24 y 25) que las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4/5 aumentan, al igual que el ácido oleico, la expresión de sinaptotagmina I. Sin embargo, el efecto de las neurotrofinas y del ácido oleico no es sumatorio.

La NT-3 y la NT-4/5 (figuras 26, 27, 28, 29 y 30), por sí solas, producen un aumento de la expresión del receptor de glutamato GluR-2/3, siendo este efecto muy similar al que produce el ácido oleico. Sin embargo, cuando el ácido oleico y las neurotrofinas se añaden juntos, no se produce ningún efecto sumatorio, lo que indica que las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 y el ácido oleico actúan a través de una misma vía.

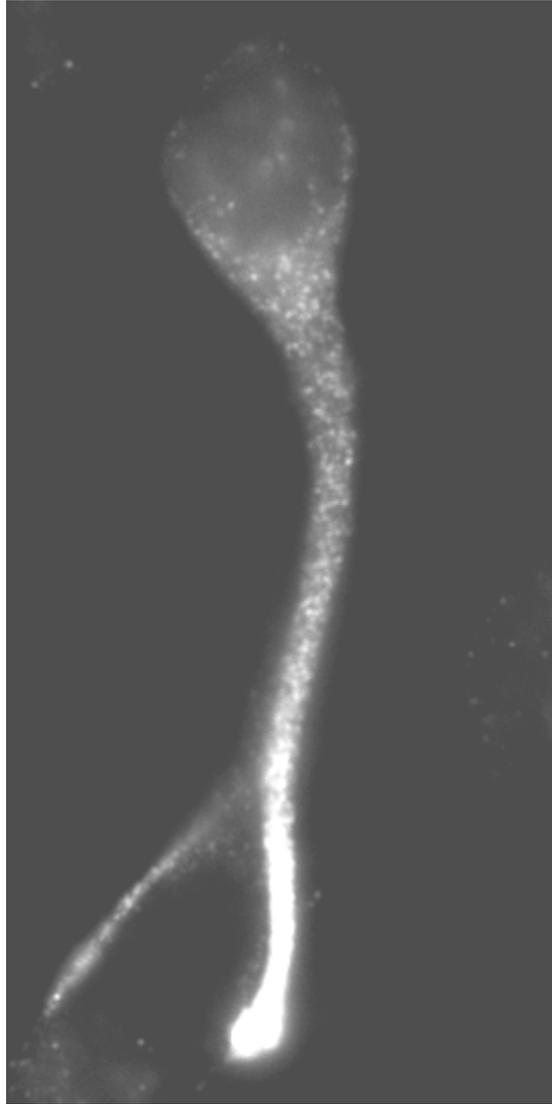
Por último, basándonos en nuestros resultados, que parecían indicar que el ácido oleico no sólo estaba implicado en el aumento de la expresión de las proteínas marcadoras de sinapsis, sino que también actuaba como mediador en la formación de la propia sinapsis (figura 16 y 17), decidimos estudiar la posible relación entre el ácido oleico y las neurotrofinas en la formación de sitios de sinapsis funcional simple.

En la figura 30 podemos comprobar cómo las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 por sí solas, producen un aumento del número de puntos amarillos de colocalización, sobre todo en los axones. Así mismo, en la figura 31 se muestra un aumento de los puntos amarillos de colocalización en las neuronas tratadas con ácido oleico, así como cuando las neuronas son suplementadas, además, con neurotrofinas. En la figura 32 podemos ver, de forma más ampliada, esos puntos amarillos de colocalización localizados en los axones, en las condiciones donde parece aumentar esa sinapsis funcional simple. Sin embargo, no se observan efectos sumatorios entre el ácido oleico y las neurotrofinas, lo que sugiere que ambos efectos siguen la misma vía de transducción. Por consiguiente, podemos afirmar que tanto la NT-3, como la NT-4/5, como el ácido oleico, producen un aumento de la expresión de las proteínas marcadoras de sinapsis, GluR-2/3 y sinaptotagmina, así como su colocalización. Sin embargo, los efectos de las neurotrofinas y el ácido oleico siguen el mismo camino, lo que sugiere que del ácido oleico y el de las neurotrofinas sobre la formación de sinapsis no coinciden en un mismo tiempo de desarrollo del Sistema Nervioso (ver tabla 1).

En resumen, podemos afirmar que los efectos del ácido oleico sobre las proteínas marcadoras de la migración neuronal y de la formación de sinapsis, son muy similares a los efectos producidos por factores neurotróficos ampliamente reconocidos, como son las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4/5, lo que corrobora la hipótesis de que el ácido oleico es un factor neurotrófico. Así mismo, la interacción entre el ácido oleico y las neurotrofinas es evidente, aunque sus efectos varían siendo sinérgicos, en el caso del efecto sobre la GAP-43 y el NeuroD1, o sumatorio como en el caso de la DCX, o a través de la misma vía, en el caso de la sinaptogénesis.

	control	+ Ác. oleico	+ NGF	+ NGF + Ác. oleico	+ BDNF	+ BDNF + Ác. oleico	+ NT- 3	+ NT- 3 + Ác. olei co	+ NT- 4/5	+ NT- 4/5 + Ác. oleico
DCX	100%	***				**	**	**	***	***
Sinapto- tagmina I	100%	***		*	*	**	**	**	***	***
GluR-2/3	100%	***			**	**	*	*	*	*

Tabla 1: Resumen del efecto del ácido oleico y las neurotrofinas sobre la expresión de DCX, GluR-2/3 y sinaptotagmina I.



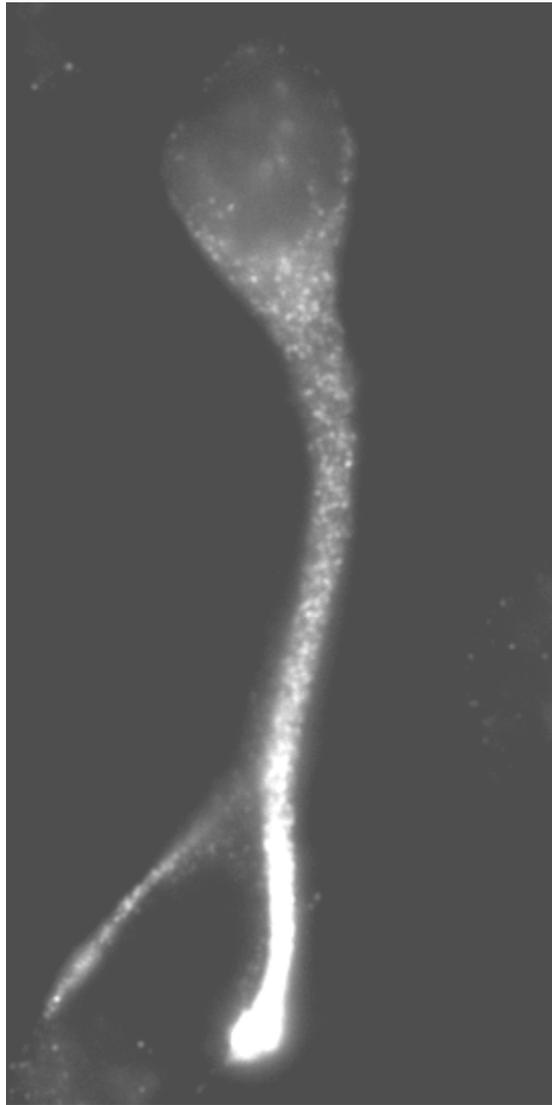
6. CONCLVSIONES

Cuida tu cerebro y tu cerebro cuidará de ti.

Anónimo

1. El ácido oleico aumenta la expresión de los factores de transcripción neurogénicos Nex-1 y NeuroD2, lo que sugiere que el ácido oleico induce la diferenciación neuronal a través de estos factores de transcripción.
2. El ácido oleico y las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, producen un aumento sinérgico de la expresión del factor de transcripción NeuroD1. Dado que el ácido oleico no muestra ningún efecto sobre la expresión de los receptores Trks de las neurotrofinas, se puede concluir que el efecto sinérgico encontrado entre el ácido oleico y las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 sobre la diferenciación neuronal estaría mediado por el factor de transcripción NeuroD1.
3. El ácido oleico aumenta la expresión de la proteína marcadora de la migración neuronal doblecortina (DCX), de forma similar a como lo hacen las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, lo que sugiere que el ácido oleico regula alguno de los procesos de migración neuronal.
4. El ácido oleico aumenta la expresión de las proteínas marcadoras de sinapsis sinaptotagmina, GluR-2/3 y PSD-95. Este efecto es similar al observado con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5.
5. El ácido oleico, al igual que las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, promueve la colocalización de la sinaptotagmina I, marcadora presináptica, y del PSD-95, marcadora postsináptica. Por lo tanto, el ácido oleico aumenta el número de “puntos individuales de sinapsis”, lo que indica la formación de las sinapsis.

CONCLUSIÓN FINAL: Los resultados presentados en esta memoria nos permiten concluir que el efecto neurotrófico del ácido oleico no solo incluye el crecimiento dendrítico y axonal, sino que al igual que las neurotrofinas, participa en otras etapas críticas en el desarrollo del SNC tales como la migración neuronal y la formación de las sinapsis.



7. BIBLIOGRAFÍA

Hay 3 etapas en todo descubrimiento: Primero, la gente rechaza lo que es verdad. Luego niega lo que es evidente. Finalmente se atribuye el mérito a quién no le corresponde.
Alexander von Humboldt. Naturalista y explorador

1. **Alberts B., Johson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., y Walter P. (2004)** *Biología Molecular de la Célula*, Garland Publishing, Inc., Ediciones Omega S.A., Barcelona.
2. **Arias C., Becerra-Garcia F., Arrieta I. y Tapia R. (1998)** The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus in vivo *Exp Neurol*, 153, 242-54.
3. **Austin C. P. y Cepko C. L. (1990)** Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex *Development*, 110, 713-732.
4. **Avila J., Dominguez J. y 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.
5. **Barbacid M. (1995)** Neurotrophic factors and their receptors *Curr Opin Cell Biol*, 7, 148-55.
6. **Bartholoma A. y Nave K. A. (1994)** NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons *Mech Dev*, 48, 217-28.
7. **Bartkowska K., Paquin A., Gauthier A. S., Kaplan D. R. y Miller F. D. (2007)** Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development *Development*, 134, 4369-80.
8. **Bayer S. A. (1995)** Neurogenesis and Neuronal Migration, En *The Rat Nervous System*. (Paxinos G.), pp 1041-1076, Academic Press, Sydney.
9. **Becker E., Soler R. M., Yuste V. J., Gine E., Sanz-Rodriguez C., Egea J., Martin-Zanca D. y Comella J. X. (1998)** Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord *J Neurosci*, 18, 7903-11.
10. **Behar T. N., Li Y. X., Tran H. T., Ma W., Dunlap V., Scott C. y Barker J. L. (1996)** GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms *J. Neurosci.*, 16, 1808-1818.
11. **Beique J. C., Lin D. T., Kang M. G., Aizawa H., Takamiya K. y Huganir R. L. (2006)** Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19535-40.
12. **Benowitz L. I. y Routtenberg A. (1997)** GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *TINS*, 20, 84-91.
13. **Bertrand N., Castro D. S. y Guillemot F. (2002)** Proneural genes and the specification of neural cell types *Nat Rev Neurosci*, 3, 517-30.
14. **Brodski C., Schnurch H. y Dechant G. (2000)** Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9683-8.
15. **Brunger A. T. (2005)** Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins *Q Rev Biophys*, 38, 1-47.
16. **Calella A. M., Nerlov C., Lopez R. G., Sciarretta C., von Bohlen Und Halbach O., Bereshchenko O. y Minichiello L. (2007)** Neurotrophin/Trk receptor signaling mediates C/EBPalpha, -beta and NeuroD recruitment to immediate-early gene promoters in neuronal cells and requires C/EBPs to induce immediate-early gene transcription *Neural Develop*, 2, 4.
17. **Carter L. A. y Roskams A. J. (2002)** Neurotrophins and their receptors in the primary olfactory neuraxis *Microsc Res Tech*, 58, 189-96.

18. **Castellanos-Ortega M. R., Cruz-Aguado R. y Martínez-Martí L. (1999)** [Nerve growth factor: possibilities and limitations of its clinical application] *Rev Neurol*, 29, 439-47.
19. **Cattaneo E. y McKay R. (1990)** Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor *Nature*, 347, 762-765.
20. **Caviness J. V. S. (1989)** Normal development of cerebral neocortex, En *Developmental Neurobiology* (Evrard P. y Minkowski A.), 12, pp 1-10, Vevey, Raven Press, New York.
21. **Couillard-Despres S., Winner B., Schaubeck S., Aigner R., Vroemen M., Weidner N., Bogdahn U., Winkler J., Kuhn H. G. y Aigner L. (2005)** Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis *Eur J Neurosci*, 21, 1-14.
22. **Cowan W. M. (1979)** The development of the brain *Sci Am*, 241, 113-33.
23. **Cowan W. M. (1987)** Desarrollo del cerebro, En *El Cerebro* (Hubel D. H.), pp 69-81, Prensa Científica, Barcelona.
24. **Culmsee C., Gerling N., Lehmann M., Nikolova-Karakashian M., Prehn J. H., Mattson M. P. y Kriegstein J. (2002)** Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75 *Neuroscience*, 115, 1089-108.
25. **Chan J. R., Cosgaya J. M., Wu Y. J. y Shooter E. M. (2001)** Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14661-8.
26. **Chao M. V. (1994)** The p75 neurotrophin receptor *J Neurobiol*, 25, 1373-85.
27. **Chiarangelo A., Neuman T., Peavy D. R. y 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, 22035-43.
28. **Christopherson K. S., Ullian E. M., Stokes C. C., Mallowney C. E., Hell J. W., Agah A., Lawler J., Mosher D. F., Bornstein P. y Barres B. A. (2005)** Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis *Cell*, 120, 421-33.
29. **De Pablo F. y Roth J. (1990)** Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors *Trends Biochem. Sci.*, 10, 339-342.
30. **Desai A. y Mitchison T. J. (1997)** Microtubule polymerization dynamics *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 83-117.
31. **Dicicco-Bloom E., Lu N., Pintar J. E. y Zhang J. (1998)** The PACAP ligand/receptor system regulates cerebral cortical neurogenesis *Ann N Y Acad Sci*, 865, 274-89.
32. **Donovan M. H., Yamaguchi M. y Eisch A. J. (2008)** Dynamic expression of TrkB receptor protein on proliferating and maturing cells in the adult mouse dentate gyrus *Hippocampus*, 18, 435-439.
33. **Dussault J. H. y Ruel J. (1987)** Thyroid hormones and brain development *Ann. Rev. Physiol.*, 49, 321-334.
34. **Edelman G. M. (1983)** Cell adhesion molecules. *Science.*, 219, 450-457.
35. **ElShamy W. M. y Ernfors P. (1997)** Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 complement and cooperate with each other sequentially during visceral neuron development *J Neurosci*, 17, 8667-75.
36. **Fedoroff S. (1987)** From neuroepithelium to mature astrocytes, En *Glial-Neuronal Communication in Development and Regeneration* (Althaus H. H. y Seifert W.), vol. 2, pp 4-23, Springer-Verlag, Berlin.

37. **Ferreiro B., Pastor R. y Bernal J. (1990)** T₃ receptor occupancy and T₃ levels in plasma and cytosol during rat brain development *Acta Endocrinol.*, 123, 95-99.
38. **Fizman M. (2003)** Neuroprotección y Factores Neurotróficos *Revista Neurológica Argentina*, 28, 6-10.
39. **Flores-Otero J., Xue H. Z. y Davis R. L. (2007)** Reciprocal regulation of presynaptic and postsynaptic proteins in bipolar spiral ganglion neurons by neurotrophins *J Neurosci*, 27, 14023-34.
40. **Friedman W. J. y Greene L. A. (1999)** Neurotrophin signaling via Trks and p75 *Exp Cell Res*, 253, 131-42.
41. **Friocourt G., Koulakoff A., Chafey P., Boucher D., Fauchereau F., Chelly J. y Francis F. (2003)** Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes *Cereb Cortex*, 13, 620-6.
42. **Garofalo R. S. y Rosen O. M. (1989)** Insulin and insuline like growth factor 1 (IGF-1) receptors during central nervous system development: expression of two immunologically distinct IGF-1 receptor b subunits *Mol. Cell. Biol.*, 9, 2806-2817.
43. **Ge W., He F., Kim K. J., Blanchi B., Coskun V., Nguyen L., Wu X., Zhao J., Heng J. I., Martinowich K., Tao J., Wu H., Castro D., Sobeih M. M., Corfas G., Gleeson J. G., Greenberg M. E., Guillemot F. y Sun Y. E. (2006)** Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1319 -24.
44. **Gleeson J. G., Lin P. T., Flanagan L. A. y Walsh C. A. (1999)** Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons *Neuron*, 23, 257-71.
45. **Goritz C., Mauch D. H. y Pfrieger F. W. (2005)** Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron *Mol Cell Neurosci*, 29, 190-201.
46. **Gotz R., Koster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Schartl M. y Thoenen H. (1994)** Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family *Nature*, 372, 266-9.
47. **Granda B., Taberero A., Tello V. y 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.
48. **Groc L. y Choquet D. (2006)** AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse *Cell Tissue Res*, 326, 423-38.
49. **Hamburger V. y 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.
50. **Hamon M., Bourgoin S., Chanez C. y De Vitry F. (1989)** Do serotonin and other neurotransmitters exert a trophic influence on the immature brain? En *Developmental Neurobiology* (Evrard P. y Minkowski A.), vol. 12, pp 171-183, Vevey, Raven Press, New York.
51. **Han W., Rhee J. S., Maximov A., Lao Y., Mashimo T., Rosenmund C. y Sudhof T. C. (2004)** N-glycosylation is essential for vesicular targeting of synaptotagmin 1 *Neuron*, 41, 85-99.
52. **Hartfuss E., Galli R., Heins N. y Gotz M. (2001)** Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia *Dev Biol*, 229, 15-30.
53. **Herschkowitz N. (1988)** Brain development in the fetus, neonate and infant *Biol Neonate*, 54, 1-19.

54. **Heuckeroth R. O., Lampe P. A., Johnson E. M. y Milbrandt J. (1998)** Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro *Dev Biol*, 200, 116-29.
55. **Huang E. J. y Reichardt L. F. (2003)** Trk receptors: roles in neuronal signal transduction *Annu Rev Biochem*, 72, 609-42.
56. **Ito H., Nakajima A., Nomoto H. y Furukawa S. (2003)** Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1 *J Neurosci Res*, 71, 648-58.
57. **Jessell T. y Sanes J. (2001a)** Generación y supervivencia de las células nerviosas, En *Principios de Neurociencia* (Kandel E., Schwartz J. y Jessell T.), pp 1041-1062, McGraw-Hill/ Interamericana De España, Madrid.
58. **Jessell T. y Sanes J. (2001b)** Inducción y configuración del sistema nervioso, En *Principios de Neurociencia* (Kandel E., Schwartz J. y Jessell T.), pp 1019-1040, McGraw-Hill/ Interamericana de España, Madrid.
59. **Kageyama R. y Nakanishi S. (1997)** Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system *Curr Opin Genet Dev*, 7, 659-65.
60. **Kalil R. E. (1990)** Formación de sinapsis durante el desarrollo del cerebro *Investigación y Ciencia*, Febrero, 26-34.
61. **Kang R., Swayze R., Lise M. F., Gerrow K., Mullard A., Honer W. G. y El-Husseini A. (2004)** Presynaptic trafficking of synaptotagmin I is regulated by protein palmitoylation *J Biol Chem*, 279, 50524-36.
62. **Kaplan D. R. y Miller F. D. (2000)** Neurotrophin signal transduction in the nervous system *Curr Opin Neurobiol*, 10, 381-91.
63. **Khan W. A., Blobe G. C. y Hannun Y. A. (1992)** Activation of protein kinase C by oleic acid *J. Biol. Chem.*, 267, 3605-3612.
64. **Kim W. Y., Fritsch B., Serls A., Bakel L. A., Huang E. J., Reichardt L. F., Barth D. S. y Lee J. E. (2001)** NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development *Development*, 128, 417-26.
65. **Koh T. W. y Bellen H. J. (2003)** Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release *Trends Neurosci*, 26, 413-22.
66. **Koike T., Martin D. P. y Johnson E. M., Jr. (1989)** Role of Ca²⁺ channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca²⁺ determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6421-5.
67. **Konishi Y., Aoki T., Ohkawa N., Matsu-Ura T., Mikoshiba K. y Tamura T. (2000)** Identification of the C-terminal activation domain of the NeuroD-related factor (NDRF) *Nucleic Acids Res*, 28, 2406-12.
68. **Kume H., Maruyama K., Shinozaki K., Kuzume H. y Obata K. (1998)** Phosphorylation and spatiotemporal distribution of KW8 (NDRF/NeuroD2), a NeuroD family basic helix-loop-helix protein *Brain Res Mol Brain Res*, 60, 107-14.
69. **Lapchak P. A., Gash D. M., Jiao S., Miller P. J. y Hilt D. (1997)** Glial cell line-derived neurotrophic factor: a novel therapeutic approach to treat motor dysfunction in Parkinson's disease *Exp Neurol*, 144, 29-34.
70. **Larkfors L., Lindsay R. M. y Alderson R. F. (1994)** Ciliary neurotrophic factor enhances the survival of Purkinje cells in vitro *Eur J Neurosci*, 6, 1015-25.
71. **Lessmann V. (1998)** Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS *Gen Pharmacol*, 31, 667-74.

72. **Li C., Davletov B. A. y Sudhof T. C. (1995)** Distinct Ca²⁺ and Sr²⁺ binding properties of synaptotagmins. Definition of candidate Ca²⁺ sensors for the fast and slow components of neurotransmitter release *J Biol Chem*, 270, 24898-902.
73. **Li X., Franz J., Lottspeich F. y Gotz R. (1997)** Recombinant fish neurotrophin-6 is a heparin-binding glycoprotein: implications for a role in axonal guidance *Biochem J*, 324 (Pt 2), 461-6.
74. **Liao J., He J., Yan T., Korzh V. y Gong Z. (1999)** A class of neuroD-related basic helix-loop-helix transcription factors expressed in developing central nervous system in zebrafish *DNA Cell Biol*, 18, 333-44.
75. **Lin L. F., Doherty D. H., Lile J. D., Bektesh S. y Collins F. (1993)** GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons *Science*, 260, 1130-2.
76. **Liu Y., Encinas M., Comella J. X., Aldea M. y Gallego C. (2004)** Basic helix-loop-helix proteins bind to TrkB and p21(Cip1) promoters linking differentiation and cell cycle arrest in neuroblastoma cells *Mol Cell Biol*, 24, 2662-72.
77. **Longo A., Guanga G. P. y Rose R. B. (2008)** Crystal structure of E47-NeuroD1/beta2 bHLH domain-DNA complex: heterodimer selectivity and DNA recognition *Biochemistry*, 47, 218-29.
78. **Luckenbill E. L. (1997)** Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res.*, 23, 1-27.
79. **Maccioni R. B. y Cambiazo V. (1995)** Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol. Rev.*, 75, 835-864.
80. **Madtes J. P. y Redburn D. A. (1983)** GABA as a trophic factor during development *Life Sci.*, 33, 979-984.
81. **Maisonpierre P. C., Belluscio L., Squinto S., Ip N. Y., Furth M. E., Lindsay R. M. y Yancopoulos G. D. (1990)** Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF *Science*, 247, 1446-51.
82. **Mandelkow E. y Mandelkow E. M. (1995)** Microtubules and microtubule-associated proteins *Curr Opin Cell Biol*, 7, 72-81.
83. **Mauch D. H., Nagler K., Schumacher S., Goritz C., Muller E. C., Otto A. y Pfrieger F. W. (2001)** CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol *Science*, 294, 1354-7.
84. **McCormick M. B., Tamimi R. M., Snider L., Asakura A., Bergstrom D. y Tapscott S. J. (1996)** NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family *Mol Cell Biol*, 16, 5792-800.
85. **Medina D. L., Sciarretta C., Calella A. M., Von Bohlen Und Halbach O., Unsicker K. y Minichiello L. (2004)** TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLCgamma-mediated control of neuronal migration *Embo J*, 23, 3803-14.
86. **Meisami E. y Timiras P. S. (1982)** Normal and abnormal biochemical development of the brain after birth, En *Biochemical Development of the Fetus and Neonate* (Jones C. T.), pp 759-821, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
87. **Meldolesi J., Sciorati C. y Clementi E. (2000)** The p75 receptor: first insights into the transduction mechanisms leading to either cell death or survival *Trends Pharmacol Sci*, 21, 242-3.
88. **Meldrum B. S. (2000)** Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology *J Nutr*, 130, 1007S-15S.

89. **Memberg S. P. y Hall A. K. (1995)** Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors *Mol Cell Neurosci*, 6, 323-35.
90. **Migaud M., Charlesworth P., Dempster M., Webster L. C., Watabe A. M., Makhinson M., He Y., Ramsay M. F., Morris R. G., Morrison J. H., O'Dell T. J. y Grant S. G. (1998)** Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein *Nature*, 396, 433-9.
91. **Miller M. W. (1985)** Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. *Develop. Brain Res.*, 23, 187-192.
92. **Moore C. A., Perderiset M., Kappeler C., Kain S., Drummond D., Perkins S. J., Chelly J., Cross R., Houdusse A. y Francis F. (2006)** Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton *Embo J*, 25, 4448-57.
93. **Nadarajah B. y Parnavelas J. G. (2002)** Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex *Nat Rev Neurosci*, 3, 423-32.
94. **Nagano T., Jourdi H. y Nawa H. (1998)** Emerging roles of Dlg-like PDZ proteins in the organization of the NMDA-type glutamatergic synapse *J Biochem*, 124, 869-75.
95. **Narisawa-Saito M., Carnahan J., Araki K., Yamaguchi T. y Nawa H. (1999)** Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression of AMPA receptor proteins in neocortical neurons *Neuroscience*, 88, 1009-14.
96. **Neve R. L., Harris P., Kosik K. S., Kurnit D. M. y Donlon T. A. (1986)** Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2 *Brain Res*, 387, 271-80.
97. **Nilsson A. S., Fainzilber M., Falck P. y Ibanez C. F. (1998)** Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish *FEBS Lett*, 424, 285-90.
98. **Noctor S. C., Flint A. C., Weissman T. A., Dammerman R. S. y Kriegstein A. R. (2001)** Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex *Nature*, 409, 714-20.
99. **Ocbina P. J., Dizon M. L., Shin L. y Szele F. G. (2006)** Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres *Mol Cell Neurosci*, 33, 126-35.
100. **Oda H., Fushimi F., Kato M., Kitagawa M., Araki K., Seki N. y Ohkubo H. (2005)** Microarray analysis of the genes induced by tetracycline-regulated expression of NDRF/NeuroD2 in P19 cells *Biochem Biophys Res Commun*, 335, 458-68.
101. **Oestreicher B. A., De Graan P. N. E., Gispén H. W., Verhaagen J. y 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.
102. **Ohtsuka T., Asahi M., Matsuura N., Kikuchi H., Hojo M., Kageyama R., Ohkubo H. y 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, 23-9.
103. **Olmsted J. B. (1986)** Microtubule-associated proteins *Annu Rev Cell Biol*, 2, 421-57.

104. **Oppenheim R. W. (1991)** Cell death during development of the nervous system *Annu Rev Neurosci*, 14, 453-501.
105. **Patapoutian A. y Reichardt L. F. (2001)** Trk receptors: mediators of neurotrophin action *Curr Opin Neurobiol*, 11, 272-80.
106. **Perrone-Bizzozero N. I., Cansino V. V. y 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.
107. **Petralia R. S., Sans N., Wang Y. X. y Wenthold R. J. (2005)** Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses *Mol Cell Neurosci*, 29, 436-52.
108. **Pincus D. W., DiCicco-Bloom E. M. y Black I. B. (1990)** Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature*, 343, 564-567.
109. **Rakic P. (1972)** Mode of cell migration to the superficial layers of monkey neocortex *J. Comp. Neurol.*, 145, 61-84.
110. **Rakic P. (1978)** Neuronal migration and contact guidance in primate telencephalon. *Postgrad. Med. J.*, 54, 25-40.
111. **Rakic P. (1985)** Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227, 1054-1056.
112. **Raper J. y Tessier-Lavigne M. (1999)** Growth cones and axon pathfinding, En *Fundamental Neuroscience* (Zimond M., Bloom F., Landis S., Roberts J. y Squire L.), pp 519-546, Academic Press, San Diego.
113. **Reisert I., Han V., Hartwig S., Ahnert-Hilger G. y 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.
114. **Robinson R. C., Radziejewski C., Stuart D. I. y Jones E. Y. (1995)** Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer *Biochemistry*, 34, 4139-46.
115. **Rodríguez-Rodríguez R. A., Tabernero A., Velasco A., Lavado E. M. y 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, 1041-51.
116. **Rosette C. y Karin M. (1995)** Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B *J Cell Biol*, 128, 1111-9.
117. **Sánchez C., Díaz-Nido J. y Avila J. (2000)** Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function *Prog Neurobiol*, 61, 133-68.
118. **Sans N., Petralia R. S., Wang Y. X., Blahos J., 2nd, Hell J. W. y Wenthold R. J. (2000)** A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses *J Neurosci*, 20, 1260-71.
119. **Schmechel D. E. y Rakic P. (1979)** A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.*, 156, 115-152.
120. **Schnell E., Sizemore M., Karimzadegan S., Chen L., Brecht D. S. y Nicoll R. A. (2002)** Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13902-7.
121. **Schoenfeld T. A. y Obar R. A. (1994)** Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system *Int Rev Cytol*, 151, 67-137.

122. **Sendtner M., Gotz R., Holtmann B. y Thoenen H. (1997)** Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice *J Neurosci*, 17, 6999-7006.
123. **Shafit-Zagardo B. y Kalcheva N. (1998)** Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron *Mol Neurobiol*, 16, 149-62.
124. **Shmueli O., Gdalyahu A., Sorokina K., Nevo E., Avivi A. y Reiner O. (2001)** DCX in PC12 cells: CREB-mediated transcription and neurite outgrowth *Hum Mol Genet*, 10, 1061-70.
125. **Simon R., Thier M., Kruttgen A., Rose-John S., Weiergraber O., Heinrich P. C., Schroder J. M. y Weis J. (1995)** Human CNTF and related cytokines: effects on DRG neurone survival *Neuroreport*, 7, 153-7.
126. **Skene J. H. P. (1989)** Axonal growth-associated proteins *Ann. Rev. Neurosci.*, 12, 127-156.
127. **Snider W. D. (1994)** Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us *Cell*, 77, 627-38.
128. **Stockli K. A., Lottspeich F., Sendtner M., Masiakowski P., Carroll P., Gotz R., Lindholm D. y Thoenen H. (1989)** Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor *Nature*, 342, 920-3.
129. **Tabernero A., Bolaños J. P. y Medina J. M. (1993)** Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture *Biochem. J.*, 294, 635-638.
130. **Tabernero A., Lavado E. M., Granda B., Velasco A. y Medina J. M. (2001)** Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes *J Neurochem*, 79, 606-16.
131. **Tabernero A., Velasco A., Granda B., Lavado E. M. y Medina J. M. (2002)** 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, 4240-6.
132. **Takeichi M. (1988)** The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis *Development*, 102, 639-55.
133. **Tarsa L. y Goda Y. (2002)** Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1012-6.
134. **Thoenen H. (1995)** Neurotrophins and neuronal plasticity *Science*, 270, 593-8.
135. **Timiras P. S. y Nzekwe E. U. (1989)** Thyroid hormones and nervous system development *Biol. Neonate*, 55, 376-385.
136. **Tsunoda S., Sierralta J. y Zuker C. S. (1998)** Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes *Curr Opin Genet Dev*, 8, 419-22.
137. **Tucker R. P. (1990)** The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review *Brain Res Brain Res Rev*, 15, 101-20.
138. **Udvardia A. J., Koster R. W. y Skene J. H. (2001)** GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration *Development*, 128, 1175-82.
139. **Uittenbogaard M. y Chiaramello A. (2002)** Constitutive overexpression of the basic helix-loop-helix Nex1/MATH-2 transcription factor promotes neuronal differentiation of PC12 cells and neurite regeneration *J Neurosci Res*, 67, 235-45.
140. **Uittenbogaard M. y Chiaramello A. (2004)** Expression profiling upon Nex1/MATH-2-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and its implication in regeneration *J Neurochem*, 91, 1332-43.

141. **Uittenbogaard M. y Chiaramello A. (2005)** The basic helix-loop-helix transcription factor Nex-1/Math-2 promotes neuronal survival of PC12 cells by modulating the dynamic expression of anti-apoptotic and cell cycle regulators *J Neurochem*, 92, 585-96.
142. **Uittenbogaard M., Martinka D. L. y Chiaramello A. (2003)** The basic helix-loop-helix differentiation factor Nex1/MATH-2 functions as a key activator of the GAP-43 gene *J Neurochem*, 84, 678-88.
143. **Ultsch M. H., Wiesmann C., Simmons L. C., Henrich J., Yang M., Reilly D., Bass S. H. y de Vos A. M. (1999)** Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC *J Mol Biol*, 290, 149-59.
144. **Ullian E. M., Sapperstein S. K., Christopherson K. S. y Barres B. A. (2001)** Control of synapse number by glia *Science*, 291, 657-61.
145. **Vaillant A. R., Mazzoni I., Tudan C., Boudreau M., Kaplan D. R. y Miller F. D. (1999)** Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival *J Cell Biol*, 146, 955-66.
146. **Veit M., Becher A. y Ahnert-Hilger G. (2000)** Synaptobrevin 2 is palmitoylated in synaptic vesicles prepared from adult, but not from embryonic brain *Mol Cell Neurosci*, 15, 408-16.
147. **Velasco A., Tabernero A. y Medina J. M. (2003)** Role of oleic acid as a neurotrophic factor is supported in vivo by the expression of GAP-43 subsequent to the activation of SREBP-1 and the up-regulation of stearyl-CoA desaturase during postnatal development of the brain *Brain Res*, 977, 103-11.
148. **Vernadakis A. (1988)** Neuron-glia interrelations *Int. Rev. Neurobiol.*, 30, 149-224.
149. **Vicario-Abejon C., Johe K. K., Hazel T. G., Collazo D. y McKay R. D. (1995)** Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons *Neuron*, 15, 105-14.
150. **Vicario C., Tabernero A. y Medina J. M. (1993)** Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture *Pediatr. Res.*, 34, 709-715.
151. **Walker T. L., Yasuda T., Adams D. J. y Bartlett P. F. (2007)** The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells *J Neurosci*, 27, 3734-42.
152. **Walsh C. y Cepko C. L. (1992)** Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex *Science*, 255, 373.
153. **Wang C. T., Lu J. C., Bai J., Chang P. Y., Martin T. F., Chapman E. R. y Jackson M. B. (2003)** Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion *Nature*, 424, 943-7.
154. **Wiche G., Oberkanins C. y Himmler A. (1991)** Molecular structure and function of microtubule-associated proteins *Int Rev Cytol*, 124, 217-73.
155. **Woolf N. J. (1998)** A structural basis for memory storage in mammals *Prog Neurobiol*, 55, 59-77.
156. **Yuste R., Gutnick M. J., Saar D., Delaney K. R. y Tank D. W. (1994)** Ca²⁺ accumulations in dendrites of neocortical pyramidal neurons: an apical band and evidence for two functional compartments *Neuron*, 13, 23-43.

Portada: Inmunocitoquímica de PSD-95 visualizada con Alexa-488 y de sinaptotagmina I visualizada con Cy3, en cultivo primario de neuronas a las 72h

Contraportada: Inmunocitoquímica de DCX visualizada con Alexa-488, en cultivo primario de neuronas a las 24h