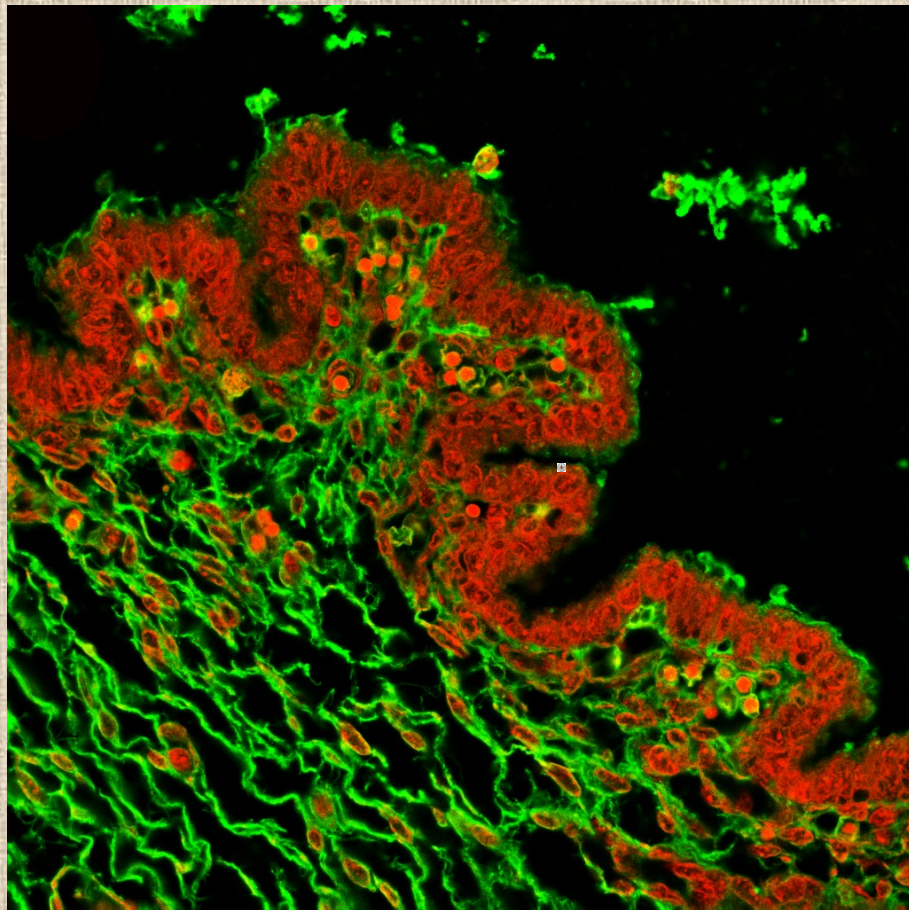
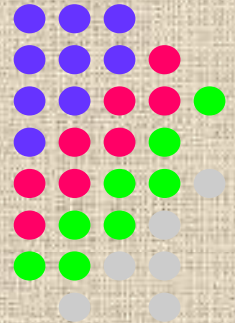


**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



Departamento de Anatomía y Radiología  
Área de Anatomía y Embriología Humana



**TESIS DOCTORAL**

**PAPEL DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS DEL FLUIDO  
CEREBROESPINAL EMBRIONARIO COMO FACTORES  
REGULADORES DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR.**

**Raquel Carretero Soto**  
**Valladolid, 2012**



---

# **Universidad de Valladolid**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Anatomía y Radiología.  
Área de Anatomía y Embriología Humana.

**TESIS DOCTORAL:**

**PAPEL DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS DEL FLUIDO  
CEREBROESPINAL EMBRIONARIO COMO FACTORES  
REGULADORES DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR.**

Presentada por Raquel Carretero Soto para  
optar al grado de doctora por la Universidad de Valladolid.

Dirigida por:

Prof. Dr. D. Ángel Gato Casado





**Universidad de Valladolid**

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

(Art. 21 del R.D. 1393/2007 de 29 de octubre y Art. 4 c) de la Normativa para la defensa de la Tesis Doctoral)

D. Ángel Gato Casado, con D.N.I. nº 9256858-W profesor del departamento de Anatomía y Radiología como Director de la Tesis Doctoral titulada “PAPEL DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS DEL FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO COMO FACTORES REGULADORES DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR” presentada por D<sup>a</sup>. Raquel Carretero Soto alumno del programa Neurología Básica y Clínica impartido por el departamento de Anatomía y Radiología autoriza la presentación de la misma, considerando que el trabajo de investigación presentado por la doctoranda reúne los requisitos de originalidad y rigor científico, y que la doctoranda ha mostrado en todo momento un gran espíritu de trabajo y dedicación.

Valladolid, 12 de Septiembre de 2012

El Director de la Tesis,

Fdo. Ángel Gato Casado

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



*A mi familia, por su confianza infinita*

*A Jorge por su apoyo incondicional*

*A todos aquellos que me abrieron los ojos para que pudiera encontrar  
mi camino*



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, con su ayuda y apoyo han contribuido a la realización de la presente Tesis Doctoral, tanto en el laboratorio como fuera de él.

A Ángel Gato Casado por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias también por tu excelente dirección, tu dedicación constante y sobre todo por tu confianza, sin esto último, este trabajo no hubiera sido posible. Lo que menos me imaginé cuando entre por la puerta del departamento de Anatomía y Radiología, es que se realizaban trabajos tan increíbles, quien me iba a decir a mí que se investigaba sobre el fluido cerebroespinal embrionario y sus posibles efectos en la formación de cerebro? Yo pensaba que se dedicaban al estudio de los huesos, músculos,... Tengo que añadir que cuando Ángel me dijo el título del proyecto y sobre que iba a hacer mi tesis, los ojos se me abrieron como platos, vaya título..., cuando lo dije en casa, mis padres se quedaron perplejos. A pesar de todo me encantó y todavía más la investigación que hemos llevado a cabo. Ha sido una experiencia maravillosa, pero no solo a nivel profesional, sino también a nivel personal.

A Aníbal de la Mano Bonín por aguantar todas mis preguntas; a Jose Antonio Moro por estar ahí siempre que lo he necesitado, incluso cuando tenía mil cosas que hacer, gracias por enseñarme tantas cosas.

A mi ex compi de despacho, Estela, las horas que hemos echado, muchas gracias por estar ahí cuando lo he necesitado.

Maribel, gracias por tu entusiasmo y apoyo incondicional, tu positivismo, sin ti esto tampoco hubiera sido posible.

Pilar, gracias por enseñarme tanto y tan bien, Isabelita, hemos pasado ratos muy buenos, gracias por tu alegría y tus risas.

A Sagrario, cuantas horas de confocal hemos pasado.

Juani, creo que eres una de las personas que más cariño has cogido a mis ratoncitos, gracias por las parrafadas que nos echábamos por las mañanas, las risas y tu preocupación por mis cosas.

Laura, a pesar de que ya no estés, muchas gracias por todos los momentos buenos que me has hecho pasar, por ayudarme a evadirme en los momentos de más agobio, por compartir conmigo tu experiencia, me alegro mucho de haberte conocido.



Al resto de los miembros del departamento, mil gracias, porque sin vosotros nada de esto hubiera sido posible, gracias por vuestra buena disposición cuando han surgido dudas y por los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio.

A mis padres por su apoyo y por la confianza que siempre han demostrado en mí, porque me han apoyado siempre en todo, por enseñarme a luchar por lo que yo quería. En estos años han sido un apoyo muy grande y porque me han hecho ver lo orgullosos que se sienten de mí por haber conseguido lo que siempre, desde que tenía 10 añitos, he querido; ser bióloga y dedicarme a la investigación. Mil gracias, os quiero un montón.

Y por supuesto a ti, Jorge, gracias por escucharme siempre que lo he necesitado y por estar ahí en todo momento. Gracias por tu interés, por intentar entender lo que estaba haciendo, por interesarte en todo mi trabajo a pesar de que la mitad de las cosas te sonaran a chino.

Gracias a todos los que en alguna ocasión han mostrado interés en saber lo que hacía aunque, seamos sinceros, nunca lo habéis entendido (pero me hacía ilusión, que conste).

*Hay personas que saben  
moverse por el mundo,  
que reconocen la importancia  
de los pequeños detalles,  
que saben,  
que encontrar la perfección,  
es una cuestión de sentimientos,  
que por instinto distinguen,  
si algo es pasajero o para siempre  
y saben encontrar ese detalle,  
que les hace sentirse bien.*



## **RESUMEN**

El Fluido Cerebroespinal Embrionario (CSF-E) desempeña un papel clave en la regulación del comportamiento neuroepitelial de las células precursoras y durante el desarrollo temprano del cerebro, suministrando señales biológicas de activación de la replicación de los precursores neuroepiteliales y de la neurogénesis, e induce específicamente la supervivencia de las células neuroepiteliales. El CSF-E es un líquido complejo que incluye, entre otros componentes proteicos, varios tipos de apolipoproteínas. En roedores se encuentran, Apo B, Apo AI, Apo AIV, Apo E y Apo M. Hemos estudiado el patrón de expresión de las apolipoproteínas arriba mencionadas, detectando su presencia en la cavidad cerebral y en el neuroepitelio de embriones de ratón de estadios tempranos del desarrollo. La presencia de estas apolipoproteínas en las células neuroepiteliales, con patrones de expresión regulados temporal y espacialmente, sugieren la existencia de mecanismos específicos de control y un proceso de síntesis y secreción apical por parte de las células neuroepiteliales. Al ser Apo B 48/100 la apolipoproteína mayoritaria nos hemos centrado en su estudio y, mediante el uso de un sistema de cultivo organotípico para neuroepitelio, se muestra que el inmunobloqueo de Apo B 48/100 en el CSF-E de ratón induce un exceso de células apoptóticas en el neuroepitelio. Estos datos se confirmaron con el estudio del neuroepitelio de embriones de ratones knock-out para Apo B-100, que también mostraron un aumento significativo de células apoptóticas en el neuroepitelio cerebral en comparación con los wildtype. Nuestros resultados sugieren una implicación directa del CSF-E-Apo B en la supervivencia de los progenitores neuroepiteliales posiblemente a través de la regulación del estrés oxidativo. Estos datos podrían ser relevantes, no solo como un mecanismo fisiológico de control del comportamiento de los precursores neuroepiteliales sino también como base para futuras estrategias de control de procesos neurodegenerativos.

## **DESCRIPTORES**

Apolipoproteínas.

Apoptosis.

Fluido Cerebroespinal Embrionario.

Neurogénesis.

Proliferación celular.



## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS. ....	III
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	IV
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	V
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. DESARROLLO TEMPRANO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....</b>	<b>1</b>
1.1. FORMACIÓN DEL TUBO NEURAL: NEURULACIÓN.....	2
1.2. DIFERENCIACIÓN DEL TUBO NEURAL.....	3
1.3. VESICULACIÓN DEL TUBO NERVIOSO.....	4
1.4. ESTRUCTURA DEL TEJIDO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	6
1.4.1. <i>NEUROEPITELIO</i> .....	6
1.4.2. <i>MECANISMOS DE CONTROL: FACTORES MITOGÉNICOS Y NEUROGÉNICOS</i> .....	9
<b>2. FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO.....</b>	<b>12</b>
2.1. INFLUENCIA EN EL DESARROLLO CEREBRAL TEMPRANO.....	12
2.1.1. <i>INFLUENCIA DEL CSF-E EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS NEUROEPITELIALES</i> .....	12
2.1.2. <i>INFLUENCIA DEL CSF-E EN EL CRECIMIENTO Y EXPANSIÓN DEL CEREBRO EMBRIONARIO</i> .....	14
2.2. COMPOSICIÓN DEL CSF-E.....	18
<b>3. APOLIPOPROTEÍNAS.....</b>	<b>23</b>
3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA DE LAS LIPOCALINAS.....	23
3.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS. ESTRUCTURA.....	25
3.3. PAPEL BIOLÓGICO DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	31
3.3.1. <i>PAPEL NEUROPROTECTOR</i> .....	31
3.3.2. <i>PAPEL EN EL DESARROLLO DEL CEREBRO EMBRIONARIO</i> .....	32
<b>4. ESTRÉS OXIDATIVO.....</b>	<b>34</b>
4.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	36
4.2. APOLIPOPROTEÍNAS Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	38
<b>5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>40</b>
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>40</b>

<b>7. PANTEAMIENTO/OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
7.1. OBJETIVO GENERAL.....	40
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>2. OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>3. GENOTIPADO DE RATONES. ....</b>	<b>49</b>
3.1. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO.....	49
3.2. ANÁLISIS DE ALELOS MUTANTES MEDIANTE PCR USANDO CEBADORES ESPECÍFICOS.....	50
3.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	52
<b>4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO (CSF-E) DE RATÓN. ....</b>	<b>53</b>
<b>5. FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>6. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO CON MICROSCOPIA ÓPTICA.....</b>	<b>55</b>
<b>7. ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) Y WESTERN-BLOT.....</b>	<b>57</b>
7.1. PREPARACIÓN DEL GEL.....	57
7.2. ELECTROFORESIS.....	59
7.3. TINCIÓN DE PLATA.....	60
7.4. TRANSFERENCIA.....	61
7.5. WESTERN-BLOT.....	61
<b>8. TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN/ INMUNOHISTOQUÍMICA. ....</b>	<b>62</b>
8.1. INMUNOFLUORESCENCIA.....	62
8.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR: BRDU, PCNA Y $\beta$ -III-TUBULINA. ....	65
8.3. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR: T.U.N.E.L. ....	67
<b>9. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEUROEPITELIO.....</b>	<b>68</b>

### **RESULTADOS**

---

<b>1. ELECTROFORESIS Y TINCIÓN DE PLATA.....</b>	<b>73</b>
<b>2. WESTERN-BLOT.....</b>	<b>74</b>
2.1. APOLIPOPROTEÍNA B 48/100 .....	76
2.2. APOLIPOPROTEÍNA AI .....	77
2.3. APOLIPOPROTEÍNA AIV.....	78

2.4.	APOLIPOPROTEÍNA E. ....	79
2.5.	APOLIPOPROTEÍNA M. ....	80
<b>3.</b>	<b>PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES APOLIPOPROTEÍNAS EN EMBRIONES DE RATÓN. ....</b>	<b>82</b>
3.1.	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO B 48/100. ....	83
3.1.1.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 9.5 DÍAS p.c.</i> .....	83
3.1.2.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 10.5 DÍAS p.c.</i> .....	85
3.1.3.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.</i> .....	87
3.1.4.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.</i> .....	89
3.1.5.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.</i> .....	91
3.2.	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO AI. ....	94
3.2.1.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 9.5 DÍAS p.c.</i> .....	94
3.2.2.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 10.5 DÍAS p.c.</i> .....	96
3.2.3.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.</i> .....	97
3.2.4.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.</i> .....	99
3.2.5.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.</i> .....	100
3.3.	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO A IV. ....	102
3.3.1.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.</i> .....	102
3.3.2.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.</i> .....	104
3.3.3.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.</i> .....	105
3.4.	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO E. ....	107
3.4.1.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 9.5 DÍAS p.c.</i> .....	107
3.4.2.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 10.5 DÍAS p.c.</i> .....	107
3.4.3.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.</i> .....	108
3.4.4.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.</i> .....	109
3.4.5.	<i>EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.</i> .....	110
3.5.	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO M. ....	112
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTOS DE INMUNOBLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE APO B 48/100 EN EL CSF-E DE RATÓN. ....</b>	<b>113</b>
4.1.	ESTUDIO DEL ÍNDICE DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA. ....	113
4.2.	ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR: CONTEO DE MITOSIS. ....	116
4.3.	ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR. ....	118
<b>5.</b>	<b>ESTUDIO DEL NEUROEPITELIO DE EMBRIONES DE RATÓN K.O APO B<sup>TM1UNC</sup>/J. ....</b>	<b>120</b>
5.1.	ESTUDIO DEL ÍNDICE DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL NEUROEPITELIO CEREBRAL EMBRIONARIO. ....	120



5.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL NEUROEPITELIO CEREBRAL EMBRIONARIO.....	122
5.3. ESTUDIO DEL ÍNDICE DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN EL NEUROEPITELIO CEREBRAL EMBRIONARIO.....	124

### DISCUSIÓN

---

1. EL CSF-E DE RATÓN CONTIENE UN PATRÓN COMPLEJO DE APOLIPOPROTEÍNAS.....	129
2. LOS PRECURSORES NEUROEPITELIALES DEL CEREBRO EMBRIONARIO EXPRESAN LAS APOLIPOPROTEÍNAS PRESENTES EN EL CSF-E. ....	130
3. EL CSF-E REGULA DE FORMA DIFERENCIAL EL COMPORTAMIENTO DE LOS PRECURSORES NEUROEPITELIALES. ....	132
4. EL ESTRÉS OXIDATIVO ES UN POSIBLE MECANISMO DE ACTUACIÓN EN LA INHIBICIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA POR PARTE DE APO B.....	134
CONCLUSIONES.....	137
BIBLIOGRAFÍA.....	141

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

Fig. 1. Principales derivados de la capa germinativa ectodérmica..... 1

Fig.2. Formación del tubo neural (Neurulación primaria)..... 3

Fig.3. Sección Sagital Medial de un embrión de pollo de 24 HH. .... 4

Fig.4. Diagrama de las vesículas cerebrales y algunos de sus derivados en el adulto..... 5

Fig.5. Desarrollo temprano del cerebro de vertebrados..... 6

Fig.6. Sección del tubo neural, que muestra la posición del núcleo en una célula neuroepitelial en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentre. .... 7

Fig.7. Sección del tubo neural y posición del núcleo celular en función de la fase del ciclo celular. .... 8

Fig.8. Proceso de replicación y diferenciación de las dos poblaciones de células madre dependientes de la acción del FGF2 y EGF. .... 9

Fig.9. Influencia del CSF-E en la neurogénesis vía ácido retinoico. .... 11

Fig.10. Interdependencia de las interacciones de la presión hidrostática creada por el CSF y los factores de crecimiento sobre el comportamiento del neuroepitelio..... 16

Fig.11. Material precipitado en el interior de la cavidad de embriones de pollo de estadio 23 HH y de estructuras de apariencia vesicular en las células neuroepiteliales..... 17

Fig.12. Análisis proteómico del CSF-E de pollo. .... 19

Fig.13. Análisis proteómico del CSF-E de rata..... 20

Fig.14. Poblaciones de partículas presentes en el CSF-E..... 22

Fig.15. Representación esquemática de la vista actual en la membrana apical de las células neuroepiteliales y su modificación durante el proceso de diferenciación celular. .... 21

Fig.16. Estructura terciaria de las lipocalinas. .... 23

Fig.17. Análisis de Apo AI. .... 26

Fig.18. Representación esquemática de Apo E humana..... 27

Fig.19. Representación de la edición del RNAm de Apo B que origina las dos isoformas, Apo B-48 y Apo B-100. .... 27

Fig.20. Diagrama en el que se muestra la estructura de una lipoproteína. .... 28

Fig.21. Composición de los diferentes tipos de lipoproteínas. .... 29

Fig.22. Efectos neurológicos diferenciales entre Apo E3 y Apo E4..... 32

Fig.23. Formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). .... 34

Fig.24. Daño oxidativo producido en las células por los radicales libres.....	35
Fig.25. Ciclo reproductivo del ratón. ....	45
Fig.26. Obtención de la cepa K.O para el gen de Apo B-100. ....	46
Fig.27. Hembras preñadas de 11.5 días. ....	47
Fig.28. Engrosamiento Uterino.....	49
Fig.29. Embrión 11,5 días p.c.....	49
Fig.30. Marcador y gel cargado con DNA de ratón adulto. ....	52
Fig.31. Micromanipulador.....	53
Fig.32. Microinyector.....	53
Fig.33. Extracción de CSF-E de rombencéfalo de embriones de ratón de 11,5 días.....	53
Fig.34. Orientación Transversal del embrión en el bloque de parafina. ....	55
Fig.35. Gel separador y gel apelmazador. ....	59
Fig.36. Montaje de la cubeta de electroforesis y cargado de muestras.....	60
Fig.37. Esquema del sandwich y de la cubeta de transferencia. ....	61
Fig.38. Esquema de inmunofluorescencia indirecta. ....	63
Fig.39. Esquema de inmucitoquímica para BrdU.....	66
Fig.40. Comparativa del CSF-E de ratón, rata y pollo respectivamente.....	73
Fig.41. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo B.....	76
Fig.42. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo AI.....	77
Fig.43. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo A VI.....	78
Fig.44. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo E.....	79
Fig.45. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo M. ....	80
Fig.46. Presencia de las diferentes apolipoproteínas del estudio en el CSF-E de ratón.....	81
Fig.47. Secciones de embriones de ratón de 11, 5 días de desarrollo, hematoxilina-eosina. ....	82
Fig.48. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 9.5 d de desarrollo. ....	84
Fig.49. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 10.5 d de desarrollo. ....	86
Fig.50. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 11.5d de desarrollo. ....	88
Fig.51. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 12.5d de desarrollo. ....	90
Fig.52. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 13.5d de desarrollo. ....	92

Fig.53. Patrón de expresión de Apo AI en embriones de 9.5d de desarrollo.....	95
Fig.54. Patrón de expresión de Apo AI en embriones de 10.5d de desarrollo.....	96
Fig.55. Patrón de expresión de Apo AI en embriones de 11.5d de desarrollo.....	98
Fig.56. Patrón de expresión de Apo AI en embriones de 12.5d de desarrollo.....	99
Fig.57. Patrón de expresión de Apo AI en embriones de 13.5d de desarrollo.....	100
Fig.58. Patrón de expresión de Apo A IV en embriones de 11.5d de desarrollo. ....	103
Fig.59. Patrón de expresión de Apo A IV en embriones de 12.5d de desarrollo. ....	104
Fig.60. Patrón de expresión de Apo A IV en embriones de 13.5d de desarrollo. ....	105
Fig.61. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 9.5d de desarrollo.....	107
Fig.62. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 10.5d de desarrollo.....	107
Fig.63. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 11.5d de desarrollo.....	108
Fig.64. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 12.5d de desarrollo.....	109
Fig.65. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 13.5d de desarrollo.....	110
Fig.66. Patrón de expresión de Apo M en embriones de ratón.....	112

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición del líquido de Hank.....	48
Tabla 2. Composición del tampón de lisis.....	50
Tabla 3. Pasos y parámetros para la PCR.....	51
Tabla 4. Composición del gel separador.....	58
Tabla 5. Composición del gel apelmazador. ....	59
Tabla 6. Composición de los productos utilizados en la tinción de plata.....	60
Tabla 7. Anticuerpos utilizados en el WB.....	62
Tabla 8. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia. ....	63
Tabla 9. Anova de las diferencias en el índice de muerte celular. ....	115
Tabla 10. Anova de las diferencias en el índice de proliferación celular. ....	117
Tabla 11. Anova de las diferencias en el índice de diferenciación neuronal. ....	119
Tabla 12. Resultados de la cuantificación de células en apoptosis en la pared lateral del mesencéfalo en embriones KO en estadio 10,5 d.....	122

Tabla 13. Resultados de la cuantificación de células neuroepiteliales en replicación en la pared lateral del mesencéfalo en embriones KO heterocigotos en estadio 10.5d..... 123

Tabla 14. Resultados de la cuantificación de células neuroepiteliales en diferenciación en la pared lateral del mesencéfalo en embriones wildtype y KO heterocigotos en estadio 10.5d..... 125

### ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico 1. Índice de Muerte Celular Programada en Cultivos de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11,5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales..... 114

Gráfico 2. Índice de Replicación Celular en Cultivos de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11,5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales. .... 117

Gráfico 3. Índice de Diferenciación Celular en Cultivos de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11,5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales. .... 119

Gráfico 4. Índice de Muerte Celular programada en la pared mesencefálica de embriones de ratón wildtype y KO de 10,5 días de desarrollo..... 121

Gráfico 5. Índice de Replicación Celular de las células neuroepiteliales en la pared mesencefálica de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10,5 días de desarrollo. .... 123

Gráfico 6. Índice de Diferenciación Neuronal en la pared mesencefálica de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10,5 días de desarrollo. .... 125

### ÍNDICE DE IMÁGENES.

Imagen 1. Análisis del Índice de Muerte Celular Programada en Cultivos de Neuroepitelio..... 114

Imagen 2. Análisis de la replicación celular en Cultivos de Neuroepitelio. .... 116

Imagen 3. Análisis del Índice de Diferenciación Neuronal en Cultivos de Neuroepitelio..... 118

Imagen 4. Células apoptóticas en la pared lateral del mesencéfalo de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10.5 días. .... 121

Imagen 5. Células neuroepiteliales en replicación en la pared lateral del mesencéfalo de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10.5 días. .... 123

Imagen 6. Células neuroepiteliales en diferenciación en la pared lateral del mesencéfalo de embriones de ratón wildtype (A) y KO heterocigotos (B) de 10.5 días. .... 124

**ABREVIATURAS.**

<i>ABREVIATURA</i>	<i>SIGNIFICADO</i>
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
Apo	Apolipoproteína
AQP1	Acaporina 1
AQP4	Acuaporina 4
ATPasa	Enzima Adenosín Trifosfato
BDA	Botín-Dextrano-Amina
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Suero bovino fetal
Ca <sup>+2</sup>	Ión Calcio
CSF	Fluido Cerebroespinal
CSF-E	Fluido Cerebroespinal Embrionario
DAB	Diaminobencidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dUTP	Deoxy-Uridina trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
FAKs	Fosfo Adenosín Kinasas
FGFs	Factores de Crecimiento Fibroblástico
FGF-2	Factor de Crecimiento Fibroblástico 2

FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HH	Hamburger & Hamilton Stages
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IGF-1	Insulin Growth Factor
IgG	Inmunoglobulina G
IMCP	Índice de Muerte Celular Programada
Iso	Istmo
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
KDa	Kilo Dalton
Kir 4.1	Inwardly Rectifying Potassium Channel
K.O	Knock Out
L- CAT	Lecitina-Colesterol Acetiltransferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LIMR	Lipocalin-Interacting-Membrane Receptor
LOAD	Late Onset Alzheimer Disease
LPL	Lipoproteína lipasa
Min	Minuto
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (reducida)
NO	Óxido Nítrico
o.n	Over Night

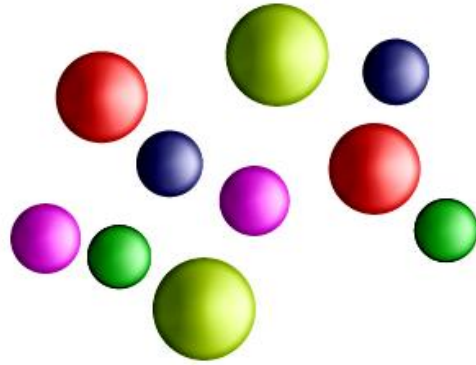
ONOO·	Peroxinitrito
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Buffer Fosfato Salino
p.c	Post-coitum
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
P.M	Peso Molecular
RA	Ácido Retinoico
RADH <sub>3</sub>	Retinol Deshidrogenasa
RBP	Proteína de Internalización del Retinol
REDOX	Oxidación-Reducción
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucleico Mensajero
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
r.p.m	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sec	segundo
SHH	Sonic Hedgehog
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
TBE	Tris-Borato EDTA



TdT	Transferasa Deoxinucleotil Terminal
TEMED	Tetrametiletiléndiamina.
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TPBS	Tris-Buffer Fosfato Salino
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling
UTP	Uridina Trifosfato
QM	Quilomicrones
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WB	Western-blot
wnt	Gen de la familia de proteínas wingless

En la redacción de esta memoria se han empleado diversos anglicismos y palabras en inglés. Hemos considerado oportuno su uso debido a que en el lenguaje científico no son imprescindibles las traducciones literales, sino la comprensión del significado del término, sea cual fuere su idioma.

# INTRODUCCIÓN



*“Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

*Albert Einstein.*



## 1. DESARROLLO TEMPRANO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

El origen ontogénico de la estructura más compleja e importante de nuestro organismo tiene lugar en las fases más tempranas del desarrollo, cuando la notocorda induce un engrosamiento de la parte central del ectodermo que se conoce como **placa neural**. Seguidamente esta estructura va a sufrir una compleja serie de transformaciones que se conocen en su conjunto como **neurulación** y que conducen a la formación del **tubo neural**, del que derivan el encéfalo y la médula espinal.

Por lo tanto en términos generales podemos decir que el SNC es uno de los principales **derivados ectodérmicos**. A continuación se muestra un esquema de los principales derivados de la capa germinativa ectodérmica.

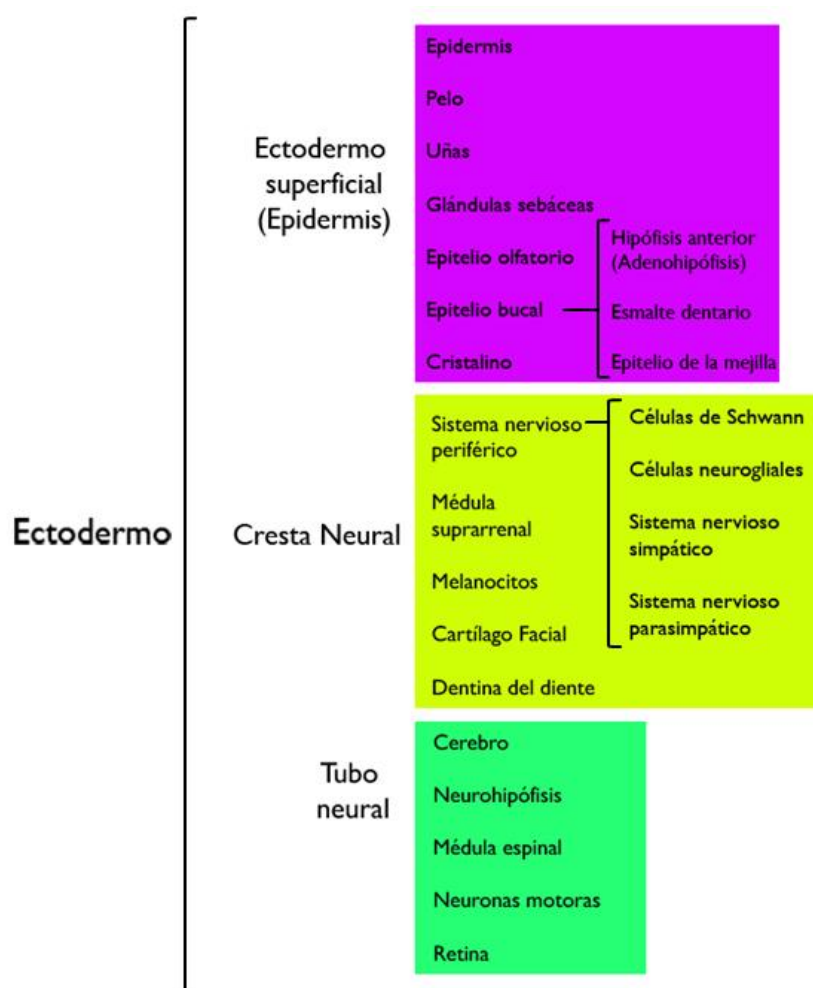


Fig. 1. Principales derivados de la capa germinativa ectodérmica.

## 1.1. FORMACIÓN DEL TUBO NEURAL: NEURULACIÓN.

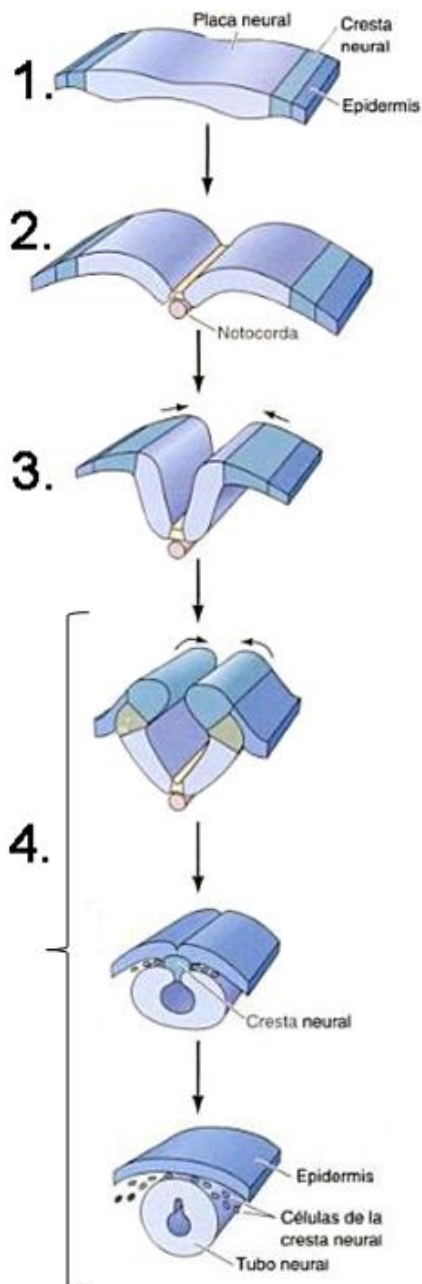
Desde el punto de vista morfológico el proceso de **neurulación** consiste en la transición desde una estructura plana, o bidimensional como es la placa neural, a una estructura tubular tridimensional cuya morfología se va complicando progresivamente. Todo ello en base a una compleja combinación de movimientos morfogenéticos de una hoja epitelial pseudoestratificada formada por una única capa de células conocida como **neuroepitelio** y que rodea a una gran cavidad repleta de lo que conocemos como **Fluido Cerebroespinal Embrionario** (CSF-E).

Dentro de la neurulación distinguimos dos procesos bien diferenciados:

- ▶ **neurulación primaria**, afecta a la mayor parte del SNC en especies superiores y reproduce el esquema comentado de transición de placa neural a tubo neural por plegamiento e invaginación.
- ▶ **neurulación secundaria**, afecta a la parte posterior del SNC y se produce por la condensación de células mesenquimáticas que forman un cordón sólido que posteriormente se cavita. En mamíferos, la neurulación secundaria afecta al extremo posterior de la médula espinal (Schoenwolf y Desmond, 1984 a, b; Nievelstein et al., 1993).

El proceso de neurulación primaria es similar en anfibios, aves y mamíferos (Gallera, 1971). En el ratón, alrededor de los 8.5 días de desarrollo, los bordes del extremo anterior de la placa neural aumentan de grosor y se elevan, para formar los denominados pliegues neurales, apareciendo como consecuencia un surco con forma de U en el centro de la placa, denominado surco neural. Los pliegues neurales se aproximan hacia la línea media del embrión estableciendo puntos de contacto o fusión, según un patrón previamente establecido, que varía con cada especie y determina la localización de los defectos de cierre más frecuentes. La fusión de los márgenes de los pliegues neurales implica también la fusión del ectodermo de superficie, finalizando el proceso con la independización de ambas estructuras de forma que el ectodermo de superficie recupera su integridad y el neuroepitelio se transforma en un tubo internalizado en el mesénquima embrionario (Golden y Chernoff, 1993; Van Allen et al., 1993).

La neurulación primaria, por lo tanto, puede dividirse en cuatro estadios diferentes pero solapados de manera espacial y temporal (Smith y Schoenwolf, 1997; Colas y Schoenwolf, 2001), como se representa en la figura 2:



1. **Formación de la placa neural**, es una placa alargada y engrosada del ectodermo, ubicada en la línea media de la superficie dorsal.
2. **Elevación** de los bordes de la placa neural que da origen al **pliegue neural**.
3. **Plegamiento** de los pliegues neurales para formar el **surco neural** y las **crestas neurales**.
4. **Aproximación, contacto y fusión** de los pliegues neurales que progresa en sentido craneal y caudal hasta formar los neuroporos anterior y posterior con cuyo cierre concluye la neurulación primaria.

Fig.2. Formación del tubo neural (Neurulación primaria). Dibujos según Smith y Schoenwolf, 1997. Imagen tomada y modificada de Gilbert, 2005.

## 1.2. DIFERENCIACIÓN DEL TUBO NEURAL.

A partir de la conclusión de la neurulación, en una estructura relativamente simple como es el tubo neural, se desarrollan una serie de mecanismos complejos, que tienden a establecer identidades regionales que marcan de una forma u otra las distintas porciones del encéfalo.

De una forma esquemática podemos decir que la diferenciación y regionalización del tubo neural se produce simultáneamente de tres modos diferentes. A **nivel morfológico**, el tubo neural y su cavidad presentan zonas que sobresalen y se estrechan formando las tres

partes básicas del cerebro, a **nivel tisular** las poblaciones celulares dentro de la pared del tubo neural se reorganizan para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y la médula espinal, por último a **nivel celular**, las células neuroepiteliales se diferencian en diversos tipos de células nerviosas (neuronas) y de sostén (glía). Estos procesos implican la simultánea e interdependiente acción de diversos mecanismos de desarrollo, incluyendo el establecimiento de los patrones de posición, la morfogénesis e histogénesis. Estos mecanismos están regulados por factores de transcripción así como por moléculas difusibles, como factores de crecimiento y morfógenos, entre los que destacan especialmente el papel de los genes Hox asociados a los procesos de segmentación (Wolpert et al., 2010; Gilbert, 2005).

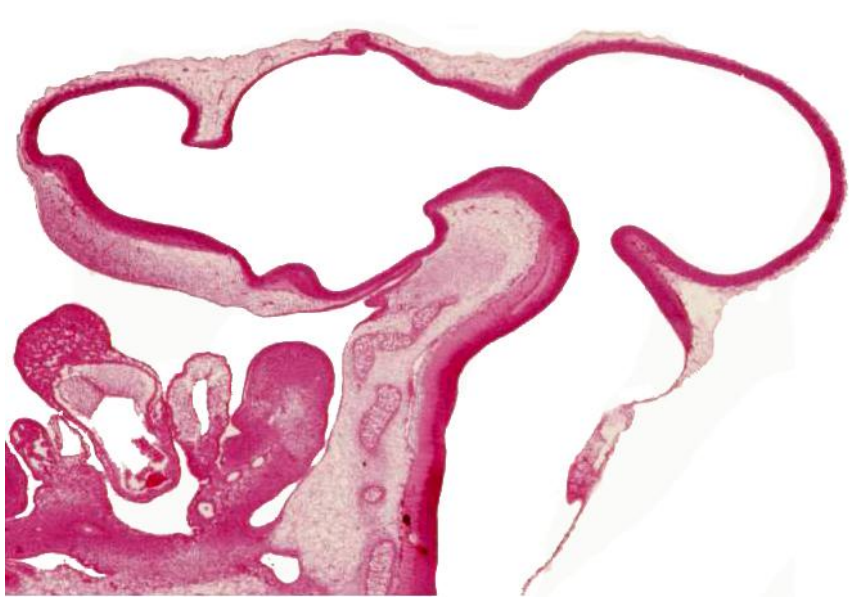


Fig. 3. Sección Sagital Medial de un embrión de pollo de 23 HH.

### 1.3. VESICULACIÓN DEL TUBO NERVIOSO.

Uno de los procesos más llamativos que tiene lugar en el esbozo del cerebro embrionario es el proceso de regionalización morfológica conocido como **vesiculación cerebral**, de forma que el tubo neural adquiere una morfología vesicular conformando las distintas partes del encéfalo adulto, cerebro anterior o **prosencefalo**, cerebro medio o **mesencefalo** y cerebro posterior o **rombencefalo**, y encierra una gran cavidad interna que contiene el líquido cefalorraquídeo embrionario o fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E).

A medida que el desarrollo continúa, estas tres vesículas primarias pro, mesen y rombencefalo evolucionan hacia las denominadas **vesículas secundarias**, de manera que el prosencefalo se subdivide en el **telencefalo** en una posición craneal y el **diencefalo** más caudal. El telencefalo finalmente formará los hemisferios cerebrales y el diencefalo

formará las regiones cerebrales talámica e hipotalámica. El mesencéfalo no se subdivide y su cavidad finalmente se convierte en el acueducto cerebral. El rombencéfalo se subdivide en el metencéfalo en una posición anterior y en el mielencéfalo en una posterior.

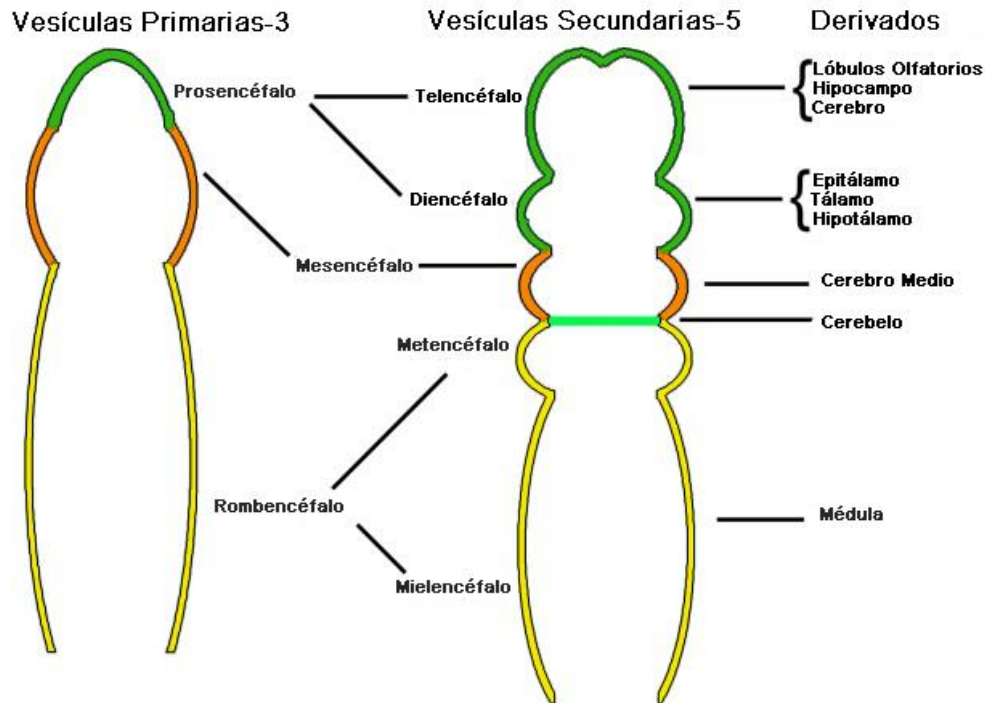


Fig.4. Diagrama de las vesículas cerebrales y algunos de sus derivados en el adulto. Las tres vesículas han sido coloreadas en tres colores diferentes para observar sus derivados. El tubo se diferencia en cinco regiones básicas que formarán todo el cerebro adulto. (Imagen tomada y modificada de Gato y Desmond, 2009).

Simultáneamente a la diferenciación morfológica, el cerebro embrionario sufre un dramático **proceso expansivo** que comienza con el cierre del tubo nervioso (Schoenwolf y Desmond, 1984 a, b). Se ha descrito que en este momento, el incremento en volumen del cerebro embrionario es tan rápido que en embriones de pollo aumenta 30 veces su volumen en 48 horas. Sin embargo este crecimiento no es uniforme, variando entre las diferentes vesículas cerebrales y también en función de la especie, ya que se ha observado que el crecimiento específico de algunas vesículas está relacionado con la especie (por ejemplo mesencéfalo en aves y telencéfalo en mamíferos) (Desmond y O' Rahilly, 1981; De Paz, 1999; Levitan y Desmond, 2009), esto sugiere una regulación filogenética y ontogénica del proceso.

Durante este proceso, el neuroepitelio crece por **proliferación celular**, mientras que los ventrículos se expanden por efecto de la presión hidrostática positiva, creada por el fluido alojado en el interior de las cavidades. El CSF juega un papel importante en la coordinación de ambos mecanismos. (Gato et al., 1993; Alonso et al., 1998, 1999, 2000; Gato et al., 2005; Gato y Desmond, 2009).



A pesar de que la presión del fluido intracavitario cerebral ha sido descrita como la fuerza conductora de la expansión del cerebro embrionario, existe una etapa transitoria en la que se produce la expansión de los ventrículos sin que el neuroporo posterior esté cerrado, lo cual impediría la creación de dicha presión por pérdida de estanqueidad. Investigaciones llevadas a cabo en embriones de pollo han demostrado que este tubo se encuentra cerrado transitoriamente, en una región situada a nivel del corazón. Esta **oclusión transitoria** comienza en el estadio 11 HH y termina en el estadio 14+ HH (Schoenwolf y Desmond, 1986), coincidiendo con la finalización de la neurulación (Desmond y Field, 1992). Experimentos recientes, realizados por Levitan y Desmond (2009), corroboran que el comienzo de la expansión cerebral es directamente dependiente de la oclusión de esta zona. Aunque esta oclusión únicamente ha sido demostrada experimentalmente en pollo, también ha sido descrita desde el punto de vista morfológico en humano, rata, ratón y salamandra (Freeman, 1972; Desmond, 1982; Desmond y Schoenwolf, 1985, 1986; Schoenwolf y Desmond, 1984a, b, 1986; Desmond y Field, 1992). Dicha oclusión requiere de mensajeros secundarios como el  $Ca^{2+}$ , calmodulina, AMPc y n-Cadherinas (Gato y Desmond, 2009; Desmond et al., 1993, Schoenwolf y Desmond, 1984 a; LaConti et al., 2004).

En la siguiente imagen se puede observar el desarrollo temprano del cerebro de vertebrados:

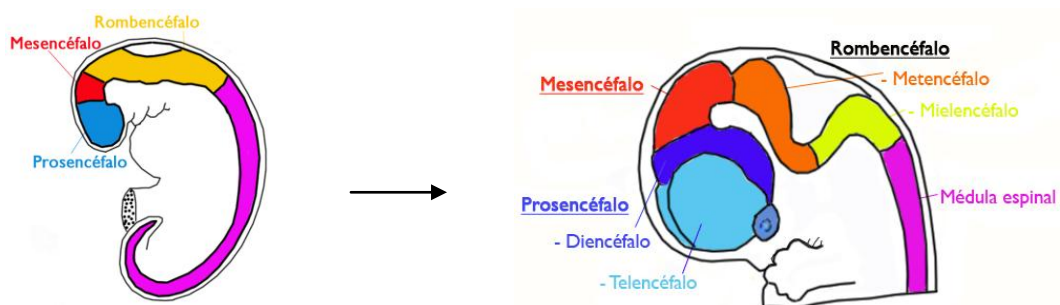


Fig.5. Desarrollo temprano del cerebro de vertebrados. La primera imagen corresponde aproximadamente al estadio de 9 días en ratón y la segunda a un estadio entre 11.5-12 días.

## 1.4. ESTRUCTURA DEL TEJIDO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

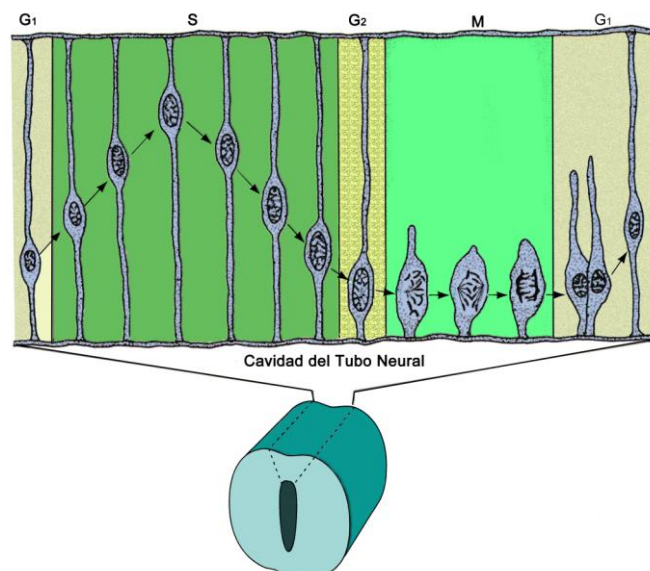
### 1.4.1. NEUROEPITELIO.

A pesar de que la organización histológica y funcional del encéfalo en los vertebrados superiores es un ejemplo de complejidad estructural, en las etapas embrionarias en las que se desarrolla este estudio, la estructura del esbozo del SNC es mucho más simple y como ya hemos comentado se basa en una pared epitelial conocida como neuroepitelio.

Inicialmente el neuroepitelio está formado por precursores neurales conocidos como **células neuroepiteliales**, que cumplen los dos requisitos de células progenitoras o madre, capacidad de **autorrenovación** y **multipotencialidad**, que está restringida a las células del sistema nervioso incluyendo los distintos tipos de neuronas y macroglía. La estructuración histológica de estas células, es la de un epitelio pseudoestratificado en el que, al menos inicialmente, todas las células mantienen contacto tanto con la superficie apical como con la basal.

Un hecho llamativo es que los núcleos de estas células se localizan a diferentes alturas, dando la sensación de ser un epitelio estratificado (Sauer, 1935). Esta apariencia histológica se debe a un proceso migratorio nuclear muy característico que se conoce como **“Migración Nuclear Intercinética”**, que hace que los núcleos de las células se muevan en dirección apical, dentro del citoplasma celular, a medida que entran en las distintas fases del ciclo celular, de manera que durante la Fase S (síntesis de DNA) el núcleo se encuentra en la superficie externa o basal del tubo neural y migra hacia la cavidad a medida que avanza el ciclo celular (ver figura 6). Por lo tanto las mitosis se producen en la superficie apical o luminal del neuroepitelio (Gilbert, 2006).

Este proceso refleja la intensa actividad mitótica de estas células que, valorada mediante la incorporación de BrdU, hace que en tan solo 1 hora prácticamente la mitad de todos los precursores neuronales hayan iniciado un ciclo celular (Gato y Desmond, 2009).



*Fig.6. Sección del tubo neural, que muestra la posición del núcleo en una célula neuroepitelial en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentre.*

Diversos estudios sugieren que, en cada célula precursora, este ciclo mitótico se repite un determinado número de veces hasta que la célula sale del ciclo celular para entrar en un proceso de diferenciación. Según estudios recientes la salida del ciclo mitótico hacia la

diferenciación se debe a un reparto desigual de determinadas proteínas (Notch 1 y Numb) en el citoplasma celular durante la división mitótica (Wolpert et al., 2010).

Como hemos comentado, la totipotencialidad de estos precursores permite su diferenciación tanto en sentido neuronal como glial, no obstante a lo largo de una buena parte del periodo embriogénico, esta diferenciación se orienta exclusivamente en sentido neuronal (Panchision y McKay, 2002).

La diferenciación celular en el tubo neural comienza en la región del mesencéfalo, inmediatamente después de la fusión de los pliegues neurales occipitocervical y prosigue en dirección craneal y caudal a medida que el tubo se cierra.

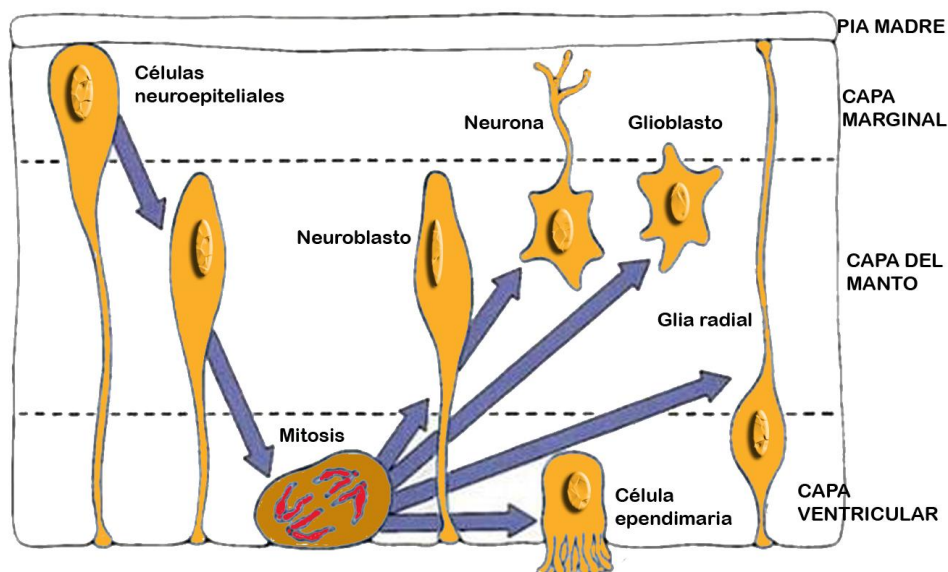


Fig.7. En la imagen se observa como las células neuroepiteliales del tubo neural primitivo se alargan inmediatamente antes de la mitosis. En primer lugar se forman los neuroblastos, que acaban convirtiéndose en las neuronas del sistema nervioso central. A medida que se forman las neuronas, el tubo neural se estratifica en una capa ventricular (adyacente al canal neural), una capa del manto (que contiene los somas neuronales) y una capa marginal (que contiene las fibras nerviosas). Por mitosis y diferenciación se forman los glioblastos, que forman los diversos tipos de células de sostén del sistema nervioso central. (Imagen tomada y modificada de Embriología humana. William J. Larsen. 3ª edición).

Al final del periodo embriogénico la capa neuroepitelial comienza a producir glioblastos, estas células se diferencian en diferentes tipos de **células gliales**, entre ellas **astrocitos** y **oligodendrocitos**. La glía proporciona sostén metabólico y estructural a las neuronas del sistema nervioso central. Por último, la capa neuroepitelial se diferencia in situ para producir **células ependimarias** especializadas que revisten los ventrículos cerebrales y el canal central de la médula espinal. El epitelio que recubre los plexos coroideos es el responsable de la producción del líquido cefalorraquídeo, que ocupa los ventrículos cerebrales, el canal central de la médula espinal y el espacio subaracnoideo que rodea al sistema nervioso central y proporciona una cubierta líquida que protege y sustenta al encéfalo (William, 2003).

### 1.4.2. MECANISMOS DE CONTROL: FACTORES MITOGENÉTICOS Y NEUROGÉNICOS.

El establecimiento de **identidades posicionales** y el **comportamiento celular** depende de la acción combinada y secuencial de distintos factores y morfógenos.

De hecho la **identidad posicional** a lo largo del eje anteroposterior está mediada, al menos en parte, por FGF-8, Wnt y ligandos de la familia del retinoico, mientras que la del eje dorsoventral se sabe que está determinada por las acciones antagonistas del BMP/TGF $\beta$  y el SHH (Panchision y McKay, 2002), incluso se ha relacionado con factores físicos como la presión intracavitaria en el cerebro (Desmond et al., 2005; Martín et al., 2006).

Respecto a los factores que regulan la **replicación** de las células neuroepiteliales en estos estadios, la teoría más aceptada es que existen dos poblaciones de células madre en el neuroepitelio. Una de aparición más temprana, cuyo proceso de replicación depende de la acción del FGF-2 y otra de aparición más tardía, cuyo proceso de replicación depende de la acción del EGF (Tropepe et al., 1999; Martín et al., 2006).

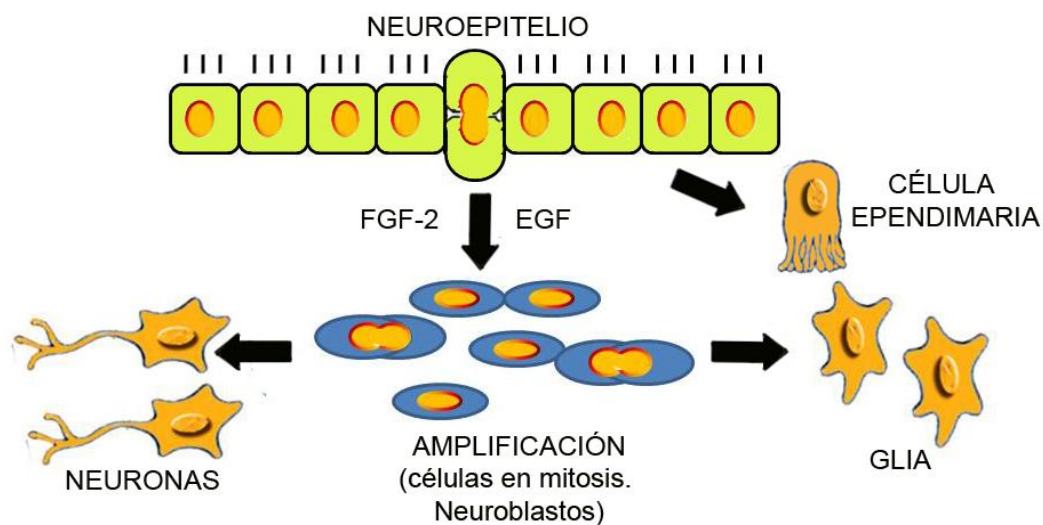


Fig.8. Proceso de replicación y diferenciación de las dos poblaciones de células madre dependientes de la acción del FGF2 y EGF.

Como acabamos de comentar, el FGF-2 es considerado el principal factor mitogénico en los precursores neuroepiteliales en fases tempranas del desarrollo. La familia de los FGFs está compuesta hasta el momento por más de 23 miembros. Son multifuncionales y se ha demostrado su influencia en la migración celular, el neurotrofismo y la diferenciación celular entre otras muchas acciones (Burgess y Maciag, 1989; Galzie et al., 1997; Naski y Ornitz, 1998; Carnicero et al., 2001).

Los FGFs, además de estar implicados en multitud de procesos fisiológicos (neovascularización y reparación de lesiones tisulares), son inductores de procesos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario y fetal. Se sabe que son factores mitogénicos para una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo los epiteliales, mesodérmicas y neuronales (Carnicero et al., 2001). Los FGFs actúan por activación de al menos cuatro tipos de receptores específicos, que en muchos casos son compartidos por varios tipos de FGFs (Martín et al., 2006).

Por otra parte, el FGF-2 ha sido relacionado no sólo con el proceso de replicación de células madre, sino que también se le considera capaz de activar el proceso de neurogénesis cortical durante el desarrollo embrionario (Vaccarino et al., 1999; Raballo et al., 2000), fetal (Dono et al., 1998) y en las regiones cerebrales del adulto que están en contacto directo con el CSF de los ventrículos (Hipocampo y Zona Subventricular), en roedores y humanos (Craig et al., 1996; Weiss et al., 1996; Kuhn et al., 1997; Vaccarino et al., 1999; Raballo et al., 2000; Vescovi et al., 2001; Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Sawamoto et al., 2006).

Existen otras moléculas mitogénicas como el BMP y Hedgehog a las que se les atribuye la capacidad de activar la proliferación celular (Panchision y McKay, 2002).

Respecto a la **neurogénesis**, el ácido retinoico es un potente morfógeno, crucial para el desarrollo del SNC (Moro et al., 1993; McCaffery y Dräger, 2000; Maden, 2002). Es uno de los componentes de señalización temprana en la diferenciación neuronal (Gonçalves et al., 2005; Wang et al., 2005; Jacobs et al., 2006). El análisis proteómico del CSF-E, muestra la presencia de otras moléculas, como la RBP (proteína de internalización del Retinol) y el all-trans-retinol como precursor del ácido retinoico, implicadas en la síntesis de ácido retinoico (Parada et al., 2005b, 2006, 2008b; Parvas et al., 2008; Alonso et al., 2011). En estadios tempranos de embriones de pollo, el ácido retinoico únicamente es sintetizado por el istmo. Nuestro grupo ha demostrado que el CSF-E ayuda al control de la síntesis de ácido retinoico en el istmo por medio del contenido de RBP y all-trans-retinol. La actividad ácido retinoico del CSF-E podría actuar como una vía de señalización para el propio ácido retinoico (Alonso et al., 2011).

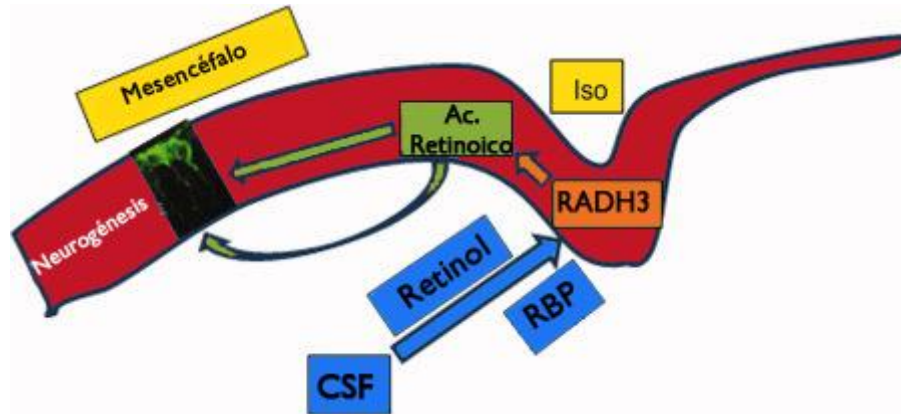


Fig. 9. Mecanismo propuesto de la influencia del CSF-E en la neurogénesis vía ácido retinoico. Se puede observar como el CSF-E contribuye a la síntesis de ácido retinoico. El mesencéfalo dorsal y el istmo (Iso) se encuentran representados en rojo. Para la síntesis del ácido retinoico se requiere la internalización de Retinol, mediada por la RBP, desde el CSF-E a las células del istmo las cuales expresan RADH<sub>3</sub>. El RA difunde desde el neuroepitelio o CSF-E a las células diana para inducir la neurogénesis (células verdes). (Imagen tomada y modificada de Alonso et al., 2011).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren la acción sinérgica del FGF-2 y el ácido retinoico en la neurogénesis primaria inducida por el CSF-E en las células madre neuroepiteliales mesencefálicas (Alonso et al., 2011).

## 2. FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO.

Estudios realizados en las últimas dos décadas han demostrado que la regulación del comportamiento de los progenitores neuroepiteliales en diversas especies, no solo depende de influencias externas al propio esbozo o de la acción de factores paracrinos y autocrinos, sino que el tejido neuroepitelial tiene una marcada dependencia de la actividad del fluido contenido dentro de las cavidades de las vesículas cerebrales, que es capaz de: activar la supervivencia celular, la replicación de los progenitores y su diferenciación neuronal, además del control de expresión de determinados genes (Gato et al., 2005; Parada et al., 2005 a; Salehi y Mashayekhi, 2006; Alonso et al., 2011).

A diferencia del CSF de adulto, que es segregado por los plexos coroideos y fluye a través del sistema ventricular (Salehi y Mashayekhi, 2006), durante el desarrollo embrionario, al no haberse formado todavía los plexos coroideos, la secreción del CSF-E depende de las propias células neuroepiteliales.

### 2.1. INFLUENCIA EN EL DESARROLLO CEREBRAL TEMPRANO.

#### 2.1.1. INFLUENCIA DEL CSF-E EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS NEUROEPITELIALES.

Durante el desarrollo temprano del cerebro embrionario el comportamiento básico de las células neuroepiteliales o “precursores neuronales” se evidencia por su elevada capacidad de **supervivencia**, su elevada tasa de **replicación** y el comienzo del proceso de **diferenciación** (que como hemos comentado, en estas etapas tempranas se orienta hacia la neurogénesis) (Gato et al., 2005), procesos en los que el CSF-E influye decisivamente, al tiempo que colabora con el organizador ístmico en la regulación de la expresión génica del neuroectodermo (Parada et al., 2005 a).

Un detalle importante a tener en cuenta es que, como hemos demostrado, la regulación de estos tres procesos básicos parece depender de factores individuales y específicos. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el CSF-E controla la replicación de estas células mediante la presencia de factores de crecimiento del tipo del FGF-2 y/o EGF, según especies (Martín et al., 2006). Estos resultados demuestran que al añadir CSF-E al medio de cultivo, o bien implantar microesferas impregnadas en CSF-E en el tejido neuroepitelial, se produce un efecto trófico positivo que reduce significativamente el número de células en apoptosis y activa los procesos de replicación y diferenciación hasta valores casi normales, pudiéndose deducir que el neuroepitelio necesita la presencia del

CSF-E para que sus células sean autosuficientes en cuanto a: supervivencia, replicación y diferenciación. Esto a su vez sugiere que el CSF-E y el neuroepitelio son interdependientes y trabajan juntos como una unidad funcional (Gato y Desmond, 2009).

Según estos mismos autores, se puede afirmar que existe una **interdependencia** de los **factores mecánicos** y **factores moleculares** en el control del crecimiento del cerebro embrionario (Gato y Desmond, 2009).

Martín et al., 2006, han centrado su estudio en la influencia de los **factores de crecimiento** presentes en el CSF-E de pollo, observando que la **anulación** de la actividad biológica del FGF-2 en el CSF-E, **reduce** significativamente el número de células neuroepiteliales en fase de **replicación celular**.

Cabría esperar que la actividad mitótica de las células neuroepiteliales inducida por la acción del CSF-E fuese la misma en las tres vesículas cerebrales. Sin embargo se ha observado que existen **diferencias regionales** en la actividad mitogénica de estas células, que pueden ser explicadas por la expresión diferencial de receptores para estos factores de crecimiento (Ozawa et al., 1996; Wilke et al., 1997; Walshe y Mason, 2000; Trokovic et al., 2005).

Otra importante acción relacionada con el **CSF-E**, es su capacidad para inducir **diferenciación neuronal** en los precursores neuroepiteliales (Gato et al., 2005). Se ha demostrado que el CSF-E contiene retinol y RBP en embriones de pollo (Parada et al., 2008b), y que el CSF-E ayuda al control de la síntesis de ácido retinoico por parte de las células del istmo-mesencéfalo-romboencefálico. Además el CSF-E tiene actividad similar a la del ácido retinoico, lo cual sugiere que podría actuar como una ruta de difusión para este factor neurogénico, por lo que la influencia del CSF-E sobre la neurogénesis es debida en gran medida a su participación en la síntesis de ácido retinoico (Alonso et al., 2011).

Sawamoto et al., 2006, han estudiado la influencia que el CSF de cerebro adulto tiene en la migración de nuevas neuronas desde la zona subventricular al bulbo olfatorio, describiendo un mecanismo de guía por gradientes de quimiorrepulsión.

Este hecho pone de manifiesto que el CSF puede tener diferentes propiedades en las diferentes zonas del cerebro, así como durante los diferentes periodos, embrionario, fetal y adulto.

Miyan et al., han demostrado que la composición y propiedades del CSF cambian durante los estadios fetales de rata, exhibiendo una mayor actividad mitogénica a los 19-20 días del desarrollo. Otra teoría propuesta por estos autores es que la composición del CSF cambia en su paso a través de los diferentes ventrículos cerebrales antes de alcanzar el



espacio subaracnoideo. Estos cambios se deben a una adición secuencial de componentes desde los diferentes plexos coroideos. De hecho, en el espacio subaracnoideo, el CSF ha sido relacionado con la estratificación cortical, vía síntesis de reelina por la células de Cajal-Retzius (Miyan et al., 2006; Salehi y Mashayekhi, 2006).

En base a lo anteriormente descrito, las distintas propiedades específicas del CSF-E, se deben a mecanismos que directa o indirectamente dependen de los componentes del mismo. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento, no aclaran el mecanismo responsable de la inhibición de la muerte celular que ejerce el CSF-E sobre los precursores neuroepiteliales.

### 2.1.2. INFLUENCIA DEL CSF-E EN EL CRECIMIENTO Y EXPANSIÓN DEL CEREBRO EMBRIONARIO.

Como hemos comentado anteriormente, en las fases tempranas del desarrollo, el neuroepitelio y su cavidad forman un sistema biológico diferente al de los plexos coroideos y las cavidades cerebrales. En las fases tempranas del desarrollo cerebral, el papel del **CSF-E** contenido en la cavidad del mismo, no solo regula el comportamiento individual de las células neuroepiteliales, sino que interviene de forma directa en otros **mecanismos morfogenéticos** complejos como son la **expansión** y la **morfogénesis cerebral** (Gato y Desmond, 2009). En este sentido, desde la década de los 80, existen diversos estudios que demuestran que el CSF-E influye sobre la morfogénesis y el desarrollo cerebral. Inicialmente se demostró que el fluido intracavitario ejercía una **presión positiva** sobre la pared neuroepitelial que controlaba el proceso de expansión del cerebro y el crecimiento neuroepitelial. Esto llevó a que en 1970 la Dr. Mary E. Desmond demostrase que la acumulación de CSF-E en la cavidad cerebral en embriones tempranos creaba una presión, esencial para la rápida expansión del cerebro embrionario, observando que en embriones de pollo esta presión aumentaba un 10% en cada estadio embrionario (Desmond y Jacobson, 1977; Desmond y Schoenwolf, 1985; Desmond et al., 1993; Desmond y Levitan, 2002). Esta presión positiva que ejerce el CSF-E es posible gracias al cierre del tubo nervioso, que da lugar a una cavidad estanca en la porción cerebral del tubo neural (Gato y Desmond, 2009).

Van Essen postuló que la tensión mecánica, que actúa en contra de la presión hidrostática generada en el interior de la cavidad, es la principal fuerza motora que dirige la morfogénesis del SNC en adultos. Dado que las células neuroepiteliales se encuentran sometidas a tensión y que carecen de una estructura rígida en la cual sostenerse, el único factor que evita un colapso del cerebro, por reducción de su volumen, es la presión

hidrostática creada por el CSF-E (Van Essen, 1997). Si se disminuye la presión intraluminal de los ventrículos durante 24 horas, mediante drenaje del CSF-E, se observa un descenso significativo en el crecimiento del esbozo cerebral que se acompaña de una alteración en la morfogénesis, mientras que si se incrementa la presión, se activa la replicación celular, lo cual demuestra que la presión ejercida por el CSF-E dirige la expansión de los ventrículos y puede jugar un papel importante en la proliferación del neuroepitelio (Desmond, y Jacobson, 1997; Desmond et al., 2005).

Nuestro grupo ha estudiado el proceso expansivo y la morfogénesis cerebral en etapas tempranas del desarrollo, demostrando que la **secreción apical de proteoglicanos** (Condroitín Sulfato) al CSF-E por parte de las células neuroepiteliales cerebrales genera un gradiente osmótico que produce el paso de agua a favor de gradiente, acumulándose en el ventrículo estanco y generando dicha **presión hidrostática** (Gato, et al., 1993, 2001, 2002, 2004; Gato y Desmond, 2009; Alonso et al., 1998, 1999, 2000; Miyan et al., 2003). La regulación de las propiedades osmóticas del fluido, genera la presión interna necesaria para la expansión y morfogénesis del cerebro, que es imprescindible para el desarrollo normal de éste. En estos estudios también se ha demostrado que existe una gran cantidad de **iones inorgánicos** en el CSF-E, principalmente sodio, que ayudarían a crear esa presión osmótica (Jelinek y Pexieder, 1968; Sedlacek, 1975). Varios investigadores han sugerido que el Na<sup>+</sup> que sale al exterior, crea un potencial eléctrico trans-membrana que podría dirigir la normal morfogénesis (Hotary y Robinson, 1991; Shi y Borgens, 1994; Borgens y Shi, 1995). Nuestro grupo ha demostrado que existe una relación funcional entre las concentraciones de sodio y el Condroitín Sulfato en el CSF-E de pollo que les haría responsables de crear la presión intracavitaria (Alonso et al., 1998).

En respuesta al aumento de la presión, las paredes de los ventrículos se expanden, con lo cual, para mantener el grosor de la pared, es necesario que ocurra un **aumento de la población celular del neuroepitelio**. Diversos estudios han demostrado que al aumentar la presión intraluminal de la cavidad del cerebro embrionario, aumenta significativamente la densidad mitótica del neuroepitelio (Desmond et al., 2005). Esto coincide con lo publicado por Abercrombie en 1970, respecto al aumento de la actividad mitótica de las células en respuesta a un incremento de la tensión y sugiere, que en estos tejidos, deben de existir mecanismos para detectar dicha tensión, conocidos como mecanorreceptores. Este mecanismo podría ser similar al encontrado en fibroblastos, que consiste en kinasas de adhesión focal (FAKs) que responden a aumentos de tensión, estimulando el ensamblaje y desensamblaje de sus fibras de estrés (Gato y Desmond, 2009).

En resumen se han descrito cuatro posibles mecanismos basados en principios fisiológicos que explican este proceso de génesis de presión intracavitaria:

- Difusión pasiva directa de agua vía presión hidrostática generada por el flujo sanguíneo.
- Difusión pasiva directa vía canales de agua o acuaporinas.
- Transporte activo de  $\text{Na}^+$  vía bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .
- Transporte o secreción de proteoglicanos en los ventrículos.

Los dos últimos mecanismos podrían trabajar juntos, creando un gradiente osmótico (Gato y Desmond, 2009).

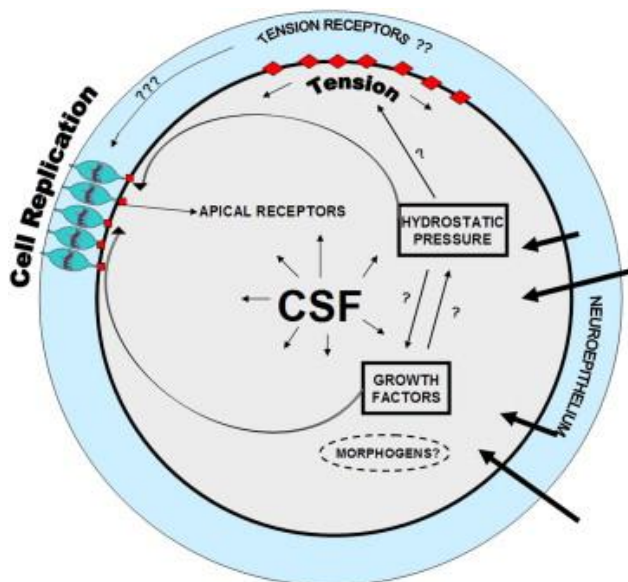


Fig. 10. Esquema que representa una sección transversal de la región del cerebro medio que explica la interdependencia de las interacciones de la presión hidrostática creada por el CSF-E y los factores de crecimiento sobre el comportamiento del neuroepitelio. El fluido atraviesa el neuroepitelio a través de un gradiente osmótico (flechas grandes a la derecha). El CSF-E genera la expansión de la superficie luminal indicado por las flechas que emanan de la palabra CSF. Los factores de crecimiento probablemente estimulan la mitosis de las células neuroepiteliales a través de receptores apicales simbolizados por las cajas rojas en la superficie ventricular. También puede haber una influencia bidireccional de factores de crecimiento en la presión hidrostática y viceversa. La presión hidrostática genera

tensión en la superficie interna del neuroepitelio, estimulando la actividad mitótica a través de los receptores de tensión, como las quinasas de adhesión focal (FAKs) en la superficie o dentro de las células neuroepiteliales. Imagen tomada de Gato y Desmond, 2009.

Estudios realizados en el pez cebra, sugieren que la expansión del cerebro es dependiente en cierta medida de la presión hidrostática y que la formación de los ventrículos ocurre de manera independiente de la circulación sanguínea (Scheir et al., 1996; Lowery y Sive, 2005). Sin embargo esto no ha sido demostrado en vertebrados superiores.

En el periodo expansivo del cerebro embrionario se han llevado a cabo experimentos que apoyan la teoría del transporte de  $\text{Na}^+$  a través de las bombas ATPasas- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Para ello se trataron con ouabaína (inhibidor de la bomba) embriones de pollo, observándose una disminución en el tamaño de las vesículas cerebrales en los experimentales (Li y Desmond, 1991). Por otro lado, el incremento de  $\text{Na}^+$  en los ventrículos inducido por el  $\beta$ -D-Xilosido, conlleva una hiper-expansión de los ventrículos (Alonso et al., 1998, 1999).

Lowery y Sive (2005) realizaron experimentos con mutantes de pez cebra (sankehead) en el gen de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , observando que aunque la morfogénesis de los ventrículos era normal, éstos no se expandían, probablemente debido a la alteración en el transporte de iones.

Gato et al., 1993, demostraron que la ósmosis, es el mecanismo responsable de la acumulación de fluido dentro de los ventrículos y la subsiguiente génesis de la presión del CSF-E. Estos autores proponen que los componentes osmóticos se transportan hacia las vesículas cerebrales desde el exterior atravesando el neuroepitelio o son secretados por las células neuroepiteliales, creando un gradiente osmótico entre el interior y el exterior. Como consecuencia, el agua pasa al interior de la cavidad sellada y se acumula en el ventrículo generando una presión hidrostática.

El soporte para esta hipótesis se basa en la detección de un material precipitado en el interior del ventrículo cerebral de embriones de pollo y de rata, que es morfológicamente compatible con una matriz extracelular, junto con la presencia de estructuras morfológicas como vesículas secretoras y prominentes aparatos de Golgi en la porción apical de las células neuroepiteliales, compatible con las células secretoras (Gato et al., 1993).

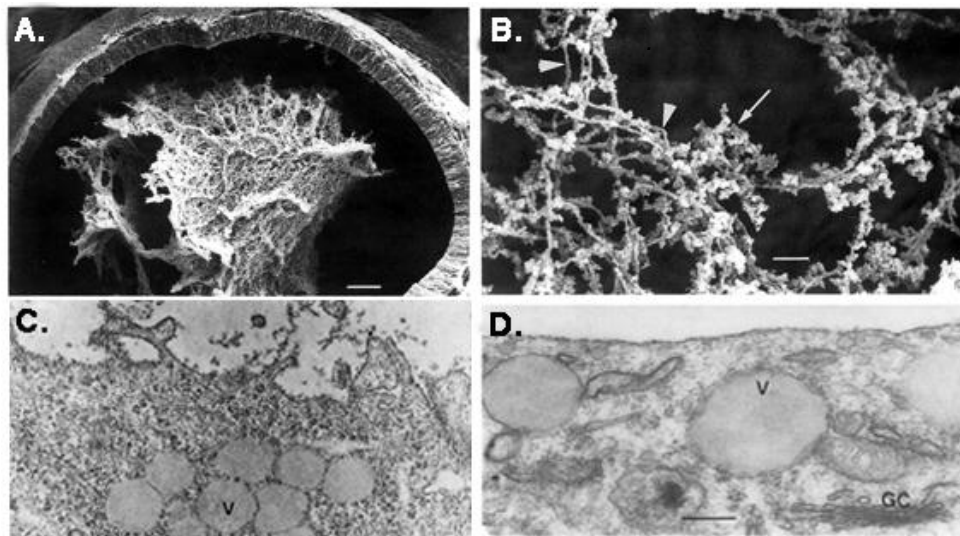


Fig. 11. Las imágenes A y B, muestran la presencia de material precipitado en el interior de la cavidad mesencefálica de embriones de pollo de estadio 23 HH. En la imagen B, se muestra la presencia de una red tridimensional fibrosa (puntas de flecha) y formaciones de apariencia globular (flecha). Las imágenes C y D muestran la presencia de estructuras vesiculares (V) y aparatos de Golgi (GC), en la porción apical de las células neuroepiteliales (Imagen tomada y modificada de Gato et al., 1993).

Se ha demostrado también la presencia, en el CSF de embriones de pollo y de rata, de moléculas de alto poder osmótico, como los proteoglicanos, que contribuyen al gradiente osmótico y que, junto con el sodio ( $\text{Na}^+$ ), actúan como elementos esenciales en la génesis y regulación de la presión del CSF (Alonso et al., 1998, 1999, 2000; Gato et al., 2004).

Diversos estudios realizados mediante la inyección de moléculas (trazador inerte BDA 3000, proteínas endógenas y exógenas heterólogas) en el flujo sanguíneo del corazón y en las cavidades cefálicas, han demostrado que la cavidad cefálica está fisiológicamente sellada al menos desde el estadio 20HH y la existencia de una barrera funcional CSF-sangre, dinámicamente activa, que controla la composición específica del CSF-E y la homeostasis en embriones de pollo. Un número significativo de moléculas identificadas en el CSF-E de pollo, no son producidas por el propio neuroectodermo, sino por otras estructuras embrionarias y son transportadas hacia el CSF-E. Se ha detectado un área específica de transporte neuroepitelial en el tronco-encéfalo (cerca del neuroectodermo mesen-prosencefálico ventral) que contiene un número elevado de vasos sanguíneos. Esta transferencia de moléculas proteicas a través de la interfase sangre-CSF está regulada de manera diferente y es específica de cada molécula, tratándose de un transporte selectivo a través de rutas transcelulares (Parvas et al., 2008).

Hasta hace pocos años la presencia de acuaporinas solo había sido descrita durante el desarrollo de los plexos coroideos, que tiene lugar en una etapa posterior del desarrollo (Shin et al., 2006; Johansson et al., 2005; Nico et al., 2001). Sin embargo estudios posteriores, realizados por el grupo de Parvas y Bueno, demuestran que en embriones de pollo y rata los vasos sanguíneos, anteriormente mencionados, próximos al neuroectodermo, expresan varias moléculas relacionadas con el agua y el transporte de iones, como AQP1, AQP4 y Kir4.1, confirmando la existencia de una barrera sangre-CSF que controla la composición del CSF-E y la homeostasis en las primeras etapas del desarrollo del cerebro en embriones de pollo, regulando así la osmolaridad del CSF-E y proponen, en base a estos resultados, la existencia de una barrera similar sangre-CSF-E en los mamíferos (Parvas y Bueno, 2009).

### **2.2. COMPOSICIÓN DEL CSF-E.**

Como queda patente en los apartados anteriores, es necesario un adecuado conocimiento de los componentes del CSF-E para poder entender cómo dicho fluido ejerce sus acciones biológicas. Este hecho ha llevado a la realización de una serie de estudios sobre su composición, que han conducido en los últimos años a un conocimiento más profundo (mediante western-blot, análisis proteómico y detección de moléculas por HPLC) de la composición de este fluido, que es compleja y contiene múltiples productos de expresión génica entre los que se encuentran factores de crecimiento (FGF2 y EGF entre otros), citoquinas, morfógenos como el retinol, proteoglicanos, apolipoproteínas, RBP, etc.

Birge et al., 1974 y Dziegielewska et al., 1980b, demostraron que el CSF de embriones de pollo es treinta veces más rico en proteínas que en el adulto. La concentración de proteínas en el CSF-E ha sido estudiada en numerosas especies. En pollo y en oveja se incrementa progresivamente durante el periodo embrionario tardío, mientras que disminuye en los estadios fetales. En ratas sin embargo, esta disminución no ocurre hasta después del nacimiento, esto sugiere de nuevo que las diferencias filogenéticas juegan un papel importante en la maduración del CSF (Dziegielewska et al., 1980a; Checiu et al., 1984; Fielitz et al., 1984).

La comparación de los proteomas del CSF-E de pollo y de rata, muestra la conservación de **proteínas** de conocida **actividad morfo genética**, como el sistema de internalización del retinol (RBP); sin embargo dentro de este patrón común, existen notables diferencias entre la composición del CSF-E de aves y roedores que podrían estar relacionadas con variaciones filogenéticas en el desarrollo cerebral. En el CSF-E de rata, se observa una mayor presencia de miembros de la familia de las **apolipoproteínas**, productos génicos implicados en el transporte de lípidos para la formación de la mielina de las neuronas y en la activación de la vía de señalización de las MAP-quinasas. De estos datos se desprende que el **CSF-E contiene moléculas de elevado valor biológico** que podrían estar implicadas en distintos aspectos del desarrollo cerebral (Gato et al., 2004; Parada et al., 2005b; Parada et al., 2006).

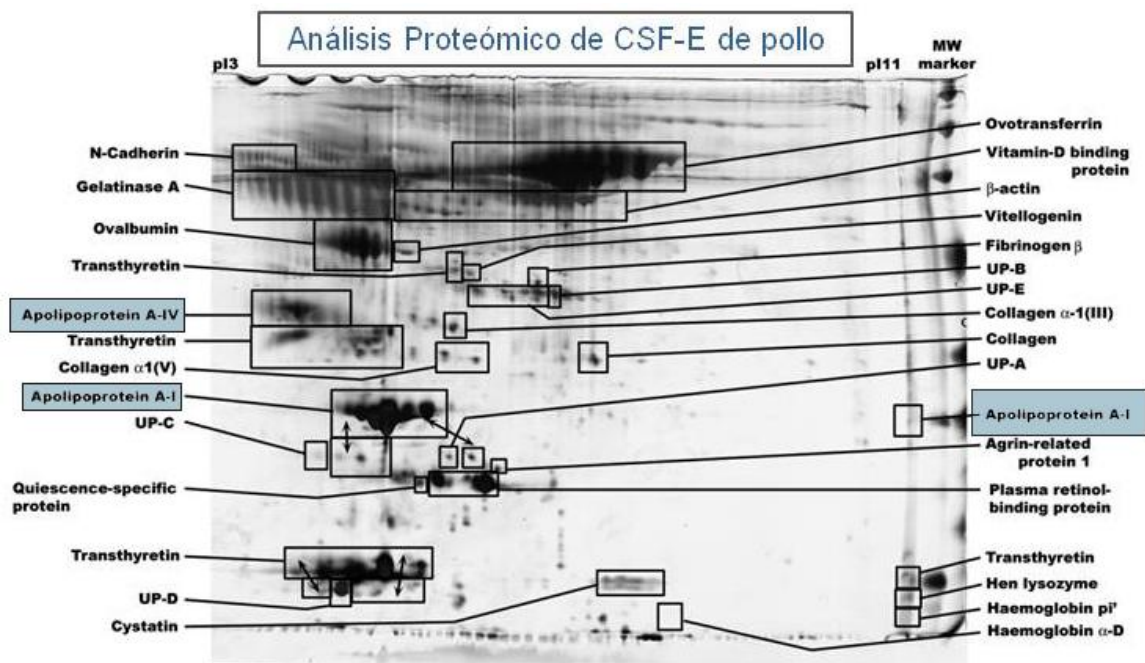


Fig. 12. Resultados del análisis proteómico (electroforesis 2D, secuenciación de proteínas y búsqueda de péptidos en bases de datos) del CSF-E de pollo. En él se muestra la presencia de, al menos, 26 productos génicos, que incluyen: proteínas de matriz extracelular, proteínas relacionadas con la regulación de la presión osmótica, el transporte de metales y de la supervivencia celular, apolipoproteínas, proteínas implicadas en el transporte de retinol y vitamina D, proteínas antioxidantes y antimicrobianas y algunas desconocidas. Imagen tomada de Parada et al. 2006.

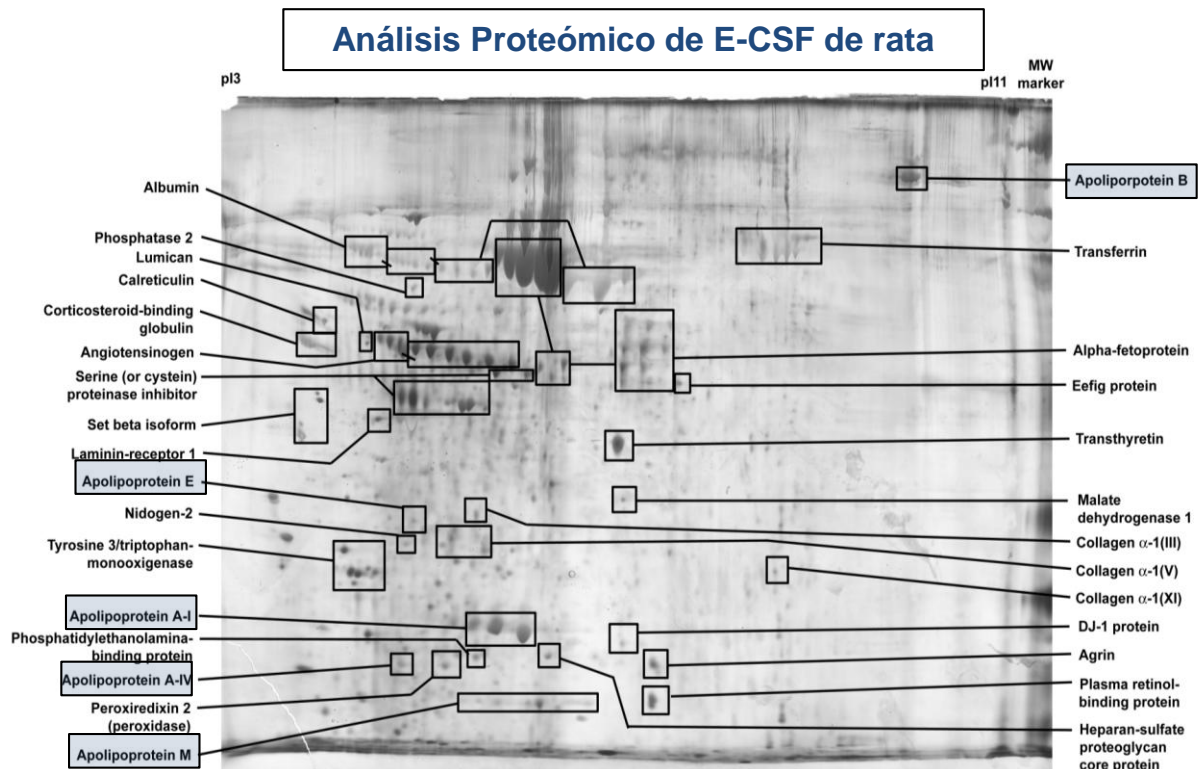


Fig. 13. Resultados del análisis proteómico (electroforesis 2D, secuenciación de proteínas y búsqueda de péptidos en bases de datos) del CSF-E de rata. El análisis muestra la presencia de al menos 31 proteínas, que pertenecen a los mismos grupos de productos génicos identificados en el CSF-E de pollo, y que también han sido implicadas en la regulación de procesos de desarrollo durante la embriogénesis en sistemas distintos al CSF-E. Imagen tomada de Parada C. et al. 2005b.

Uno de los hechos más llamativos que se desprende de los estudios proteómicos del CSF-E de pollo (*Gallus gallus*) y de rata (*Rattus norvegicus*) es la presencia de las apolipoproteínas, que varían según la especie, de forma que en el embrión de pollo se detectan Apo AI y AIV y en el de la rata Apo AI, AIV, B, E y M. Las diferencias entre especies se corresponden a una especificidad en la síntesis de apolipoproteínas durante el desarrollo del cerebro embrionario.

Dado el importante papel biológico que se les ha adscrito a las apolipoproteínas, no sólo como moléculas transportadoras de lípidos, sino también como moléculas inhibidoras de la muerte celular por reducción del estrés oxidativo, incluimos el siguiente capítulo con los rasgos principales de estas moléculas.

Zappaterra et al., 2007 al analizar y comparar el CSF-E de rata y humano, han identificado una gran cantidad de moléculas presentes en ambos fluidos, tales como inhibidores de proteasas, proteínas de la matriz extracelular, proteínas transportadoras y un pool de proteínas de señalización e intracelulares. Según estos autores estos dos pool de proteínas podrían formar parte del contenido de las microvesículas descritas por Marzesco

et al., 2005 en el CSF-E y en la superficie del neuroepitelio en el cerebro embrionario de ratón 11.5 días de desarrollo, estas microvesículas contienen Prominina I en su superficie. El grupo de Corbeil, ha centrado sus estudios en los cambios que sufren las células neuroepiteliales en su superficie apical antes y después de iniciarse el proceso de diferenciación celular. En la superficie apical de las células neuroepiteliales se localizan microvellosidades, cilios y el cuerpo medio, sobre estas estructuras se ha encontrado un componente denominado Prominina-I, que interacciona con un microdominio de membrana basado en colesterol, dando lugar a diferentes partículas recubiertas por prominina. Lo que se desconoce es el destino de estas partículas, su composición proteica y lipídica y su función. Su hipótesis es que la liberación de estas partículas con prominina-I esté vinculada de alguna manera al control de la proliferación frente a la diferenciación de las células madre neuroepiteliales (Corbeil et al., 2010)

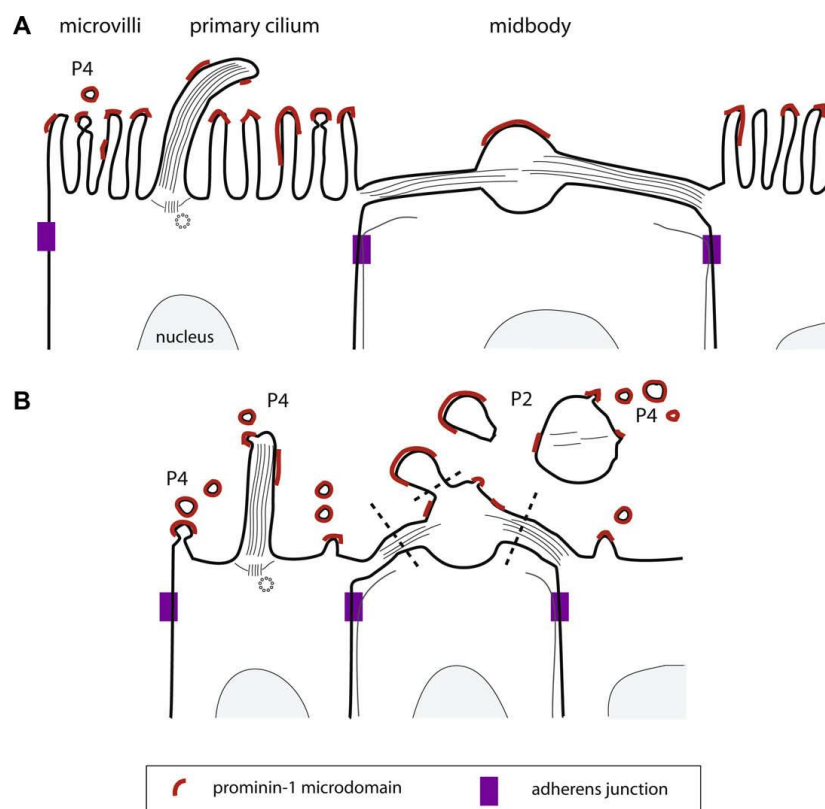


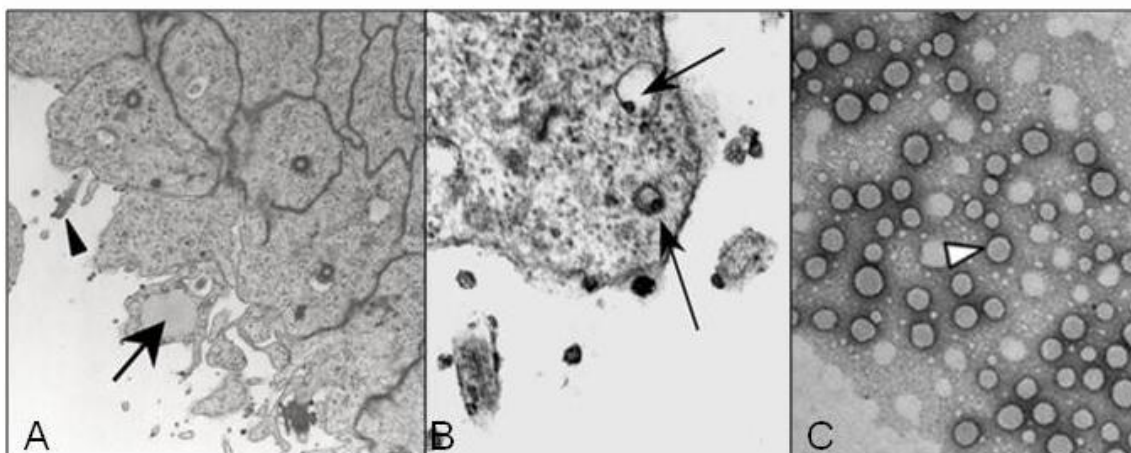
Fig. 15. Representación esquemática de la vista actual en la membrana apical de las células neuroepiteliales y su modificación durante el proceso de diferenciación celular. La membrana plasmática apical se representa antes (A) y después (B) de la aparición de la neurogénesis. Hay tres tipos de protuberancias de membrana (microvellosidades, cilios primarios, midbody) y dos posibles vías de formación de partículas que contienen prominina-1, P4 y P2. Las líneas discontinuas en (B) indican el lugar de fisión membrana. El color rojo indica microdominios de membrana que contienen prominina I. El color púrpura indica las uniones adherentes (Imagen tomada de Corbeil et al., 2010).



Bachy et al., 2008, han demostrado la existencia de dos pool de partículas presentes en el CSF-E:

- Lipoproteínas implicadas, en su mayoría, en el crecimiento del cerebro embrionario, aunque también podrían promover la diferenciación celular del neuroepitelio.
- Partículas membranosas similares a exosomas, las cuales podrían jugar un papel importante en la modulación de señales de transducción, posiblemente por estimulación de la actividad endocítica en áreas definidas del neuroepitelio.

Estas dos poblaciones de partículas interactúan fuertemente con las células neuroepiteliales mediante un proceso de endocitosis, que muestra una especificidad regionalizada a lo largo del tubo neural en desarrollo. Esto sugiere un intercambio fisiológico intensivo entre el CSF-E y las células neuroepiteliales. Estas partículas podrían estar implicadas en la regulación de morfógenos y la transducción de factores de crecimiento.



*Fig. 14. Poblaciones de partículas presentes en el CSF-E. En la imagen A se observa la presencia de partículas membranosas similares a exosomas (flechas) asociadas a cilios (punta de flecha). Las flechas de la imagen B, señalan la presencia de partículas próximas a la membrana celular que indican la fuerte actividad endocítica/exocítica de las células neuroepiteliales. La punta de flecha de la imagen C, indica la presencia de partículas con una morfología típica de las lipoproteínas (Imagen tomada y modificada de Bachy et al., 2008).*

### 3. APOLIPOPROTEÍNAS.

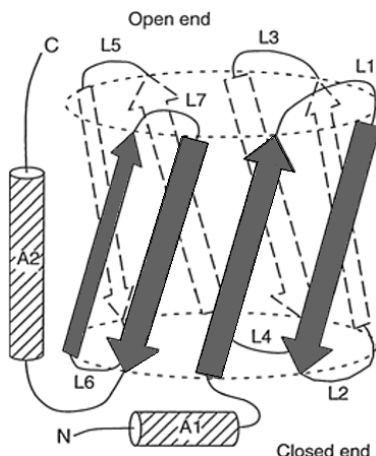
Las apolipoproteínas o apoproteínas, son glucoproteínas, que pertenecen a la familia de las lipocalinas.

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA DE LAS LIPOCALINAS.

El nombre lipocalina fue propuesto por Pervaiz y Brew en 1987 para un grupo de más de 150 proteínas, de expresión predominantemente extracelular, de una masa molecular promedio de 18-20 KDa. Las características comunes a esta familia son:

- Capacidad de **ligar pequeñas moléculas lipofílicas**, entre las que se incluyen moléculas esteroideas, hormonas tiroideas, vitaminas liposolubles, ácidos grasos (en especial, los de cadena larga) y bilirrubinas, asegurando la estabilidad de su estructura y minimizando el contacto con solventes.
- Capacidad de **unir receptores de membrana**.
- Capacidad de **formar complejos macromoleculares**.

A pesar de estas características comunes, estructuralmente están relacionadas entre sí, aunque tienen una identidad menor del 20% en promedio.



La estructura terciaria de las lipocalinas se encuentra muy conservada. Esta estructura, como puede observarse en la figura 16, se encuentra formada por 8 láminas beta antiparalelas, que se tuercen y se enrollan, dando lugar a una estructura cerrada denominada Barril- $\beta$  que consta de un residuo N-terminal (A1) y otro C-terminal (A2). Esta estructura se encuentra abierta en uno de sus extremos y en su interior se localiza un punto de unión a moléculas lipofílicas.

Fig. 16. Estructura terciaria de las lipocalinas (Imagen tomada de Ganfornina et al., 2000).

La gran variedad de funciones biológicas de las lipocalinas está mediada por la conjunción de estas tres capacidades. Diversos hallazgos sugieren que su actividad funcional, incluso la capacidad de unir un ligando lipofílico específico en un momento determinado y no en otro, varía según el tejido, el estadio de diferenciación y maduración celular. Su capacidad de asociación con diversas proteínas generando distintas respuestas biológicas hace que el panorama biológico sea complejo (García et al., 2007).

La evolución de la familia de las lipocalinas ha sido estudiada intensamente y se pueden separar en 14 clases monofiléticas, algunas de las cuales se agrupan a su vez en superclases. Su evolución muestra rasgos comunes a otras familias y superfamilias génicas (Andersen et al., 2005; Gutiérrez et al., 2000). Estas familias muestran una acentuada divergencia génica que explicaría la creciente especificidad hacia los diferentes ligandos hidrófobos.

En los procariontes se han identificado múltiples lipocalinas bacterianas. Muchas de ellas se localizan como lipoproteínas de la membrana exterior de las bacterias Gram- y se expresan en condiciones de estrés celular. Otras se localizan en el espacio periplásmico y el citosol bacteriano. Algunas lipocalinas poseen puentes disulfuro y otras no; algunas presentan un anclaje de membrana, rasgo que es compartido con otras lipocalinas como "lazarillo" (apolipoproteína D). Estas tres últimas lipocalinas de membrana parecen participar, en general, en los procesos de biogénesis y reparación de membrana. Los estudios en evolución muestran que las lipocalinas se originaron en los procariontes y que fueron, probablemente, transferidas horizontalmente a los eucariontes, mediante mecanismos tales como la endosimbiosis del ancestro  $\alpha$ -prebacteriano que originó las mitocondrias (García et al., 2007).

Las lipocalinas son por lo tanto moléculas polifuncionales. Entre las funciones descritas se encuentran:

- Transporte de componentes grasos como el complejo vitamínico A, ácidos grasos, ácidos biliares, fármacos y agentes tóxicos.
- Coloración críptica (coloración que hace que un organismo se parezca al sustrato o algún objeto inanimado, con el propósito de protección) en invertebrados, puesto que unen grupos prostéticos, incluidos retinoides y sus precursores carotenoides.
- Transporte de feromonas.
- Inmunorregulación y biosíntesis de prostaglandinas.

También juegan un papel fundamental en procesos nutricionales, de depuración, degradación o reabsorción y de reciclaje de compuestos endógenos y exógenos en el epitelio. Se sugiere su actividad eliminadora de lípidos modificados, potencialmente dañinos y el transporte de fármacos acídicos (Flower, 1996; Sivaprasadarao et al., 1993).

Muchas de sus funciones parecen ser mediadas por la unión a receptores específicos. Los dos más conocidos son el receptor de membrana que interactúa con la lipocalina 1 (LIMR) y la megalina (Faber et al., 2006; Wojnar et al., 2003).

### 3.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS. ESTRUCTURA.

Dentro de la familia de las lipocalinas, se encuentran las **apolipoproteínas**. Se caracterizan por ser solubles en agua, aunque tienen tendencia a agregarse en solución acuosa y por tener un alto contenido helicoidal, es decir sus cadenas peptídicas tienen regiones ricas en aminoácidos polares alternadas con regiones ricas en aminoácidos no polares. Estos segmentos peptídicos, al ponerse en contacto con microemulsiones lipídicas, se orientan en estructuras helicoidales de 18 a 25 aminoácidos de longitud con una cara hidrofóbica adherida a los lípidos y una cara polar en contacto con el medio exterior acuoso, estas estructuras reciben el nombre de hélices anfipáticas.

Aparentemente las hélices están estabilizadas por un entorno lipídico, probablemente porque las hélices son las que mejor satisfacen el potencial de formación de puentes de hidrógeno del armazón polipeptídico en el interior anhidro de una membrana.

Las apolipoproteínas asociadas a lipoproteínas humanas representan varias clases evolutivas. Un grupo de siete, de peso molecular relativamente pequeño (Apo AI, AIV, CI, CII, CIII y E), son miembros de una familia génica caracterizada por repeticiones en tándem de 11 codones. Cada una de ellas contiene un número de hélices anfipáticas que pueden asociarse con grupos de cabeza zwitteriónicos de fosfolípidos de monocapa de superficie. Cada una de estas proteínas tiene una afinidad de unión relativamente elevada con la partícula de lipoproteína. El grupo de las Apolipoproteínas B, está formado por dos proteínas muy grandes, Apo B100 y Apo B48, productos de un solo gen. Contiene una gran cantidad de estructuras  $\beta$  y relativamente pocas hélices anfipáticas. Al contrario de otras apolipoproteínas, tienen una afinidad elevada por las partículas de lipoproteína, y no pueden ser intercambiadas entre diferentes partículas de lipoproteínas. Un grupo de proteínas relativamente hidrófobas asociado con el sistema de lipoproteínas y formada por la apolipoproteína D, parece estar asociada con el intercambio de lípidos (Fuster et al., 1997)

El análisis de la secuencia de 245 aminoácidos de **Apo AI**, revela la existencia de seis segmentos similares de 22 residuos de aminoácidos de alta propensión a la formación de hélices. Las secuencias de estas supuestas hélices  $\alpha$ , así como tales hélices en las restantes apolipoproteínas, tienen sus residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en lados opuestos de los cilindros helicoidales. Además, la cara polar de la hélice tiene un carácter zwitteriónico, en el sentido de que sus residuos cargados negativamente se proyectan desde el centro de esta cara, mientras que los residuos cargados positivamente están

localizados en sus extremos. Se ha comprobado que el polipéptido sintético de 22 residuos con alta propensión a la formación de hélice, diseñado por E. Thomas Kaiser (Fukushima et al., 1981), tiene esta distribución de polaridad. Este polipéptido se comporta de manera similar a la Apo AI en su unión a liposomas de lecitina de huevo. Es evidente que el papel estructural de la Apo AI, y probablemente de las demás apolipoproteínas, se realiza a través de sus segmentos helicoidales y no por cualquier otra estructura terciaria organizada. Esto sugiere que las hélices  $\alpha$  de las lipoproteínas “flotan” sobre superficies de fosfolípidos. Los fosfolípidos se ordenan con sus grupos cargados unidos a residuos con carga opuesta de la cara polar de la hélice y con los primeros grupos metileno de sus residuos de ácidos grasos en asociación hidrofóbica con la cara apolar de la hélice (Voet, 1992).

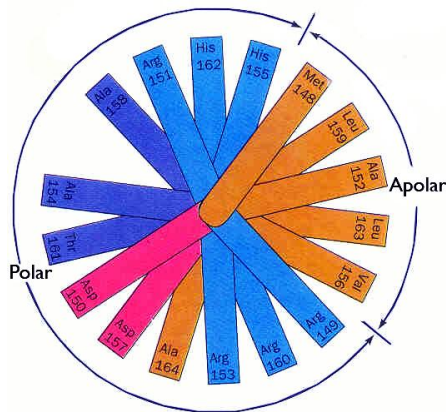


Fig. 17. Análisis de Apo AI:

Proyección de rueda helicoidal de la hélice  $\alpha$  anfipática postulada, constituida por los residuos 148 a 165 de la Apo AI. Se observa la segregación de residuos apolares, ácidos y básicos en diferentes lados de la hélice. Las hélices de otras apolipoproteínas tienen distribuciones de polaridad semejantes. (Imagen tomada y modificada de Bioquímica. Voet).

**Apo E** es una proteína de 34 KDa, formada por 299 aminoácidos organizados en 2 dominios independientes: el N-terminal y el C-terminal conectados por una región bisagra que es flexible. La región que interactúa con los receptores de Apo E está en el dominio N-terminal, mientras que la región de unión a lípidos está en el dominio C-terminal. Las 3 isoformas Apo E2, Apo E3 y Apo E4 difieren únicamente en las posiciones 112 y 158, pero estas diferencias afectan a la estructura de la proteína y a su unión a lípidos y a receptores. Apo E2 transporta lípidos menos eficientemente y su presencia se asocia con la hiperlipoproteinemia de tipo III. Apo E4 se une preferencialmente a lipoproteínas de gran tamaño y está asociada con un moderado aumento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. La presencia de Arginina en la posición 2 afecta a la conformación de la Arginina 61 (en el dominio N-terminal), que en esta isoforma interactúa con el Glutámico 255 del dominio C-terminal (Ver figura 16). Este tipo de interacción entre los dominios N y C terminal parece afectar a la estabilidad de la molécula que queda en un estado inestable denominado “molten globule” que podría influir en la patogenia del Alzheimer (Bu, 2009).

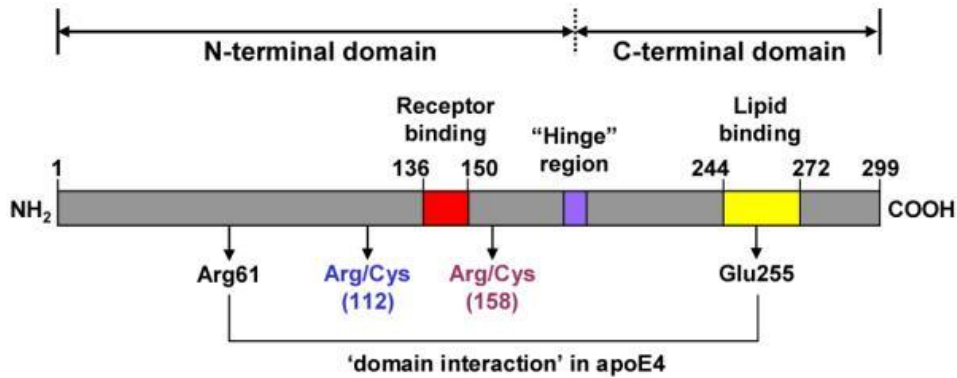


Fig. 18. Representación esquemática de Apo E humana. En esta imagen se puede observar la presencia de dos dominios plegados independientes, un dominio N-terminal que incluye la región de unión al receptor y un dominio C-terminal que contiene la región de unión a lípidos. Los restos que distinguen a las tres isoformas son los marcados en azul y rosa. Apo E2 tiene cisteínas en ambas posiciones, Apo E4 tiene argininas en ambas posiciones, y Apo E3 tiene Cys en la posición 112 y Arg en la posición 158. (Imagen tomada de Bu, 2009).

Los seres humanos expresan dos formas de **Apo B**, Apo B-48 y Apo B-100. Apo B-100 consta de 4536 residuos, mientras que la Apo B-48 se compone de 2152 residuos. Ambas isoformas se sintetizan a partir del mismo gen, sin embargo los RNA<sub>m</sub> difieren en un cambio en una base nirtrogenada, de manera que el codón CAA que codifica para la glutamina 2153 en Apo B-100, en Apo B-48 la cisteína es sustitida por uracilo dando lugar a un codón de parada (UAA). Este proceso de edición postraduccional del RNA<sub>m</sub> (desaminación oxidativa) está mediado por un enzima denominada APOBEC-1 (enzima editora de apolipoproteína B, polipéptido catalítico 1) que sustituye la citidina por la uridina, dando lugar a las dos isoformas (Etiénne 2001; Voet et al., 2009).

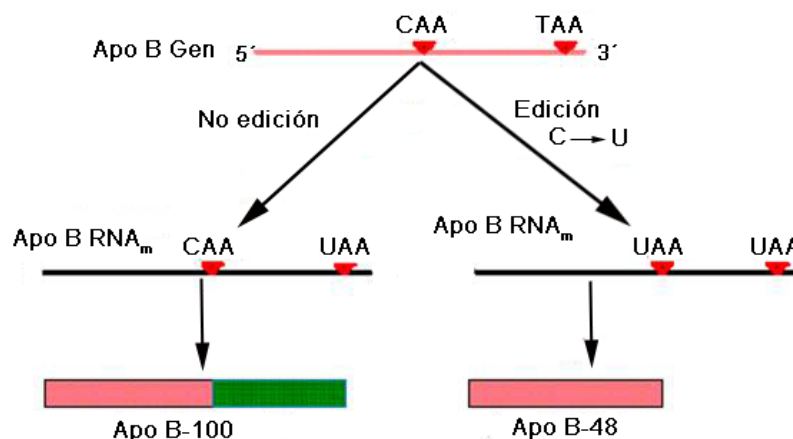


Fig. 19. Representación de la edición del RNA<sub>m</sub> de Apo B que origina las dos isoformas, Apo B-48 y Apo B-100.

Las apolipoproteínas, como hemos comentado anteriormente, forman parte de las lipoproteínas. Los lípidos son moléculas insolubles en agua que requieren formar complejos con proteínas para ser transportadas en el plasma. Estos complejos llamados

lipoproteínas están constituidos por un centro hidrofóbico de ésteres de colesterol y/o triglicéridos rodeado por una monocapa superficial de colesterol, fosfolípidos y apolipoproteínas. Las apolipoproteínas proporcionan solubilidad a los lípidos, estabilizan a las partículas lipoprotéicas y les confieren la capacidad de interactuar con sus receptores localizados en la superficie de ciertos tipos celulares. Existen apolipoproteínas que se mantienen fijas en un tipo particular de **lipoproteína** y otras que pueden unirse a diferentes tipos denominándose apolipoproteínas no intercambiables o intercambiables respectivamente.

Las lipoproteínas, por lo tanto, son partículas que consisten en lípidos y proteínas asociados de forma no covalente y funcionan en el plasma sanguíneo como vehículos transportadores de triacilglicéridos y de colesterol.

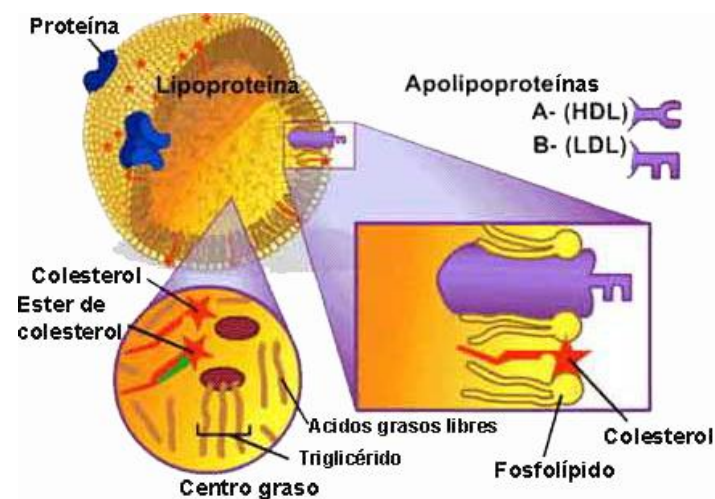


Fig.20. Diagrama en el que se muestra la estructura de una lipoproteína. Constituidas de un centro hidrofóbico de ésteres de colesterol y/o triglicéridos rodeado por una monocapa superficial de colesterol, fosfolípidos y apolipoproteínas.

En adultos, las apolipoproteínas constituyen la mayor fracción proteica de las lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL). Se sabe que las lipoproteínas participan en la regulación de señales en el desarrollo embrionario (Willnow et al., 2007)

La densidad de las lipoproteínas varía con la proporción de proteínas y el tipo de lípido que esté presente, clasificándose en:

- QM, quilomicrones.
- VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.
- IDL, lipoproteínas de densidad intermedia.
- LDL, lipoproteínas de baja densidad.
- HDL, lipoproteínas de alta densidad.

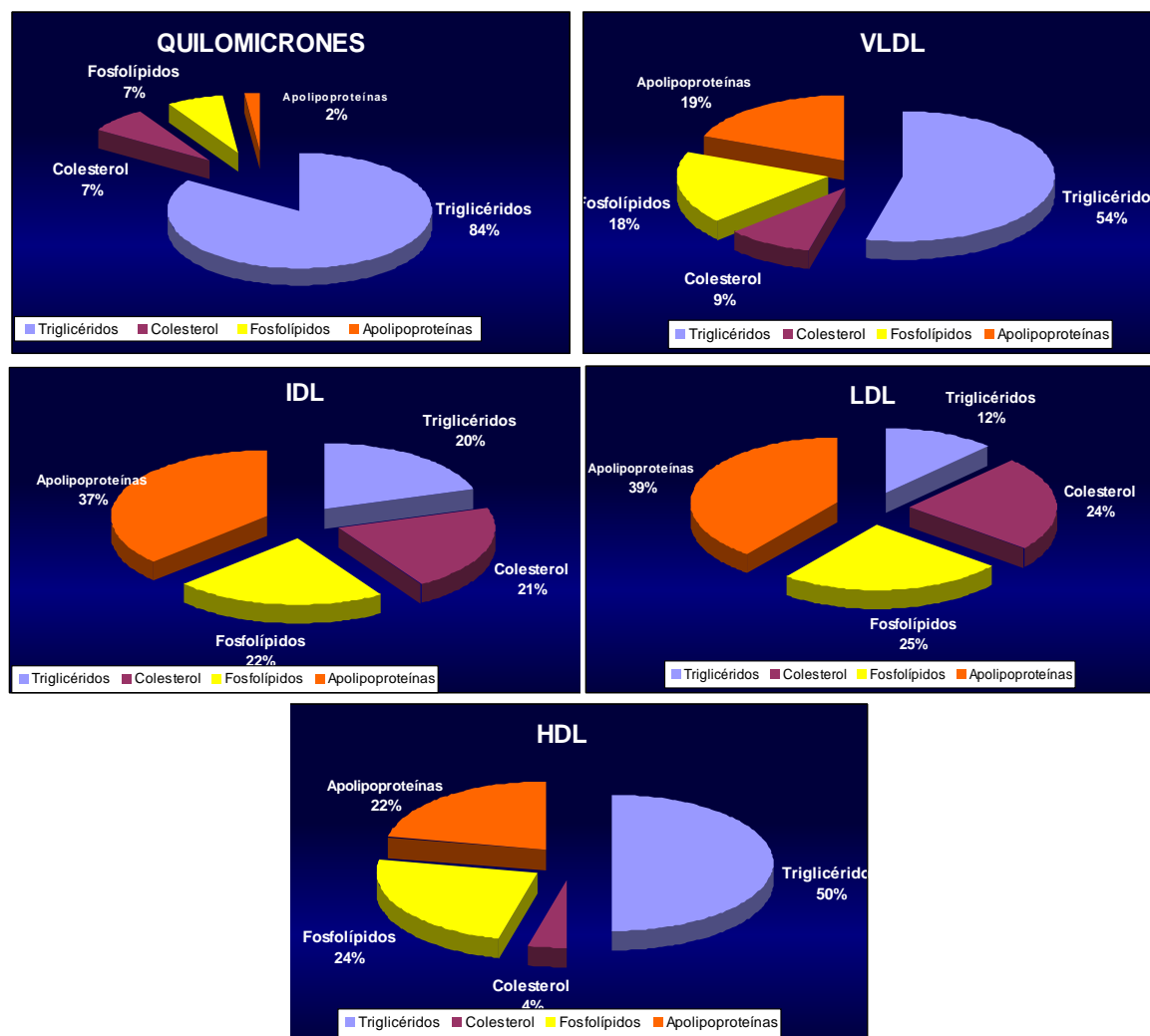


Fig.21. Composición de los diferentes tipos de lipoproteínas.

La función más conocida de las apolipoproteínas es mantener la estructura de la lipoproteína y regular el metabolismo y el transporte de las mismas. En adulto, son sintetizadas en su mayoría por el hígado y algunas otras por el intestino delgado.

Los distintos tipos de apolipoproteínas han sido denominadas siguiendo un orden alfabético arbitrario. Las más importantes o las más estudiadas son Apo A, Apo B, Apo C, Apo E, aunque también están descritas otras como Apo D, Apo F, Apo J, Apo L y Apo M.

- **Apo A:** se subclasifican en A I, A II y A IV. Se encuentran sobre todo en las HDL y también en los quilomicrones. Desempeña un papel clave en el mantenimiento de la integridad de las partículas de HDL, además activan la enzima L-CAT que esterifica el colesterol plasmático libre.
- **Apo B:** existen dos tipos, la Apo B-48 y la Apo B-100. Ambas están codificadas por el mismo gen. Apo B-48 contiene el 48% de la longitud total de la Apo B-100 y se expresan en lugares diferentes. Apo B-48 es sintetizada en el intestino y es esencial



para la formación de los quilomicrones. La Apo B-100 se sintetiza en el hígado, se encuentra en las VLDL, IDL y HDL y es esencial para el ensamblaje y secreción de las VLDL por el hígado y es el ligando para la unión de la lipoproteína con el receptor de LDL, quien las transporta al interior celular.

- **Apo C:** se conocen diferentes clases de Apo C, Apo CI, Apo CII y Apo CIII, que se encuentran formando parte de todas las lipoproteínas, la Apo CII es activadora de la LPL (lipoprotein lipasa) y la Apo CIII es inhibidora de la LPL y además inhiben la captación hepática de quilomicrones y restos de VLDL.
- **Apo E:** aparte de ser sintetizada por los hepatocitos, también se forma en otras células como los macrófagos, las neuronas y las células de la glía, Se encuentra en todas las lipoproteínas; quilomicrones, IDL, VLDL, LDL, y su función es servir de mediadora de la captación de estas lipoproteínas por el hígado tanto por el receptor de LDL como por la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP, receptor related protein).
- **Apo M:** se encuentra asociada a lipoproteínas de alta densidad y en menor medida a las LDL, VLDL y quilomicrones. Es secretada a través de la membrana plasmática, aunque permanece unida a ésta, ya que está implicada en el transporte de lípidos. Además de los hepatocitos, Apo M es altamente expresada en células del túbulo proximal del riñón.
- **Apo D:** se asocia principalmente con lipoproteínas de alta densidad en plasma humano. Aunque su papel en el metabolismo no ha sido definido aún, Apo D podría actuar como un transportador multiligando, pudiendo transportar un ligando desde una célula a otra. Se expresa en numerosos tejidos, como bazo, testículos y cerebro.

### 3.3. PAPEL BIOLÓGICO DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS EN EL SISTEMA NERVIOSO.

#### 3.3.1. PAPEL NEUROPROTECTOR.

En cuanto al posible papel de las apolipoproteínas como factores de supervivencia de las células neuroepiteliales, existen diversos estudios que adscriben a distintas apolipoproteínas (A IV, D, E) un efecto inhibitor de la muerte celular, que sería mediado por su capacidad de influir en el equilibrio redox celular, favoreciendo la resistencia al estrés oxidativo. En los últimos años, existen diversos estudios que relacionan las apolipoproteínas con procesos neurodegenerativos (Fazekas et al., 2000; Enzinger et al., 2003; Muffat et al., 2008; Mahley et al., 2006, 2009; Hashimoto et al., 2009; Frieden y Garai, 2012).

En el caso de **Apo D** se ha observado que su gen homólogo en *Drosophila* (Lazarillo), regula la resistencia al estrés y a la degeneración neuronal en cerebro adulto. En ratón se ha observado que eliminando la función de Apo D se incrementa la sensibilidad al estrés oxidativo y aumentan los niveles de peroxidación de lípidos en cerebro, lo que se traduce en alteraciones de la locomoción y de las habilidades del aprendizaje. La sobreexpresión de Apo D en cerebro de ratón produce los efectos contrarios, incrementa la supervivencia e impide el aumento de peroxidación de lípidos (Ganfornina et al., 2008).

Por otra parte, estudios previos, han demostrado que algunas de las apolipoproteínas detectadas en el análisis proteómico del CSF-E de rata (Parada et al., 2005b), están directamente relacionadas con procesos de plasticidad neuronal y, además, se encuentran alteradas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, lo que sugiere que pueden estar relacionadas con la mayor plasticidad neuronal observada en mamíferos durante la neurogénesis primaria (Hoe et al., 2005; Bereczki et al., 2008; Fazekas et al., 2006; Dhikav y Anand, 2011; Bellosta et al., 1995).

La **Apo E**, parece jugar un importante papel neuroprotector. En ratas la expresión de Apo E está aumentada tras la isquemia y el daño neuronal producidos por ácido kaínico. Probablemente este aumento trata de redistribuir lípidos y favorecer la reparación sináptica. Por otra parte Apo E3 incrementa el crecimiento de neuritas y favorece la protección contra la apoptosis neuronal en mayor medida que Apo E4. Experimentos realizados con ratones transgénicos que expresan Apo E4 humana, muestran déficits sinápticos en ausencia de neuropatología.

También es diferencial la regulación de la formación de espinas dendríticas durante el envejecimiento. Experimentos con ratones de uno a dos años han mostrado que los ratones transgénicos que expresan Apo E3 y los ratones wildtype tienen una mayor densidad de espinas dendríticas que los ratones que expresan Apo E4 o los que no expresan Apo E (Bu, 2009).



Fig. 22. Efectos neurológicos diferenciales entre Apo E3 y Apo E4. (Imagen tomada de Bu, 2009).

Vanhollebeke y Pays en 2006, proponen que **Apo L**, actúa a modo de canal iónico en las membranas intracelulares y está implicada en mecanismos de activación de muerte celular programada.

Estudios recientes, con ratones transgénicos **Apo B-100**, muestran una correlación entre el incremento de Apo B-100 y el Alzheimer, de manera que la sobreexpresión de Apo B-100 humana en ratones transgénicos producía un incremento en los niveles de triglicéridos en plasma, cambios en el perfil de proteínas cerebrales y el desencadenamiento de apoptosis en el cerebro (Berezcki et al., 2008).

### 3.3.2. PAPEL EN EL DESARROLLO DEL CEREBRO EMBRIONARIO.

Como ya hemos descrito previamente, al ser la cavidad cerebral una cavidad estanca en el embrión, totalmente rodeada por células neuroepiteliales, los componentes del CSF-E deben ser forzosamente transportados o sintetizados y secretados por estas células. A pesar de la descripción de mecanismos de transporte transcelular en el neuroepitelio (Parvas et al., 2008) existen datos en la literatura que nos llevan a pensar que las apolipoproteínas del CSF-E podrían ser sintetizadas y secretadas por las propias células. En este sentido, destaca el trabajo de Sánchez et al., 2002, que muestra la **expresión de RNA de Apo D en el neuroepitelio de embriones de ratón en estadios tan tempranos** como los 10.5 días. Igualmente Babin et al., 1997 demuestran la existencia de grupos celulares que expresan Apo E en determinadas localizaciones del neuroectodermo cerebral y ocular del pez cebra, sugiriendo que podría existir un **relación entre Apo E y la morfogénesis del cerebro**.

Por otra parte, un tipo de molécula directamente relacionada con las apolipoproteínas, las lipoproteínas, han sido también descritas en relación con la cavidad del cerebro embrionario en fases tempranas. En ese sentido Bachy et al., 2008 describen la **presencia de formaciones o partículas membranosas dentro del fluido cerebroespinal**, que parecen estar intensamente relacionadas con un proceso endocítico. Dichas partículas son clasificadas en dos tipos, unas de tipo exosómico y otras como lipoproteínas. Así mismo, estos autores, identifican dentro de estas partículas la presencia de dos tipos de apolipoproteínas, como son la **Apo A-I y Apo E**. Finalmente y mediante inmunomarcaje localizan la presencia de dichas apolipoproteínas en la superficie apical de las células neuroepiteliales.

Mediante estudios de expresión de la megalina (receptor multiligando miembro de la familia de los LRP y asociado a la endocitosis mediada) durante el desarrollo telencefálico de ratón, se ha encontrado que su expresión está bloqueada en el neuroepitelio cortical entre los estadios 10.5-11.5 días. En estos estadios comienza la corticogénesis apical. Este proceso se caracteriza por un cambio entre la proliferación y la diferenciación en el pool de precursores neuronales. Esto sugiere una posible **implicación de las lipoproteínas en la diferenciación de las células neuroepiteliales** (Bachy et al., 2008).

De igual manera Parada et al., 2008a, demostró la presencia de una apolipoproteína, Apo E, en el CSF-E tanto de embriones de pollo como de ratón, al tiempo que muestra el patrón de expresión de Apo B en la superficie apical de las células neuroepiteliales de embriones de pollo de 24 HH. Estos mismos autores y en relación con la capacidad de las apolipoproteínas para regular el comportamiento celular vía incorporación de lipoproteínas, demostraron que el CSF-E de pollo contiene tres tipos de estas moléculas, VLDL, LDL y HDL, de forma que sugieren que las **LDL están directamente relacionadas con un proceso de diferenciación neural o neurogénesis**.

Algunas proteínas mutadas implicadas en el transporte de lipoproteínas, incluyendo las apolipoproteínas, han sido asociadas con defectos en el desarrollo. Los estudios realizados en ratones KO-Apo B (Farese et al., 1995) demuestran que estos ratones mueren en estadios tempranos del desarrollo y muestran un deterioro en el neuroepitelio y sus derivados.

En resumen, los datos anteriormente comentados demuestran que durante el desarrollo temprano del cerebro embrionario se expresan determinados tipo de apolipoproteínas que parecen jugar papeles relevantes en el mismo, lo cual justifica la realización de un estudio para tratar de aclarar el papel biológico de algunos tipos de apolipoproteínas en el desarrollo cerebral temprano y los mecanismos a través de los cuales ejercen dicho papel.

## 4. ESTRÉS OXIDATIVO.

Los radicales libres son moléculas generadas por reacciones bioquímicas como consecuencia del metabolismo celular. Se sabe que pueden causar daño e incluso la muerte celular. Se considera un radical libre a cualquier molécula que contenga uno o más electrones sin aparear y son generadas por reacciones bioquímicas REDOX que ocurren como consecuencia del metabolismo celular normal (reacciones bioquímicas con el oxígeno o producidas como resultado del estrés oxidativo) (Ferrer et al., 1999).

Dentro de estos radicales libres, se encuentran las especies reactivas de oxígeno, conocidas como ROS, que se forman debido a que la estructura electrónica del oxígeno hace que sea susceptible de reducciones parciales.

El exceso de formas activas de oxígeno conduce al llamado estrés oxidativo. El estrés oxidativo, por tanto, está causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico para detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

Se estima que las mitocondrias constituyen la principal fuente de ROS (Cadet, 1988; Borg, 1993; Burdon, 1995), en las cuales se genera el anión superóxido durante el proceso de transporte de electrones. La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte al anión superóxido en peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton; este último en presencia de  $Fe^{2+}$  produce el radical hidroxilo. Éste es el radical libre más reactivo, puede oxidar casi cualquier molécula biológica.

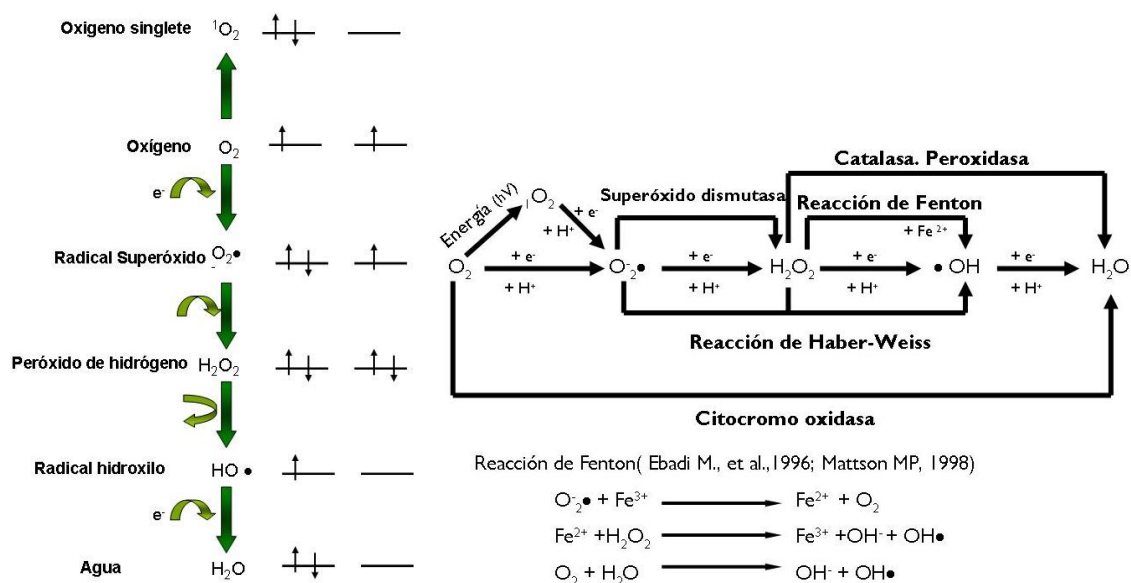


Fig. 23. Formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Para que se produzca una reducción completa del oxígeno molecular hasta el agua, es necesario añadir 4 electrones ( $e^-$ ) y 4 protones ( $H^+$ ). En la primera reacción se añade un electrón al  $O_2$  y se produce el radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). La adición de un electrón al superóxido crea el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual se disocia y forma un radical hidroxilo y un ion hidroxilo ( $\cdot OH + OH^{\bullet}$ ), mediante una reacción catalizada por el hierro en su forma reducida ( $Fe^{2+}$ ).

El estrés oxidativo puede causar la aparición de una perturbación en la homeostasis celular del calcio (Borg, 1993). Esta acción suele estar relacionada con un efecto sobre los receptores movilizantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque también resulta evidente la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  secuestrado por la ATPasa (Burdon et al, 1989) (Warren et al. 1987). Las ROS interfieren también con otros sistemas de transducción de señales a través de la acción del óxido nítrico (NO). También puede producir una disminución de la función mitocondrial, ya que reduce la eficiencia respiratoria, y con ello contribuye al incremento de ROS como electrones que son donados al oxígeno molecular.

El daño oxidativo puede agravarse o inhibirse por las especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Moncada y Higgs, 1991), incluyendo el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ), entre otros, los cuales pueden inducir un daño *per se* o combinarse con los ROS para aumentar o atenuar el daño oxidativo. El peroxinitrito es un potente oxidante, más citotóxico que el óxido nítrico, que estimula diferentes procesos proinflamatorios, incluyendo la expresión intracelular de moléculas de adhesión celular, interleuquinas (IL 8) y el factor nuclear-Kb (NF-Kb) (Vanhoutte, 2004).

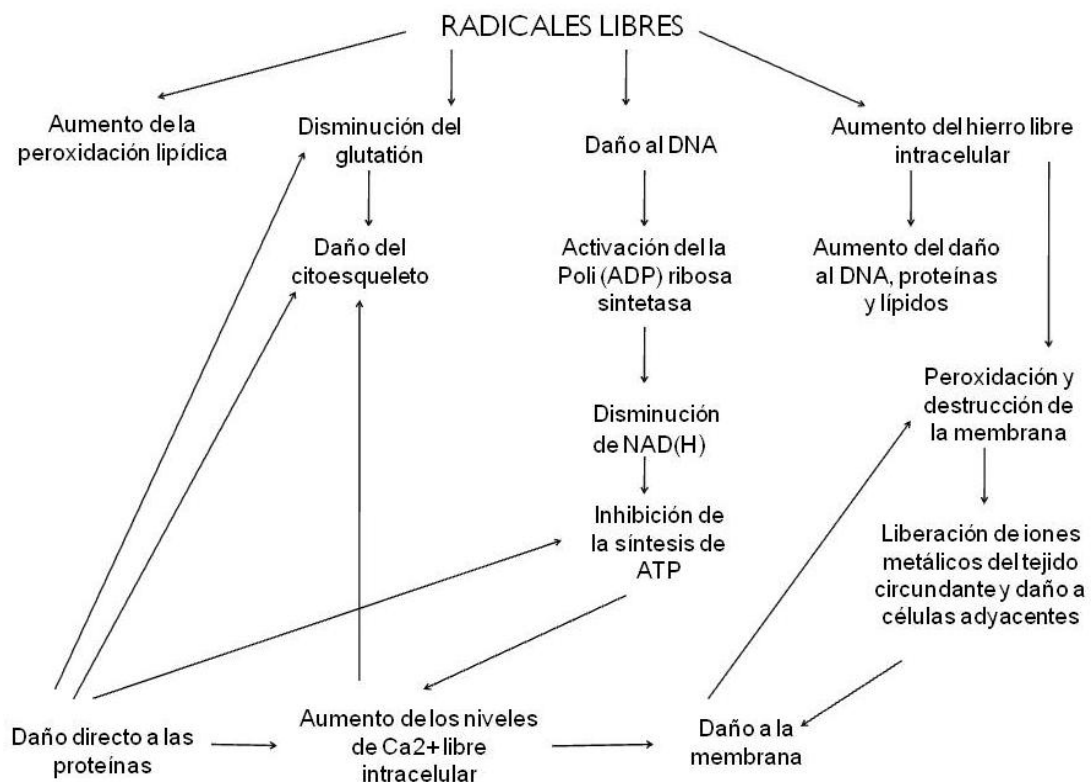


Fig. 24. Daño oxidativo producido en las células por los radicales libres.

Se han descrito numerosos sistemas biológicos capaces de generar radicales libres *in vivo*, enzimas como la NADPH oxidasa, mitocondrias, membranas celulares,... (Kanner et al., 1987; Halliwell, 2012a). Por lo tanto el metabolismo aerobio implica la producción de

especies reactivas de oxígeno, incluso en condiciones basales. Estas atacan a todo tipo de moléculas biológicas (lípidos, carbohidratos, proteínas y DNA), como consecuencia se originan nuevos radicales libres que pueden iniciar una serie de reacciones en cadena, que continúan hasta que éstos son eliminados tras diversas reacciones con otros radicales libres o por la acción del sistema antioxidante, el cual protege a los tejidos de los efectos que ellos producen (Halliwell, 2012b). Se conocen tres tipos de antioxidantes:

- Primarios: previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Como por ejemplo:
  - Enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el  $O_2^{\cdot-}$  en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).
  - Enzima glutatión peroxidasa, convierte el  $H_2O_2$  y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres.
  - Catalasas.
  - Glutatión reductasa.
  - Glutatión S transferasa.
  - Proteínas que se unen a metales (ferritina, transferrina y ceruloplasmina), limitando la disponibilidad de hierro necesario para formar el radical OH.
- Secundarios: capturan los radicales libres, evitando la reacción en cadena, como por ejemplo la vitamina E, Vitamina C, ubiquinol-10, etc.
- Terciarios: reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres, como por ejemplo las enzimas reparadoras del DNA y la metionina sulfóxido reductasa.

### 4.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Las células del SN se encuentran expuestas a una elevada y constante producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno como consecuencia de su elevado metabolismo.

El cerebro de los mamíferos es uno de los órganos más vulnerables a la acción nociva de los ROS debido a su alto consumo de oxígeno. En humanos este consumo es de aproximadamente el 20% del total, por lo que el contenido de oxígeno por unidad de masa tisular es muy alto.

La constante producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ER) se encuentra regulada por un conjunto de proteínas y componentes antioxidantes. Sin embargo el envejecimiento fisiológico y un número de enfermedades neurodegenerativas genéticas y medioambientales afectan a la producción de ER. El estrés generado contribuye a la aparición de mecanismos patogénicos (Bajo-Grañeras et al., 2011).

La peroxidación de los lípidos de membrana debida al estrés oxidativo, se cree que está relacionada con la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas, con el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la epilepsia (Mattson, 1998; Dasuri et al., 2012). Los ROS atacan a los ácidos grasos de las membranas dando lugar a la formación de subproductos aldehídos citotóxicos, estos subproductos modifican a las proteínas y su función. Uno de estos compuestos es el 4-hidroxinonenal (HNE) que ataca a los residuos de cisteínas presentes en las proteínas (Esterbauer et al., 1991). Se ha demostrado que el HNE:

- Causa disfunción mitocondrial en los sinaptosomas corticales de rata (Keller et al., 1997).
- Es un efector de estrés oxidativo en cultivos primarios de hipocampo de rata (Kruman et al., 1997), induciendo apoptosis.
- Mediador de los efectos neurotóxicos del péptido  $\beta$ - amiloide (Mark et al., 1997).
- Produce daños en el transporte de glucosa y glutamato en las motoneuronas de ratón. Éstos preceden a la apoptosis. (Pedersen et al., 1999).
- Modifica a las lipoproteínas de baja densidad (Jurguens et al., 1986; Uchida et al., 1994).

Existen estudios que relacionan la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas con la generación de ROS y RNS asociadas con disfunción mitocondrial. El genoma mitocondrial tiene una participación esencial en la patogenia de estas enfermedades basado en el descenso en la actividad del complejo de la cadena respiratoria, defectos asociados al desequilibrio oxidante-antioxidante (Cumsee y Landshamer, 2006). Esto es debido a que el DNA mitocondrial se localiza próximo a la membrana interna de las mitocondrias, donde se produce la respiración celular y como consecuencia los ROS, siendo el DNA una diana de éstos, pudiendo originar mutaciones en el DNA. Algunas de estas mutaciones repercute en la expresión anómala de proteínas implicadas en la síntesis de ATP, generando más ROS. Esta sobreproducción de ROS puede producir alteraciones bioquímicas y fisiológicas que conllevan a la apoptosis de las células dañadas (Liu et al., 2009).



Existen diversos métodos de inducción de especies reactivas utilizados para el estudio de los mecanismos antioxidantes. Entre ellos encontramos fármacos como el MPTP, el Maneb y el Paraquat, siendo capaces de imitar en organismos modelo, total o parcialmente, los signos y síntomas de procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (Drechsel y Patel, 2008).

#### 4.2. APOLIPOPROTEÍNAS Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Numerosos estudios relacionan a las Apolipoproteínas con el estrés oxidativo. En este sentido, Ganfornina et al., 2008, observaron que al bloquear la función de **Apo D** en cerebro de ratón, se producía un incremento en la sensibilidad al estrés oxidativo y un aumento en los niveles de peroxidación lipídica. Sin embargo, la superexpresión de Apo D humana incrementa la supervivencia y previene el aumento de la peroxidación lipídica. Estos resultados junto con su regulación transcripcional, hacen pensar que la Apo D tiene una función beneficiosa en el control de la peroxidación lipídica.

A su vez, niveles elevados de Apo D, se han asociado con un gran número de patologías, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas. Este incremento en los niveles de expresión se produce también durante el envejecimiento (Rassart et al., 2000; Van Dijk et al., 2006).

Por lo tanto Apo D forma parte de los mecanismos de protección en la regulación del estrés oxidativo (Ganfornina et al., 2008) en el tejido nervioso.

Los estudios realizados sobre el efecto de Apo D en el sistema nervioso muestran que Apo D ayuda a mantener la homeostasis, mediante el mantenimiento de los niveles bajos de peroxidación lipídica, por lo que esta apolipoproteína es necesaria para una respuesta adecuada ante el estrés oxidativo patológico o fisiológico (Sánchez et al., 2006; Ganfornina et al., 2008; Hull-Thompson et al., 2009).

También se ha demostrado que **Apo A VI**, tiene un efecto negativo de la apoptosis por su poder antioxidante. Disminuyendo el estado redox intracelular y por lo tanto, controlando la cascada apoptótica (Spaulding et al., 2006).

Estos efectos han sido también demostrados para otras apolipoproteínas, como es el caso de **Apo E**. Se ha demostrado que en motoneuronas de ratón esta apolipoproteína ejerce un papel protector frente a la apoptosis (Pedersen et al., 2000). Esto se debe a la existencia de tres isoformas de Apo E, que difieren en dos aminoácidos. La herencia del alelo Apo E4, aumenta el riesgo de tener Alzheimer y también puede influir en la patogénesis de otras enfermedades neurodegenerativas. Los efectos neuroprotectores de

estas isoformas podrían ayudar a explicar la relación entre el genotipo Apo E y la susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas.

Anteriormente se ha descrito la acción del HNE sobre las proteínas de membrana, los lípidos y su alteración. Las tres isoformas de Apo E difieren en la presencia de cisteína, la Apo E2 tiene 2 residuos de cisteína, la Apo E3 tiene solo uno y Apo E4 no tiene ninguno (Rall et al., 1982), de manera que HNE atacaría a los residuos de cisteína de Apo E2 y Apo E3. Apo E4 al carecer de cisteína, no sería atacada y en consecuencia el HNE atacará a otras proteínas y lípidos. Mediante una serie de experimentos se ha demostrado que Apo E ejerce una acción protectora frente a la peroxidación lipídica producida por HNE y que esta protección varía en función de la isoforma presente.

### 5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El conocimiento de los mecanismos reguladores del comportamiento de las células neuroepiteliales (precursores neuronales) del cerebro en desarrollo es importante, no solo porque ayuda a comprender la formación del órgano más complejo de nuestro organismo, sino que además permite profundizar en el conocimiento de los mecanismos de control de procesos complejos, como son, el mantenimiento de la población de células indiferenciadas y la supervivencia neuronal, que podrían ser extrapolables en el cerebro adulto.

### 6. HIPÓTESIS.

El fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E) ejerce su acción trófica sobre el neuroepitelio cerebral a través de componentes específicos, como las apolipoproteínas.

### 7. PANTEAMIENTO/OBJETIVOS.

#### 7.1. OBJETIVO GENERAL.

En nuestro estudio pretendemos comprobar si las apolipoproteínas son las principales responsables del proceso de inhibición de la muerte de las células neuroepiteliales por parte del CSF-E.

#### 7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.- Comprobar si las apolipoproteínas detectadas en el CSF-E de pollo y de rata, Apo AI, Apo AIV, Apo B, Apo E están presentes en el neuroepitelio de embriones de ratón, mediante técnicas inmunohistoquímicas, concretamente de inmunofluorescencia. Para ello obtendremos cortes de embriones de ratón de diferentes estadios (9.5 a 13.5 días) y comprobaremos en las diferentes zonas del cerebro, mesencéfalo, romboencéfalo, diencéfalo y telencéfalo, si están presentes dichas apolipoproteínas.

2.- Determinar semicuantitativamente la concentración de apolipoproteínas (Apo AI, AVI, B, E y M) en el CSF-E de embriones de ratón mediante Western-blot, utilizando para su detección anticuerpos comerciales.

3.- Comprobar si estas apolipoproteínas están implicadas en la activación de la supervivencia de las células neuroepiteliales, mediante inmunosupresión de las mismas en cultivos organotípicos.

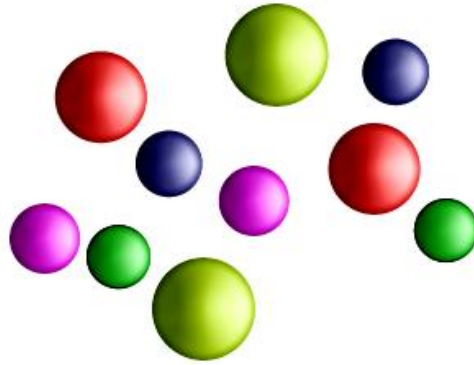
4.- Realizar cultivos organotípicos de neuroepitelio, para tratar de bloquear selectivamente la acción de aquellas que muestren un efecto biológico más específico.

En todos los casos se valorará y se cuantificará la presencia de células apoptóticas, detectadas por la técnica de TUNEL y se realizarán marcajes con  $\beta$ 3-Tubulina y BrdU, para tratar de diferenciar si el efecto sobre la apoptosis es independiente de los procesos de replicación y diferenciación celular (BrdU y B-tubulina respectivamente).

Finalmente, la identificación de alguna Apolipoproteína relacionada con apoptosis en células neuroepiteliales nos permitirá seleccionar cepas de ratones transgénicos KO para dichas apolipoproteínas y estudiar en su modelo, el patrón de muerte celular, diferenciación y replicación.



# MATERIAL Y MÉTODOS



*“Comprender las cosas que nos rodean es la mejor  
preparación para comprender las cosas que hay más allá”*

*Hipatia (370-415)*



Para el cumplimiento de los objetivos emplearemos una metodología y diseño experimental que incluye:

## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

En la presente tesis doctoral se ha utilizado el ratón como animal de experimentación.

El ratón es uno de los animales más utilizados en la ciencia experimental por sus especiales características como, su reducido tamaño, su corto periodo de gestación y su facilidad de reproducción dentro del ambiente de laboratorio.

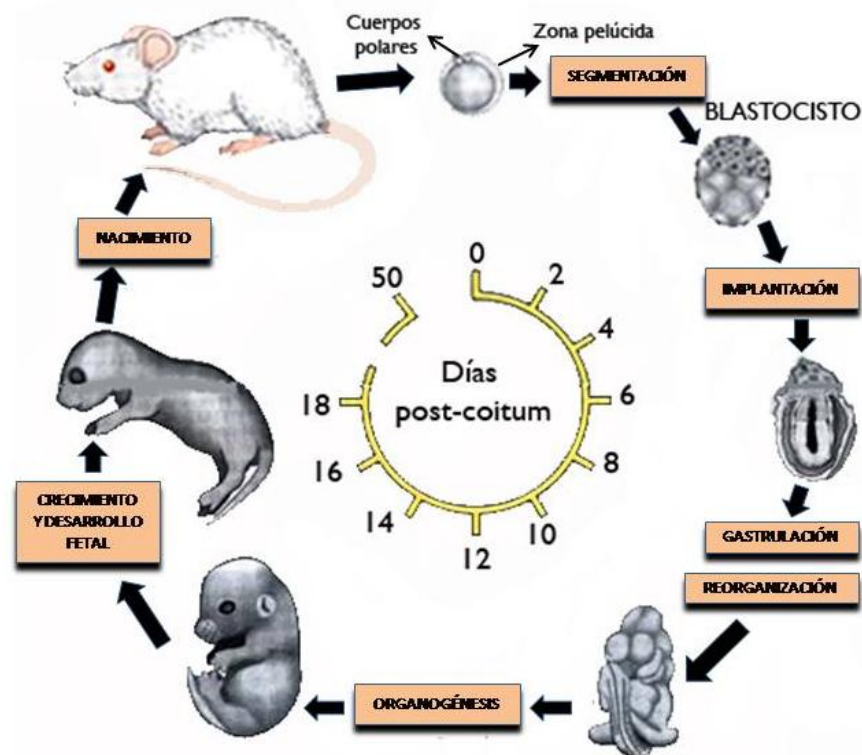


Fig. 25. Ciclo reproductivo del ratón. El oocito es fecundado en el oviducto, donde también tiene lugar la segmentación antes de la implantación del blastocisto en la pared uterina a los cinco días de la fecundación. A continuación tiene lugar la gastrulación y organogénesis durante un periodo de siete días y los seis días anteriores al nacimiento un proceso de crecimiento. (Imagen tomada y modificada de Wolpert et al., 2010).

El ratón se utiliza en todo tipo de investigaciones, incluyendo cáncer, inmunología, toxicología, metabolismo, biología del desarrollo, diabetes, obesidad, envejecimiento y estudios cardiovasculares (Suckow et al., 2001). Además, actualmente se conoce el 100% del genoma de ratón (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002).



En esta tesis se han utilizado 3 cepas de ratones:

- **Cepa Swiss-Webster:** estos ratones derivan todos de un grupo de 9 ratones llevados desde Suiza hacia Estados Unidos por Clara Lynch en 1926. Allí fueron criados en el Rockefeller Institute, Nueva York, desde donde fueron distribuidos a distintos institutos, siempre como ratones exocriados. En la década de 1930, Leslie Webster los pasó a manos de vendedores comerciales, de aquí el origen del nombre Swiss-Webster.

Estos grupos de roedores son los que mejor representan la variabilidad genética de una población humana típica; rasgo que puede ser confirmado al estudiar la frecuencia génica de un grupo de genes (isoenzimas) o el porcentaje de heterocigosis de marcadores moleculares (microsatélites).

Nuestros experimentos han sido realizados con embriones de ratón en diferentes estadios de desarrollo: 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5 días p.c.

- **B6.129P<sub>2</sub>-Apo<sup>tm1Unc</sup>/J:** es una cepa de ratones K.O (Knock-out) para el gen de la apolipoproteína B-100.

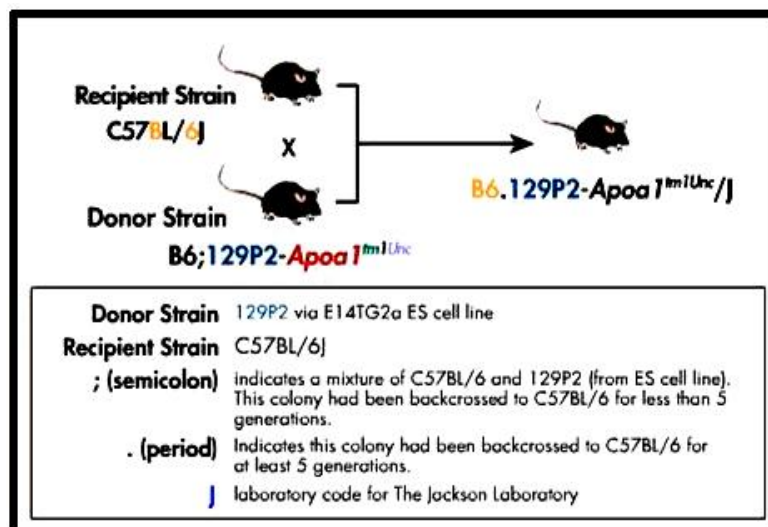


Fig. 26. Obtención de la cepa K.O para el gen de Apo B-100. Imagen tomada de “Mouse gene & strain nomenclature tutorial. The Jacson Laboratory”.

Esta mutación dirigida produce una forma truncada de la apolipoproteína B, denominada Apo B-70 en vez de Apo B-100. La Apo B-48 no se ve afectada.

Los ratones homocigotos para la mutación, muestran una reducción en plasma de los niveles de Apo B, beta-lipoproteínas y del total del colesterol. También tienen una elevada incidencia de exencefalia e hidrocefalia. Los ratones heterocigotos muestran un pequeño incremento sobre los wildtype en la incidencia de hidrocefalia.

El mantenimiento de la colonia se ha realizado mediante cruzamientos entre una hembra o un macho heterocigoto con un macho o hembra wildtype. Debido a esto, para determinar que ratones eran heterocigotos y cual wildtype, hemos tenido que genotipar a todos los descendientes.

- **C57Black/6J:** es una cepa endogámica, utilizada principalmente en procesos de manipulación genética para el estudio de enfermedades humanas.

Su pelaje es de color oscuro, casi negro, extremidades finas y talla bastante pequeña.

Tiene un temperamento fácilmente irritable, siendo más agresivos que la cepa Swiss.

Esta cepa ha sido utilizada para cruzarla con los ratones KO anteriormente descritos.

Los ratones utilizados en este estudio se encuentran emplazados en un animalario, sometidos a un ciclo alternante de luz-oscuridad controlado (14/10h) y en unas condiciones óptimas de temperatura (20-24°C) y humedad (45-55%). Estas condiciones ambientales, facilitan la estabilidad de los biorritmos de los animales, mejorando sensiblemente los resultados del apareamiento.

Para controlar el estadio de desarrollo con la mayor exactitud posible, se trasladan tres hembras a la jaula del macho al inicio del ciclo de oscuridad y 12-14 horas después, se separa a los machos y se determina la preñez mediante la observación de la presencia del denominado “tapón vaginal”, un tapón de color blanco amarillento de consistencia semidura en la parte externa de la vagina. En algunas ocasiones este tapón puede localizarse en el interior de la vagina, por lo que es necesario abrirla ligeramente para poder observarlo. Las hembras que presentan dicho tapón, se consideran preñadas y se separan, anotando como hora de inicio del desarrollo embrionario las 0 horas de la noche anterior; el tiempo de desarrollo se expresa en días y horas post-coitum desde ese momento.



*Fig. 27. Hembras preñadas de 11.5 días.*

## 2. OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN.

Transcurrido el tiempo de gestación previsto (9.5, 10.5, 11.5, 12.5 y 13.5 días p.c.), se procede a la obtención de los embriones. Para ello se anestesia a la hembra preñada por inhalación de éter etílico hasta comprobar la pérdida de mecanismos reflejos y la relajación muscular.

Posteriormente se realiza una amplia laparotomía media, se identifica y se procede a la extracción quirúrgica de los dos cuernos que forman el útero del ratón (el útero grávido presenta un aspecto arrosariado con múltiples engrosamientos, cada uno de éstos corresponde con el lugar de implantación de un embrión), separándolo de la vagina y el peritoneo. El número total de embriones por ratona preñada, oscila como media entre 9 y 15 embriones. El tamaño y grado de desarrollo de cada uno de los embriones varía en función de su posición dentro del cuerno uterino (McLaren 1965). Inmediatamente después se sacrifica a la madre por dislocación cervical.

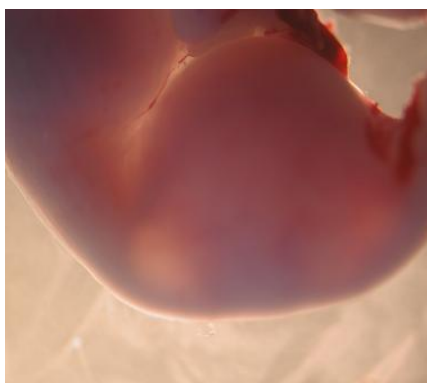
Cada uno de los engrosamientos uterinos se aísla con microtijeras en una placa con solución de Hank (solución isotónica, tamponada, similar al líquido amniótico en el que se encuentran los embriones). La composición de ésta es la siguiente:

COMPOSICIÓN	CANTIDAD
CINa	0,14 M.
ClK	5,36 mM
Cl <sub>2</sub> Ca	1,26 mM
Cl <sub>2</sub> Mg-6H <sub>2</sub> O	4,91 mM
SO <sub>4</sub> Mg-7H <sub>2</sub> O	4,06 mM
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	4,41 mM
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	5,09 mM
CO <sub>3</sub> HNa	4,16 mM
Glucosa	5,55 mM
pH	7,2

Tabla 1. Composición del líquido de Hank.

A continuación, bajo lupa, se procede a la extracción de los embriones de cada engrosamiento uterino; para ellos sujetamos cada engrosamiento por uno de los cuernos con unas pinzas de relojero y con unas tijeras se realiza un corte superficial, obteniendo por un lado el miometrio y endometrio y por otro el embrión dentro de la bolsa vitelina, rasgamos la membrana vitelina y el amnios parietal y se corta la unión vascular a la

placenta. Eliminamos el amnios y trasladamos los embriones limpios a una placa de Petri con solución salina de Hank.



*Fig. 28. Engrosamiento Uterino.*



*Fig. 29. Embrión 11.5 días p.c.*

Una vez liberados los embriones se procede a clasificarlos según su grado de desarrollo mediante una serie de parámetros morfológicos descritos por Brown y Fabro, 1981.

### **3. GENOTIPADO DE RATONES.**

El genotipado, o genotipificación, es un proceso mediante el cual se determina el genotipo o contenido genómico específico de un organismo biológico, mediante un procedimiento de laboratorio. Se utiliza para determinar la información genética de un organismo, o genotipo, y poder diferenciarlo del resto.

En nuestro caso la descendencia procedente de los cruces realizados entre ratones heterocigotos KO y wildtype, dará origen a individuos wildtype y heterocigotos para nuestro gen, por lo que es necesario genotipar a todos los descendientes para realizar los sucesivos cruces, tanto para mantener la colonia como para la extracción de los embriones y su posterior análisis.

#### **3.1. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO.**

Para el genotipado del alelo ApoB-100, se procedió en primer lugar a la obtención del DNA genómico de la cola de los ratones, obteniéndose fragmentos de cola de 3-5 mm. Con un bisturí estéril y bajo campana de flujo laminar, se practicó un corte en el extremo distal de ésta y se procedió a la digestión de dichos fragmentos con 750  $\mu$ l del tampón de lisis (Tabla 2) que contenía 1.25  $\mu$ l del enzima Proteinasa K 20mg/ml (Promega). El proceso de digestión se realizó durante toda la noche en la incubadora para eppendorf (Thermo Shaker TS-100, BIOSAN) a 55°C y a 800 rpm. Posteriormente se le añadió al tubo 250  $\mu$ l de NaCl 5M y se mantuvo durante cinco minutos en la incubadora a 37°C y en agitación a

800 rpm, a continuación centrifugamos a la máxima velocidad (13200 rpm) durante diez minutos con el fin de precipitar los fragmentos de tejido no digerido. Recogemos el sobrenadante de la zona intermedia, añadimos isopropanol, el cual precipita el DNA y se mezcla en la incubadora durante 2 minutos. Por último desecharmos el sobrenadante y lavamos con etanol al 70%, desecharmos de nuevo el sobrenadante y añadimos 100 µl de agua para PCR e incubamos durante 2 horas a 37°C a 300 rpm.

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL	CONCENTRACIÓN STOCK	VOLUMEN STOCK
Tris- HCl pH 8	50 mM	1M	2.5 ml
EDTA	100mM	0.5 M	10 ml
NaCl	100 mM	1M	5ml
SDS	1%	5%	10 ml
H <sub>2</sub> O destilada			22.5 ml

Tabla 2. Composición del tampón de lisis.

### 3.2. ANÁLISIS DE ALELOS MUTANTES MEDIANTE PCR USANDO CEBADORES ESPECÍFICOS.

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction, es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de DNA. Su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar, con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el DNA amplificado.

Los pasos de la PCR son los siguientes:

1. Desnaturalización del DNA, se realiza por calentamiento, la T<sup>a</sup> se encuentra determinada por la proporción de G≡C.
2. Alineamiento del cebador o primers, en este paso los primers se unen a la secuencia complementaria del DNA molde. Si las secuencias son complementarias

se forman puentes de hidrógeno estables, se une la polimerasa y se empieza a sintetizar la cadena molde.

Los cebadores o "primers" suelen ser un oligonucleótido corto de alrededor de 20-25 bases de longitud, necesarios para que la ADN polimerasa I comience a añadir nucleótidos por el extremo 3' OH. Actúan como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

3. Elongación, en esta paso la polimerasa comienza a sintetizar la cadena complementaria.

Estos pasos se repiten durante varios ciclos, dependiendo de la molécula o segmento de DNA que se vaya a amplificar.

Los primers utilizados para los alelos de Apo B 100 han sido los siguientes:

Primer	5' label	Sequence 5'→3'	3' Label	Primer Type
oIMR0569	-	CAC CTC CTG TCC AAG CCG CCT ATCA	-	Mutant
oIMR0570	-	CAGATA TAC ATT GGC TTC ATT GGCA	-	Common
oIMR0571	-	GCAGTACAA ATTAGAGGGAAC ATCA	-	Wild Type

El protocolo seguido es el indicado por la Jackson, para detectar si el individuo es heterocito, homocigoto o wild-type para el gen de Apo B 100. Por lo tanto, tenemos que hacer dos PCR diferentes, ya que las bandas, tanto del mutante como del wild-type tienen el mismo tamaño, 400 pb.

Para el mutante, se añaden los primers tipo mutante y común y para los wild-type se añaden a la solución los primers tipo comun y wild-type.

Los parámetros utilizados en los ensayos de PCR fueron:

PASOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO	NOTAS
1. DESNATURALIZACIÓN	94	1.5 min	-
2. DESNATURALIZACIÓN	94	30 sec	-
3. HIBRIDACIÓN	63	30sec	-
4. ELONGACIÓN	72	30sec	Repetir los pasos 2-4, 35 ciclos
5. ELONGACIÓN	72	2 min	-
6. PARO	10	-	Guardar

Tabla 3. Pasos y parámetros para la PCR.

### 3.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Para la observación de las bandas se procede a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE (Tris Borato-EDTA). Una vez preparado el gel y todavía en estado líquido se le añade 10 µl de GelRed Nucleic Acid Stain (Bio Tium). El Red Gel es un marcador de ácidos nucleicos que sustituye al bromuro de etidio y no es cancerígeno.

En cada pocillo del gel se cargan 10 µl de la muestra, 4 µl de H<sub>2</sub>O destilada y 1 µl del colorante BlueOrange 6X Loading Dye.

En uno de los pocillos se carga un marcador que sirve para determinar el tamaño de nuestras bandas. Cargamos 15 µl de la solución del marcador formada por 5 µl del marcador [100bp DNA ladder (Pronadisa)], 10 µl de H<sub>2</sub>O d y 1 µl de Blue Orange.

Una vez cargados los pocillos, iniciamos la electroforesis a 80 voltios durante una hora aproximadamente.

La lectura del gel se realiza en el lector de geles, UVITEC, Cambridge, con luz ultravioleta.

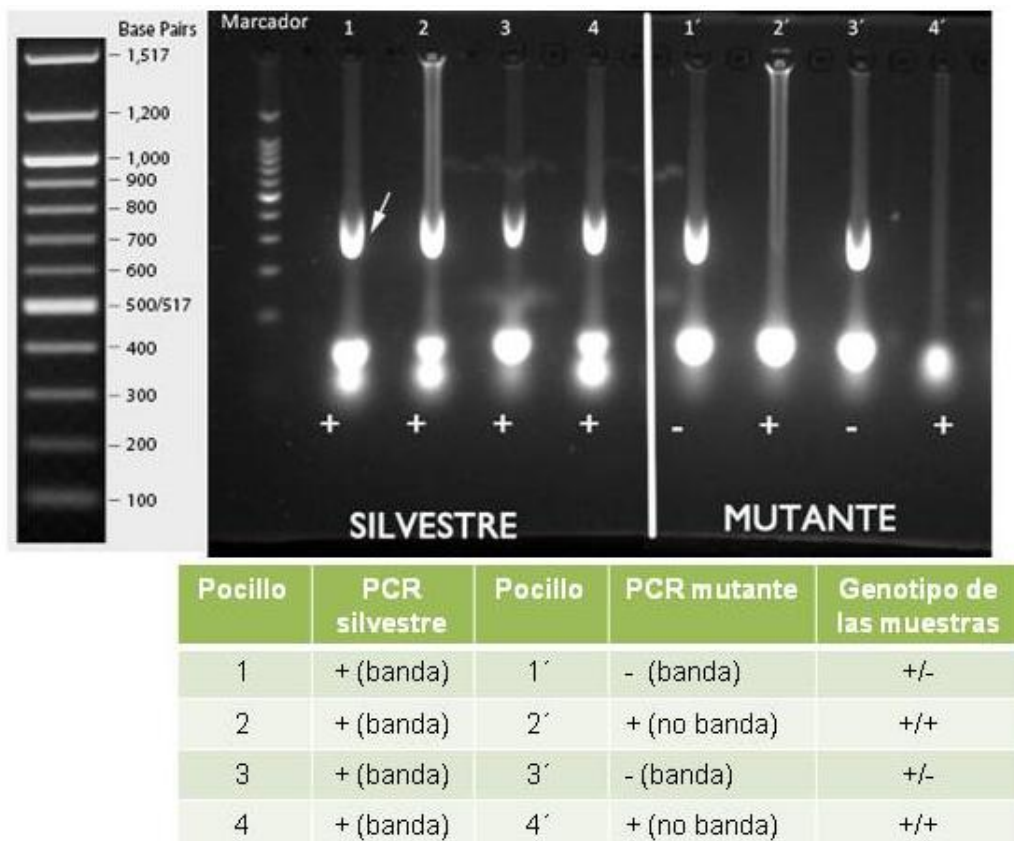


Fig.30. Marcador y gel cargado con DNA de ratón adulto. En los cuatro primeros pocillos, se cargaron las muestras de la PCR realizada con los primers Apo B común y wildtype y en los siguientes la realizada para Apo B común y mutante. La tabla indica la presencia de banda en cada una de las PCR realizadas y el genotipo correspondiente para cada una de las muestras de la imagen.

#### 4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO (CSF-E) DE RATÓN.

Las muestras de CSF-E necesarias para este estudio se han obtenido mediante microaspiración directa de la cavidad cerebral embrionaria de embriones de ratón de estadio 11.5 días. El procedimiento para la obtención de las muestras consiste en liberar a los embriones de sus membranas externas y, tras depositarlos en seco sobre una placa de Petri, localizar por transiluminación las vesículas cerebrales. Con ayuda de micromanipuladores apropiados (Leitz), se inserta una micropipeta biselada de aproximadamente 40-60 micras de diámetro en el centro de la cavidad rombencefálica y utilizando la presión de vacío de un microinyector PLI-100, Medical Systems Co (15 kPA), se aspira lentamente el CSF-E evitando en todo momento el contacto con las paredes del cerebro embrionario que podrían contaminar la muestra. El CSF-E obtenido se mantiene a 4°C y se liofiliza inmediatamente para evitar la degradación proteica en tanto se almacena a -40°C hasta su uso.



Fig. 31. Micromanipulador.



Fig. 32. Microinyector.

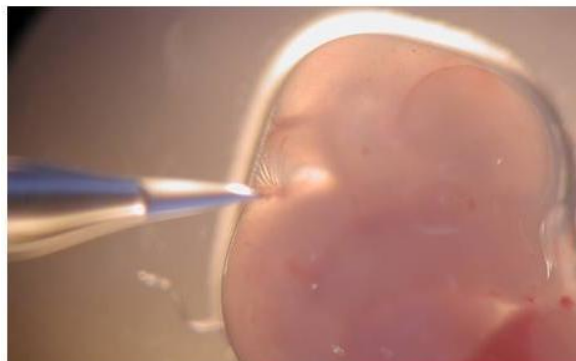


Fig. 33. Extracción de CSF-E de rombencéfalo de embriones de ratón de 11,5 días.



### 5. FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES.

Una vez obtenidos los embriones, procedemos a su fijación. Los pasos a seguir son los siguientes.

1. Fijación con Carnoy, cuyo objetivo es preservar la estructura celular y tisular, de modo que ésta se mantenga lo más parecida posible a la estructura in-vivo. La composición de la mezcla utilizada es la siguiente:

- Alcohol absoluto, 60 %.
- Cloroformo, 30 %.
- Ácido acético glacial, 10 %.

2. Deshidratación y aclaramiento.

2.1. Deshidratación, durante este proceso la muestra es sometida a baños sucesivos en alcoholes de graduación creciente, de modo que la deshidratación se realice paulatinamente, evitando la retracción de los tejidos. Dadas las características alcohólicas del fijador, comenzamos por alcoholes de bajo contenido acuoso (96%) intercambiándose posteriormente por alcoholes de 100°.

La duración de los pases en cada uno de los alcoholes varía en función del estadio del embrión.

2.2. Diafanización o aclaración, consiste en la impregnación del material con un solvente del medio de inclusión. El producto empleado en este paso se denomina "líquido intermediario", y debe de ser miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión.

En nuestro caso hemos utilizado Xilol (dimetilbenzol) y se realiza mediante dos pases sucesivos del embrión por xilol puro. La duración de los pases varía en función del estadio del embrión.

3. Inclusión en parafina y realización de bloques.

3.1. Impregnación con el medio de inclusión, en este paso se coloca al embrión directamente en el medio de inclusión, parafina y se mantienen en el interior de una estufa graduada entre 58 y 60° C (temperatura a la que se funde la parafina), durante 2 horas aproximadamente. No conviene prolongar excesivamente este paso ya que incrementan los fenómenos de retracción, endurecimiento de los tejidos y puede deteriorar antígenos importantes.

3.2. Inclusión definitiva de la pieza.

Una vez incluida la pieza se procede a la realización de los bloques. Para la confección del bloque se utilizan moldes donde se coloca el medio de inclusión fundido.

Bajo lupa se orienta el embrión en la posición deseada, en este caso transversalmente, se identifica el material y se deja enfriar a temperatura ambiente.

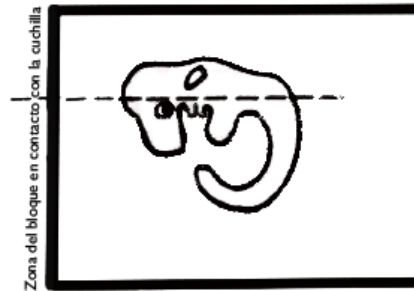


Fig.34. Orientación Transversal del embrión en el bloque de parafina.

4. Obtención de cortes seriados.

Los embriones colocados en parafina, son cortados seriadamente a 8µm. de grosor, con un micrótomo Leitz W 1512.

Las series de cortes fueron colocadas sobre portas, impregnados de una solución al 4% de 3-Aminopropyl Triethoxy Silane (SIGMA) en acetona pura, para mejorar la adherencia de los cortes. A continuación se dejaron secar a 37°C al menos durante 12 horas antes de proceder a su utilización.

## 6. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO CON MICROSCOPIA ÓPTICA.

Los colorantes utilizados en las tinciones para microscopía óptica, se disuelven en un medio acuoso, por lo que los cortes seleccionados deben de ser desparafinados y rehidratados antes de teñirlos.

El proceso seguido es el siguiente:

Xilol 1	-----	15 minutos.
Xilol 2	-----	15 minutos.
Alcohol 100°	-----	10 minutos.
Alcohol 100°	-----	10 minutos.
Alcohol 96°	-----	10 minutos.
Alcohol 80°	-----	10 minutos.
Agua destilada	-----	5 minutos.

Una vez desparafinados, hidratados y bien lavados los cortes, se mantienen durante 20/25 segundos en Hematoxilina de Harris (Merck).

Pasado este tiempo de tinción se elimina el exceso de colorante y se dejan en agua corriente entre 5 y 20 minutos, para que viren de color.

La Hematoxilina actúa como un colorante básico, es decir, tiende a ser captado por los compuestos ácidos. En la célula va a teñir principalmente los ácidos nucleicos y por lo tanto, la cromatina o los cromosomas del núcleo.

Posteriormente se tiñen con Eosina amarillenta, para lo cual se sumergen rápidamente en una solución acuosa de dicho colorante al 1% entre 30 segundos y un minuto.

La eosina es un colorante ácido, por lo que tiende a ser captado por compuestos básicos. Por lo tanto esta segunda tinción nos sirve de contraste de fondo y permite visualizar los citoplasmas y aquellas estructuras que presentan acidofilia.

A continuación se sacan los cortes de la eosina y se lavan bien en agua destilada, 3 lavados de 5 minutos cada uno, para eliminar el exceso de ésta.

Una vez realizada la tinción y lavado de los cortes se procede a la deshidratación de los mismos en alcoholes de graduación creciente.

Alcohol al 80% .....10/15 segundos.

Alcohol al 96% .....2/3 minutos.

Alcohol al100%..... 10 minutos.

Alcohol al100% ..... 10 minutos.

Xilol I .....3 segundos.

Xilol II ..... 10 minutos.

Xilol III .....10 minutos.

En los alcoholes de menor graduación se deja menos tiempo, ya que la eosina es un colorante acuoso y se pierde.

Por último se efectúa el montaje de los portas con Eukitt y se colocan en una estufa a 37°C durante 12/24 horas.

## 7. ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) Y WESTERN-BLOT.

Para identificar las diferentes apolipoproteínas sobre una muestra de CSF-E de ratón de 11.5 días de desarrollo, se realiza la técnica de Western-blot.

Esta técnica, también llamada "immunoblotting" debido a que se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés, fue descrita por primera vez por Towbin et al., en 1979.

El primer paso es la separación de las macromoléculas mediante geles de electroforesis, en este caso en geles de acrilamida. A continuación las macromoléculas ya separadas, en función de su diferente peso molecular, se transfieren a una segunda matriz, generalmente a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana se bloquea, para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. En el siguiente paso, se une a dicha proteína un anticuerpo específico, marcado con una enzima y, finalmente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como, por ejemplo, un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana. La intensidad de la señal se correlaciona de forma semicuantitativa con la cantidad de antígeno en la superficie de la membrana.

En este caso hemos utilizado el método indirecto de detección. Nuestros anticuerpos primarios sin marcar reaccionan con los antígenos. A continuación, añadimos un anticuerpo secundario que se une al primario y reacciona con el sustrato.

### 7.1. PREPARACIÓN DEL GEL.

Los geles empleados son geles de poliacrilamida, ya que constituyen un medio de soporte excelente para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N, N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros. Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis"), probablemente la más utilizada es la

modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), éstas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente en base a sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa (B. Lomonte y Rojas, 1995).

En este caso hemos utilizado geles preparados de Bio-Rad del 4-20% (Mini-PROTEAN® TGX™).

Para una de las apolipoproteínas hemos tenido que realizar geles al 4% para ello:

Preparación del Gel Separador.

El gel separador se elabora diluyendo en agua bidestilada un mezcla de acrilamida/ bis-acrilamida al 30%, SDS como emulsionante y tampón Tris-HCl, 1.5 M a pH 8.8. Como agentes gelificantes se emplean persulfato amónico y TEMED. La mezcla se vierte entre dos cristales de electroforesis con el fin de obtener una lámina de gel de 0.5 mm de grosor. La proporción de acrilamida incluida en la mezcla nos da un tamaño de poro adecuado para detectar la apolipoproteínas B-48 y B-100.

COMPOSICIÓN	PORO 4%
Acrilamida/bis-acrilamida	1,2 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	6,2 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 µl

*Tabla 4. Composición del gel separador.*

Preparación del Gel Apelmazador

Sobre el gel separador se vierte el gel apelmazador, que se elabora diluyendo en agua bidestilada una mezcla de acrilamida/bis-acrilamida al 4%, SDS como agente emulsionante y tampón Tris-HCl. 1.5M a pH 6.8. Como agentes gelificantes se emplean persulfato

amónico y TEMED. El tamaño de poro es mucho mayor y su función es compactar todas las proteínas de la muestra antes de su separación electroforética.

COMPONENTES	TAMAÑO DE PORO 4%
Acrilamida	0.65 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	3.05 ml
Tris-HCl	1.25 ml
SDS	50 µl

Tabla 5. Composición del gel apelmazador.

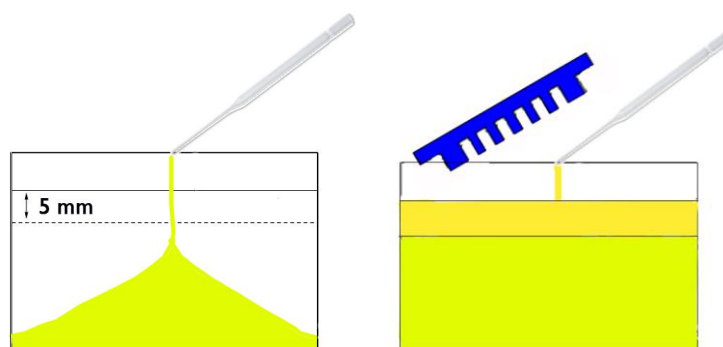


Fig. 35. Gel separador y gel apelmazador.

## 7.2. ELECTROFORESIS.

Previamente a la separación electroforética, tanto a las muestras como a los estándares (sirven de referencia), se les añade el tampón de muestra Laemmli (Biorad®) adicionado con un 5% en volumen de 2-β-mercaptoetanol, para equilibrar las cargas eléctricas de las muestras, en proporción 1:1. Inmediatamente después, las alícuotas se calientan en un baño de agua a 95°C durante 4 minutos y se cargan en el gel. De esta manera, las proteínas de las muestras quedan desnaturalizadas y sus cargas eléctricas equilibradas, por lo que la separación electroforética depende exclusivamente del peso molecular de cada una.

Para la electroforesis bidimensional seguimos en el laboratorio el protocolo de Biorad® para SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS). El gel se coloca en el cassette, que a su vez se encuentra situado en un nivelador. Comprobamos que está bien colocado y apretamos los tornillos del cassette. Éste se coloca en el porta-cassette y el conjunto dentro de la cubeta y se vierte el Buffer de electroforesis (Biorad®):

- 30 ml de Buffer Tris-Glicina (10x).
- 270 ml de H<sub>2</sub>O desionizada.

Se cargan las muestras y los estándares en los pocillos con ayuda de una micropipeta y se procede a su separación aplicando una corriente eléctrica continua de 150 voltios durante 45 minutos.

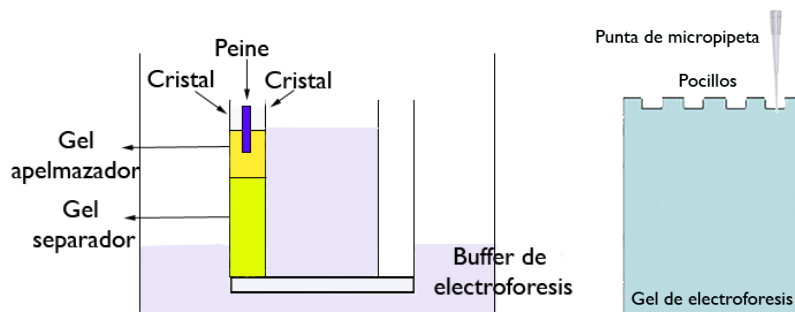


Fig. 36. Montaje de la cubeta de electroforesis y cargado de muestras.

### 7.3. TINCIÓN DE PLATA.

Para comprobar que la electroforesis se ha llevado a cabo correctamente y para visualizar las bandas obtenidas, se realiza la tinción de plata, siguiendo el protocolo y los materiales de Biorad®.

Al finalizar la electroforesis, los geles se introducen en una cubeta con la mezcla fijadora y posteriormente se pasan a un segundo fijador. A continuación se incuban con un agente oxidante durante 5 minutos, se realizan tres lavados en agua desionizada de 5 minutos cada uno y se mantienen durante 20 minutos en el reactivo de plata. Se realiza un lavado en agua bidestilada de unos 40-60 segundos y se procede al revelado. El revelador se diluye al 3.2 % en agua bidestilada. Al alcanzar la intensidad de tinción deseada, el revelado se para con una solución de ácido acético al 5% en agua bidestilada. Los geles se envuelven en celofán y se desecan en una estufa de aire caliente (GelAir Drying System, Biorad®) para su conservación.

La composición de los productos utilizados es la siguiente:

FIJADOR 1	FIJADOR 2	OXIDANTE	REACTIVO DE PLATA
Metanol (80 cc.)	Etanol (20 cc.)	Reactivo oxidante (10 cc.)	Reactivo de plata (10 cc.)
Ac. Acético glacial (20 cc.)	Ac. Acético glacial (10 cc.)	H <sub>2</sub> O bidestilada (90 cc.)	H <sub>2</sub> O bidestilada (90 cc.)
H <sub>2</sub> O bidestilada (100 cc.)	H <sub>2</sub> O bidestilada (175 cc.)		

Tabla 6. Composición de los productos utilizados en la tinción de plata.

## 7.4. TRANSFERENCIA.

A continuación, se realiza una transferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa, ya que en este tipo de membranas es posible realizar técnicas inmunocitoquímicas, utilizando como fuerza impulsora un campo eléctrico. Este método se basa en la movilidad electroforética de las proteínas para transferirlas desde el gel hasta la membrana e implica poner en contacto directo el gel de poliácridamida que contiene las proteínas, con la membrana de nitrocelulosa, formando un sándwich entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel hacia la superficie de la membrana, dónde quedan fuertemente adheridas, por lo que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel.

Una vez realizada la electroforesis, el gel se pasa a un cubeta con tampón de transferencia Tris-glicina (Biorad®). El gel se montó en contacto estrecho con la membrana a modo de sandwich.



Fig. 37. Esquema del sandwich y de la cubeta de transferencia.

La transferencia se realiza aplicando en frío una corriente eléctrica continua de 100 voltios durante 60 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana obtenida se emplea para realizar el western-blot.

## 7.5. WESTERN-BLOT.

La membrana obtenida en la transferencia es tratada con un potenciador de la señal (Qentix™ Western Blot Signal Enhancer, casa comercial Pierce) y a continuación es sumergida en una solución de bloqueo (solución con exceso de proteínas, BSA al 5%) para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo. Tras un lavado con TPBS, se expone la membrana al primer anticuerpo (utilizamos anticuerpos comerciales anti-apolipoproteínas AI, AVI, B, E y M) durante un periodo de tiempo que oscila entre 2 horas a Tª ambiente y 16 horas a 4°C., en función del anticuerpo empleado.



Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución	Extravidina-Peroxidasa	Dilución
anti-Apo B (Acris Antibodies)	1:1000	Goat anti-rabbit IgG- Biotin (SIGMA)	1:1000	0.5 mg/ml SIGMA	1:1000
anti-Apo E (GeneTex)	1:1000	Goat anti-rabbit IgG- Biotin (SIGMA)	1:1000	0.5 mg/ml SIGMA	1:1000
anti-Apo AI (Rockland)	1:1000	Rabbit anti-goat IgG-Peroxidasa. (SIGMA)	1:1000	-	-
anti-Apo AIV (Santa Cruz Biotechnology, INC.)	1:1000	Rabbit anti-goat IgG-Peroxidasa. (SIGMA)	1:1000	-	-
anti- Apo M (Santa Cruz Biotechnology , INC)	1:1000	Rabbit anti-goat IgG-Peroxidasa. (SIGMA)	1:1000	-	-

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en el WB.

Posteriormente se realizan varios lavados en TPBS para eliminar los restos de anticuerpo primario y a continuación se expone la membrana de nitrocelulosa al anticuerpo secundario (Kit comercial Sigma®), que lleva incorporado el enzima peroxidasa. Finalmente, se trata la membrana con diaminobenzidina (DAB), substrato del enzima, que es detectada por su intenso color marrón. El revelado se para mediante varios lavados en agua bidestilada y la membrana se seca al aire y se almacena.

## 8. TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN/ INMUNOHISTOQUÍMICA.

### 8.1. INMUNOFLUORESCENCIA.

Para comprobar si las apolipoproteínas detectadas en el CSF-E, Apo AI, Apo AIV, Apo B y Apo E están presentes en el neuroepitelio de embriones de ratón, se han realizado ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Esta técnica emplea un anticuerpo primario, que reconoce el antígeno que se desea tipificar.

En nuestro caso, hemos utilizado anticuerpos policlonales, anti Apo B, anti Apo E, anti Apo AI y anti Apo AIV.

Todos los anticuerpos son Ig G, obtenidas:

ANTICUERPO PRIMARIO	HOSPEDADOR	ANTICUERPO SECUNDARIO
anti-Apo B (Acris Antibodies) Dilución 1:100	Conejo	Es reconocido por una anti-Ig G de conejo Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit Ig G (Invitrogen). Dilución: 1:1000
anti-Apo E (GeneTex) Dilución: 1:100	Conejo	Es reconocido por una anti-Ig G de conejo Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit Ig G (Invitrogen). Dilución: 1:1000
anti-Apo AI (Rockland) Dilución: 1:100	Cabra	Es reconocido por una anti-Ig G de cabra Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat Ig G (Invitrogen). Dilución: 1:1000
anti-Apo AIV (Santa Cruz Biotechnology, INC.) Dilución: 1:100	Cabra	Es reconocido por una anti-Ig G de cabra Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat Ig G (Invitrogen). Dilución: 1:1000
anti- Apo M (Santa Cruz Biotechnology , INC) Dilución: 1:100	Cabra	Es reconocido por una anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat Ig G (Invitrogen). Dilución: 1:1000

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.

Los anticuerpos secundarios utilizados están conjugados a fluorocromos, concretamente a fluoresceína. Los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas con la energía de una determinada longitud de onda son capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor.

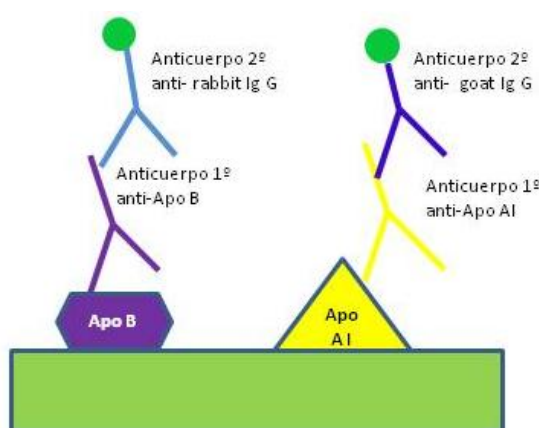


Fig. 38. Esquema de inmunofluorescencia indirecta.

La pauta general del procesamiento de los embriones destinados a la inmunofluorescencia indirecta es la siguiente:

En primer lugar se obtienen los embriones de ratón de diferentes estadios, desde 9,5 hasta 13,5 días. Son procesados, y cortados, según los procedimientos descritos en los apartados 2 y 4. Una vez cortados, seleccionamos aquellas zonas que nos interesen, en concreto el rombencéfalo, mesencéfalo, telencéfalo y diencéfalo. De cada zona vamos a seleccionar 3 portas por apolipoproteína y por estadio.

Los cortes histológicos seleccionados están incluidos en parafina, por lo que debemos desparafinarlos y rehidratarlos antes de realizar la inmunodetección.

Para ello seguimos un proceso inverso a la parafinación, es decir, eliminamos la parafina por dilución en Xilol y a continuación eliminamos el xilol mediante pases sucesivos en alcoholes de graduación decreciente (rehidratación).

- Xilol I .....10 minutos.
- Xilol II .....10 minutos.
- Alcohol 100° .....7 minutos.
- Alcohol 100° .....7 minutos.
- Alcohol 96° .....7 minutos.
- Alcohol 80° .....7 minutos.
- Alcohol 50° .....7 minutos.
- Agua corriente durante 15 minutos.
- Agua destilada durante 5 minutos.

Antes de iniciar las incubaciones con los anticuerpos, se realizan diversas incubaciones y lavados a fin de facilitar la penetración de los anticuerpos y disminuir el marcaje inespecífico. Todas las preincubaciones se realizan en tampón fosfato. En nuestro caso se ha utilizado el PBS (phosphate buffered saline). Una vez desparafinados, hidratados y bien lavados los cortes en agua destilada, se lavan 3 veces en PBS, 5 minutos por lavado.

El bloqueo de uniones inespecíficas, se consigue utilizando una mezcla de PBS+ BSA al 0,1% durante 20 minutos, este paso a su vez disminuye la adherencia del anticuerpo al vidrio.

El siguiente paso es la incubación de los cortes con el anticuerpo primario, para ello utilizamos como medio de incubación el PBS. La dilución del anticuerpo empleada ha sido 1:100. La incubación se realiza en una atmósfera húmeda en una cámara de incubación y se mantiene a 4°C toda la noche.

Es necesario eliminar todo el antisuero no unido al antígeno durante la incubación, para ello se realizan 3 lavados de cinco minutos cada uno en PBS y se procede a la incubación con el anticuerpo secundario, el cual se diluye 1:1000 en el medio de incubación (PBS) y se mantiene 1 hora a temperatura ambiente en la cámara de incubación. En nuestro caso los anticuerpos secundarios utilizados están marcados con fluoresceína, por lo que la incubación se realiza en oscuridad.

Por último, se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno en PBS, para eliminar todo el antisuero no unido al anticuerpo primario.

Para resaltar los núcleos, realizamos una tinción nuclear con Ioduro de Propidio (1:20 000 en agua destilada). Las moléculas de ioduro de propidio se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, tanto del ADN como del ARN. Sus ventajas principales son la facilidad de uso, estabilidad y espectro de absorción/emisión. Se excita con luz en torno a los 480 nm y emite fluorescencia roja (en torno a los 620 nm). A continuación se realiza un lavado en agua destilada y se montan los portas con medio acuoso (Fluoromount, SIGMA).

Los portas son visualizados mediante un microscopio confocal (Leica TCS SPE).

### 8.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR: BrdU, PCNA Y $\beta$ -III-Tubulina.

Los cortes obtenidos de mesencéfalo son desparafinados y rehidratados. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- Tres pases por Xilol de siete minutos cada uno.
- Dos pases por alcohol de 100° de siete minutos cada uno.
- Veinte minutos en agua corriente.

Para el **estudio de la proliferación celular**, mediante **BrdU**, previamente se añaden 10 $\mu$ l de BrdU al cultivo de mesencéfalo y se mantiene durante 1 hora en condiciones de saturación de humedad con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, y a 37°C. A continuación se inicia el protocolo con la desnaturalización del DNA. Para ello, se añade HCl 2N durante treinta minutos a 37°C. Posteriormente, se retira el HCl y se realiza un lavado en agua destilada y tres lavados de cinco minutos con Buffer Tris. Para neutralizar el pH ácido obtenido con el HCl se añade ácido bórico 0,1M a pH 8,5 durante diez minutos, y se realiza un lavado con agua destilada y tres lavados de cinco minutos con Buffer Tris.

Para medir la proliferación celular se utilizó un anticuerpo primario anti-BrdU (Link DAKO monoclonal de ratón), dilución 1:100 en buffer tris y se incubó en cámara húmeda a 4°C toda la noche. El uso de BrdU con respecto a otros marcadores como la timidina tritiada, la iododeoxiuridina o de diferentes proteínas implicadas en el ciclo celular, como es el caso de la PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) y la histona H3 fosforilada, es que la BrdU permite detectar todas las células que se estén dividiendo desde el momento de la aplicación de ésta hasta el fin del cultivo. Además estudios in vitro han demostrado que las células en división tienen una alta tasa de incorporación de BrdU que oscila entre un 99,8% y un 100% (Bick y Davidson, 1974).

A continuación se realizaron tres lavados de cinco minutos con buffer tris y las muestras se incubaron con el anticuerpo 2º (goat anti-mouse, Mouse ExtrAvidin® Peroxidases Staining Kit, SIGMA), dilución 1:20 en Buffer Tris, en cámara húmeda a temperatura ambiente durante treinta minutos. Pasado el tiempo de incubación las muestras se lavaron tres veces durante cinco minutos con Buffer Tris y se procedió a la incubación con ExtrAvidina peroxidasa (Mouse ExtrAvidin® Peroxidase Staining Kit, SIGMA), como sistema de amplificación, a una dilución 1/20. Transcurrido el tiempo de incubación indicado por el fabricante, se llevaron a cabo tres lavados de cinco minutos con Buffer Tris y finalmente se incubaron con Diaminobencidina [DAB (SIGMA)] siguiendo las instrucciones dadas por el proveedor. Una vez obtenido el revelado deseado, se paró con agua destilada y se procedió a la deshidratación y montaje de las muestras con Eukitt.

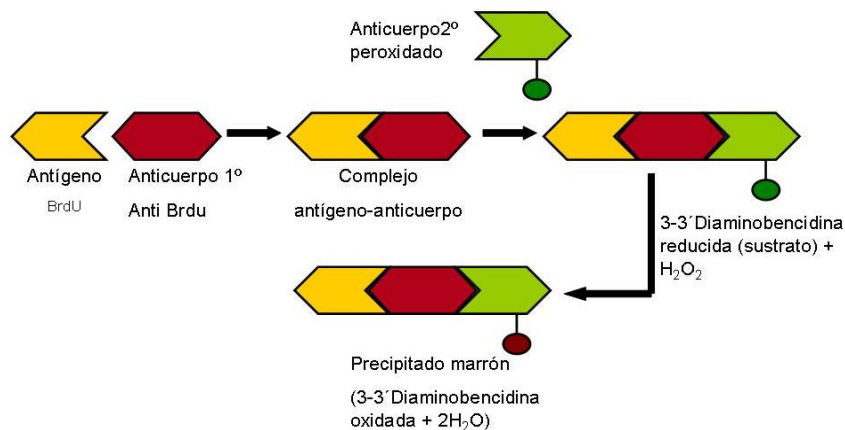


Fig. 39. Esquema de la inmunocitoquímica para BrdU.

En algunos casos la BrdU no puede ser añadida a los cultivos o inyectada a la ratona, en este caso para realizar el estudio de proliferación celular se lleva a cabo otra técnica denominada **PCNA** (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular). El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. Una vez desparafinados y rehidratados los cortes, se realiza

un bloqueo de las uniones inespecíficas con PBS/BSA al 1% durante 20 minutos y se añade el anticuerpo primario human anti-PCNA (Chemicon Europe CBL-407) dilución 1:100 en PBS. Transcurrido el tiempo de incubación se realizan tres lavados con PBS y se añade el anticuerpo secundario (goat anti-mouse, Mouse ExtrAvidin<sup>®</sup> Peroxidase Staining Kit, SIGMA) dilución 1:50 en PBS, durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se procedió a la incubación con ExtrAvidina peroxidasa (Mouse ExtrAvidin Peroxidase<sup>®</sup> Staining Kit, SIGMA), como sistema de amplificación, a una dilución 1:20. Transcurrido el tiempo de incubación indicado por el fabricante, se llevaron a cabo tres lavados de cinco minutos con PBS y finalmente se incubaron con Diaminobencidina [DAB (SIGMA) ]. Una vez reveladas las muestras, se añade agua destilada para parar la reacción, se procede a la deshidratación y montaje con Eukitt.

Para el **estudio de la diferenciación celular** se utiliza como anticuerpo primario Mouse anti-Human IIIB-Tubulina (Covance). Una vez desparafinados y rehidratados los cortes se realiza un bloqueo de las uniones inespecíficas del anticuerpo primario con PBS/BSA al 1% durante 20 minutos y se añade el anticuerpo primario (dilución 1:500 en PBS). Transcurrido el tiempo de incubación (toda la noche a 4°C en cámara húmeda) se realizan tres lavados en PBS de cinco minutos cada uno, se añade el anticuerpo secundario, anti-mouse IgG FITC (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Rabbit anti Mouse IgG, Invitrogen<sup>™</sup>) (dilución 1:1000 en PBS) y se incuba sesenta minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad. A continuación se realizan tres lavados en PBS de cinco minutos cada uno y se procede al montaje con medio acuoso (Fluoromont SIGMA).

### 8.3. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR: T.U.N.E.L.

Para valorar la influencia del cultivo así como de las diferentes condiciones experimentales, sobre la supervivencia celular, se emplea la detección de células apoptóticas mediante la técnica de T.U.N.E.L. Esta técnica se basa en la marcación del UTP final, mediada por el enzima TdT (transferasa deoxinucleotidil terminal). El TdT media la incorporación catalítica de fluoresceína 12-dUTP en el extremo final 3'-OH, formando una cola polimérica de fluoresceína 12-dUTP. El extremo 3'-OH libre se produce como consecuencia de la acción de las endonucleasas, las cuales se encargan de fragmentar el DNA dando lugar a fragmentos de DNA entre 180-200 pb.

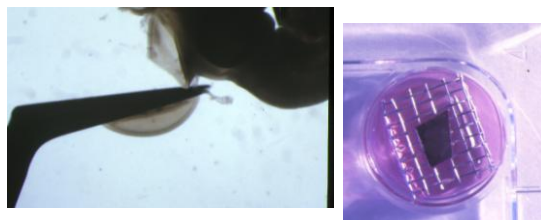
La técnica se realiza con un kit comercial (DeadEnd<sup>™</sup> FluorometricTUNELSystem), Promega) siguiendo las especificaciones dadas por el proveedor.

El primer paso es la rehidratación de los portas, a continuación se trata con NaCl al 0.85% para mantener el pH, ya que al añadir el formol al 4% como fijador podría variar el pH, desnaturalizar más el DNA y obtener falsos positivos. Entre ambos pasos los portaobjetos se lavan con PBS. Una vez fijados, se tratan con el buffer de equilibrio y a continuación se añade el nucleótido, el enzima TdT y el buffer de equilibrio.

En éste paso hay que evitar la luz, ya que el 12-UTP (nucleótido) viene conjugado con fluoresceína. Los cortes se incuban en cámara húmeda a 37°C durante cuatro horas. Transcurrido ese tiempo, los portaobjetos son pasados a SSC, que es un buffer de equilibrio que neutraliza la acción del enzima, se lavan con PBS y agua destilada y se montan con medio acuoso.

### 9. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEUROEPITELIO.

Se basa en una técnica estandar de cultivo organotípico “in vitro” de estructuras embrionarias (método de Trowell) adaptada por nosotros al cultivo de pared del cerebro embrionario (neuroepitelio). Esta técnica



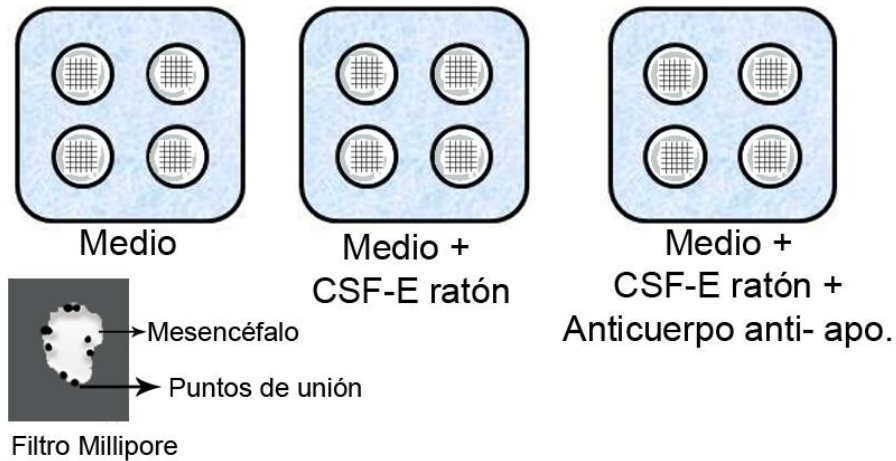
consiste en la microdissección de un casquete del mesencéfalo, que incluye sus regiones laterales y dorsal, previa disección del ectodermo superficial y eliminación por disección roma del mesénquima subyacente. Dicho fragmento de neuroepitelio se fija por su superficie apical a un papel de filtro Millipore, que se deposita sobre una rejilla que a su vez está en contacto con un medio de cultivo definido (DMEM-F12 suplementado con ácido ascórbico), evitando la inmersión del tejido en el medio. El cultivo se mantiene en condiciones de saturación de humedad con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, y a 37°C. En nuestra experiencia este método de cultivo de neuroepitelio es viable y comparable a los controles, al menos, durante un período de 72 horas.

Con esta técnica realizamos cultivos de neuroepitelio de embriones de 11.5 días de desarrollo, en medio definido, es decir libre de toda influencia ajena al propio neuroepitelio, lo que según nuestros datos previos, conduce a la apoptosis de un número elevado de células y al cese de los procesos de replicación y diferenciación de las células madre neuroepiteliales. Este efecto se revierte hasta valores normales cuando se añade CSF-E al medio.

Para evaluar el efecto de las apolipoproteínas presentes en el CSF-E, bloqueamos su acción añadiendo a una de las tres condiciones de cultivo un anticuerpo anti-apolipoproteína correspondiente a la apolipoproteína que queremos estudiar. Para ver el

efecto que tiene el bloqueo de la apolipoproteína correspondiente se llevan a cabo técnicas inmunohistoquímicas de valoración de supervivencia, replicación y diferenciación (TUNEL, BrdU y  $\beta$ -tubulina).

En este estudio las condiciones del cultivo han sido las siguientes:



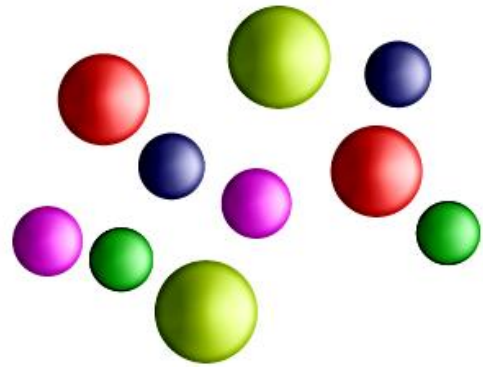
Para poder valorar la proliferación celular, a cada uno de los pocillos, transcurridas las 72 horas, se les añade BrdU y se incuban durante una hora en las mismas condiciones del cultivo.

Las muestras son fijadas en carnoy, deshidratadas e incluidas en parafina, como se ha descrito previamente, para su posterior estudio.





# RESULTADOS



*"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo"*

*Albert Einstein*



## 1. ELECTROFORESIS Y TINCIÓN DE PLATA.

La mayor parte de datos de la composición del CSF-E provienen de embriones de pollo y en menor medida de rata (véase capítulo correspondiente de la introducción). Para valorar las similitudes y diferencias entre el CSF-E de ratón, rata y pollo, hemos realizado una electroforesis SDS-PAGE y a continuación una tinción de plata. En cada uno de los pocillos se han cargado 15  $\mu$ l de cada una de las muestras + 15  $\mu$ l del buffer de muestra. Como puede observarse en la figura 40, el patrón de bandas del CSF-E de ratón y de rata es muy similar en términos globales, aunque presenta algunas diferencias especialmente en la concentración aparente de algunas fracciones proteicas con respecto al CSF-E de pollo, esto se debe a las diferencias filogenéticas existentes entre los dos grupos (mamíferos y aves).

Podemos asumir por lo tanto que el patrón de bandas del CSF-E de ratón y de rata es muy similar y que por lo tanto las apolipoproteínas presentes en el CSF-E de rata (Parada et al., 2005), pueden estar también presentes en el CSF-E de ratón.

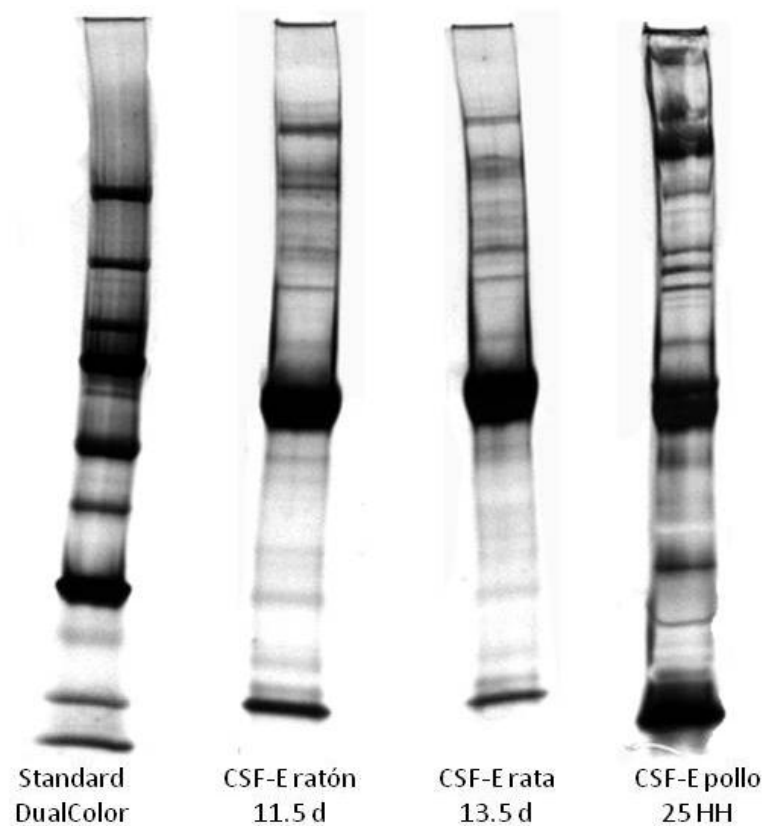


Fig. 40. Comparativa del CSF-E de ratón, rata y pollo respectivamente.

## 2. WESTERN-BLOT.

Para comprobar si las diferentes apolipoproteínas, objeto de nuestro estudio, están presentes en el fluido cerebroespinal embrionario de ratón de 11.5 días de desarrollo, se han realizado diferentes inmudetecciones mediante la técnica de western-blot para cada una de ellas. Los resultados obtenidos demuestran que al igual que ocurría en el CSF-E de embriones de rata, todas las apolipoproteínas estudiadas, Apo B, Apo AI, Apo AIV, Apo E y Apo M, se encuentran presentes el fluido cerebroespinal de embriones de ratón en fases tempranas del desarrollo.

El análisis de los western blot muestra la presencia de bandas inmunorreactivas para los distintos anticuerpos empleados, aunque ocasionalmente presentan pequeñas variaciones con respecto a los pesos moleculares descritos por otros autores, esto se debe principalmente a que la migración puede verse afectada por diversos factores:

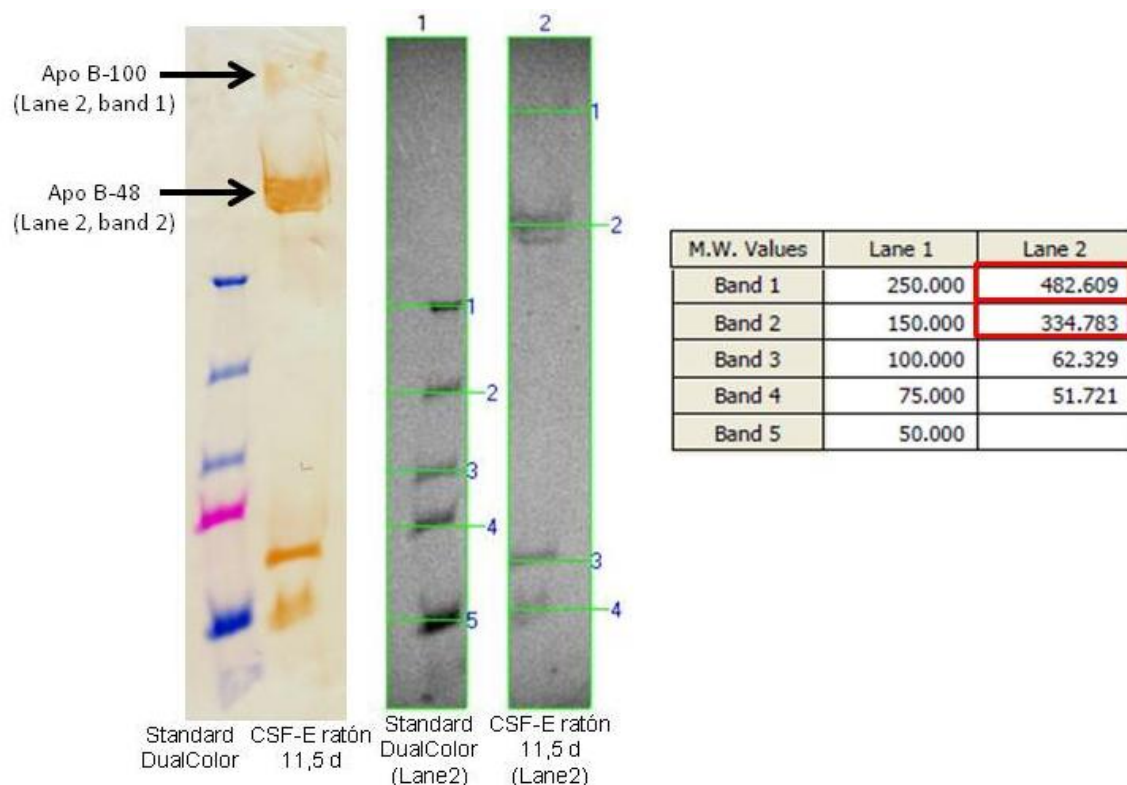
- **Campo eléctrico:** Es un gradiente de potencial que posibilita que haya electroforesis. A su vez, depende de diferentes parámetros. A mayor potencial del campo eléctrico mayor movilidad de las partículas. Dependiendo del método electroforético usado se mantiene constante el voltaje o el amperaje. Si aumentamos el voltaje, aumenta la velocidad de separación, pero también la temperatura, pudiendo aparecer efectos indeseables como: desnaturalización de proteínas, evaporación del buffer y aumento de la fuerza iónica.
- **Tampón:** Durante una electroforesis, se produce una electrolisis del agua por acción del campo eléctrico, lo cual genera protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilo en el cátodo. El tampón es, por esta razón, esencial durante la electroforesis para evitar que el ánodo se acidifique y el cátodo se haga más básico, pero no debe afectar a las moléculas a separar. Además, la fuerza iónica condiciona la movilidad electroforética de las sustancias a separar, ya que influye en su esfera de solvatación y en la conductividad de todo el sistema. Por lo tanto, es necesaria una fuerza iónica suficiente para mantener el pH y la conductividad durante todo el proceso, pero no muy elevada, ya que podría interferir en el sistema. Normalmente, se emplean tampones con fuerzas iónicas moderadas (0.05-0.10M), siendo el pH la característica que debe ser más controlada, puesto que determina la carga de la muestra.
- **Soporte.** La simple presencia del soporte en una electroforesis hace que se presenten una serie de fenómenos de elevada trascendencia para el resultado del proceso:

- Adsorción. Es una retención inespecífica de las moléculas de la muestra sobre el soporte, por lo que afecta negativamente a la resolución, ensanchando las bandas de migración.
- Tamaño de poro. El movimiento de las moléculas a través del soporte es más o menos fácil en función de su tamaño respecto al de los poros; aquellas moléculas cuyo tamaño se aproxime al del poro, verá impedido su avance respecto a aquellas cuyo tamaño sea muy inferior.

## 2.1. APOLIPOPROTEÍNA B 48/100

Para detectar la presencia de Apolipoproteína B, utilizamos un anticuerpo primario Anti Apo B48/100 (Acris, BP2050), que reconoce a las dos isoformas descritas en la literatura, Apo B48 y Apo B100.

Es conocido que Apo B48 tiene un peso molecular de 264 KDa y la Apo B 100 de 516 KDa. Al analizar los pesos moleculares de las bandas con respecto a los estándar (Precision Plus Protein Standard. Dual Color, Bio-Rad) en un lector de geles (UVITEC, Cambridge) y con un programa específico (Essential V2), comprobamos que en el CSF-E de ratón de 11.5 aparecen nítidamente marcadas por el anticuerpo dos bandas de 483 KDa y 335 KDa. Por las razones comentadas al inicio del capítulo, junto con el hecho de que Apo B tiende a formar agregados insolubles en agua, representando un obstáculo para su estudio, y que se han encontrado variaciones ostensibles referidas al peso molecular de la subunidad básica en función de los diferentes métodos de deslipidización y solubilización empleados (Yañez et al., 1975), podemos asumir que se reconocen las dos isoformas de Apo B en el CSF-E de ratón.



*Fig. 41. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo B. La imagen de la izquierda corresponde a la membrana de nitrocelulosa y las dos bandas de la derecha a las imágenes capturadas para el análisis densiométrico. La tabla muestra los pesos moleculares de las bandas del marcador utilizado (Lane 1); los pesos moleculares de las bandas correspondientes al de Apo B aparecen marcados en rojo en la columna Lane 2, band 1 y 2.*

## 2.2. APOLIPOPROTEÍNA AI.

La detección de Apo AI en el CSF-E de embriones de ratón de 11.5 d de desarrollo, se realizó mediante el anticuerpo Anti Apo AI (Rockland, 600-101-196). El revelado con DAB y su posterior análisis con el lector de geles (Essential V2), muestra la presencia de una banda de mayor grosor, de unos 26 KDa (Lane 1, Band 4), que se corresponde con el peso molecular de dicha apolipoproteína, 28 KDa, y de otras tres bandas que posiblemente se corresponden con agregados macromoleculares (polímeros), ya que esta apolipoproteína tiende a formar agregados de dos a cuatro monómeros, dando lugar a moléculas de entre 55 a 113 KDa (Yañez et al., 1975).

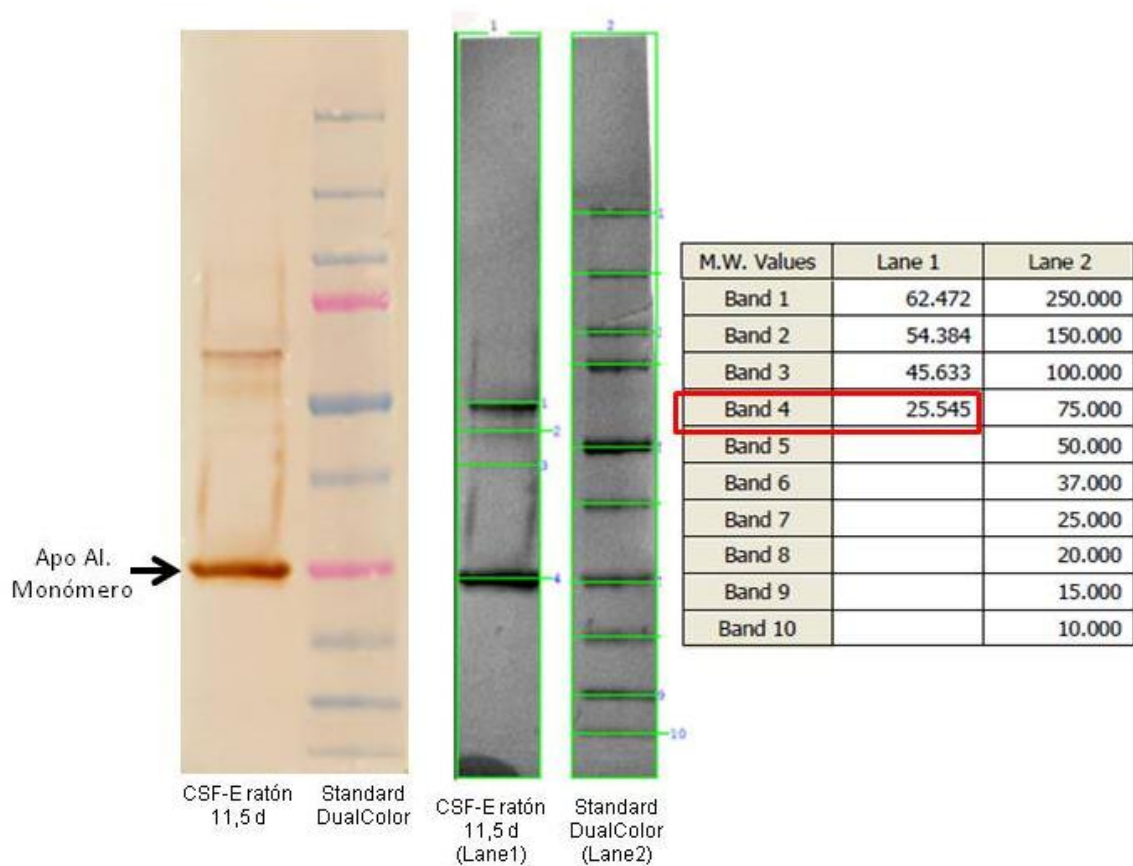


Fig. 42. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo AI. La imagen de la izquierda corresponde a la membrana de nitrocelulosa y las dos bandas de la derecha a las imágenes capturadas para el análisis densiométrico. La tabla muestra los pesos moleculares de las bandas del marcador utilizado (Lane 2); el peso molecular de la banda correspondiente al de Apo AI aparece marcado en rojo en la columna Lane 1, band 4.



### 2.3. APOLIPOPROTEÍNA AIV.

Al igual que en los casos anteriores, para detectar la presencia de Apo AIV en el CSF-E de ratón de 11.5 d de desarrollo, se ha utilizado un anticuerpo Anti Apo AIV (Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-19040)).

El análisis de western-blot revela la presencia de cuatro bandas. La banda 3 tiene un peso de 47 KDa que se correspondería, exactamente, con el peso molecular de Apo AIV de 46 KDa.

El resto de bandas, de concentración prácticamente despreciable, podrían ser agregados moleculares de la misma. La banda de menor peso molecular podría deberse a algún fragmento de Apo AIV, como consecuencia de la degradación de ésta durante el proceso electroforético.

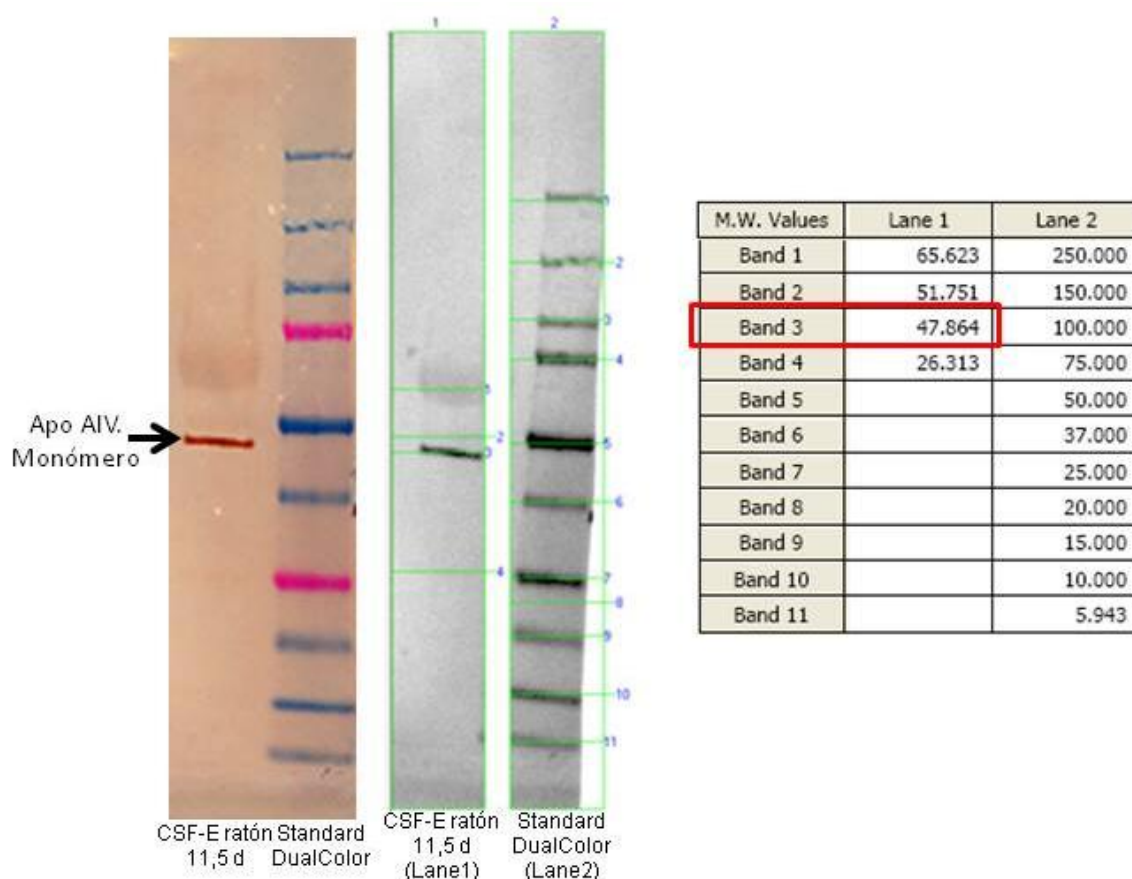


Fig. 43. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo AIV. La imagen de la izquierda corresponde a la membrana de nitrocelulosa y las dos bandas de la derecha a las imágenes capturadas para el análisis densiométrico. La tabla muestra los pesos moleculares de las bandas del marcador utilizado (Lane 2); el peso molecular de la banda correspondiente al de Apo AIV aparece marcado en rojo en la columna Lane 1, band 3.

## 2.4. APOLIPOPROTEÍNA E.

Esta apolipoproteína tiene un peso molecular definido de 34 KDa. La detección con el anticuerpo Anti Apo E (GeneTex, AI255918) en el CSF-E de ratón de 11.5 d de desarrollo, demuestra la existencia de una banda de 30 KDa que se correspondería con el peso molecular aproximado de Apo E.

En cuanto a la banda de 55 KDa, no estamos seguros de su identidad o de su procedencia.

Existen evidencias que la exposición de células neurogliales p19 al estrés oxidativo produce como resultado una mayor acumulación de una proteína de aproximadamente 50-kDa. Esta proteína fue detectada con anticuerpos Anti Apo E y anti-HNE (HNE, 4-Hydroxynonenal, producto de la peroxidación lipídica) (Pedersen et al., 2000).

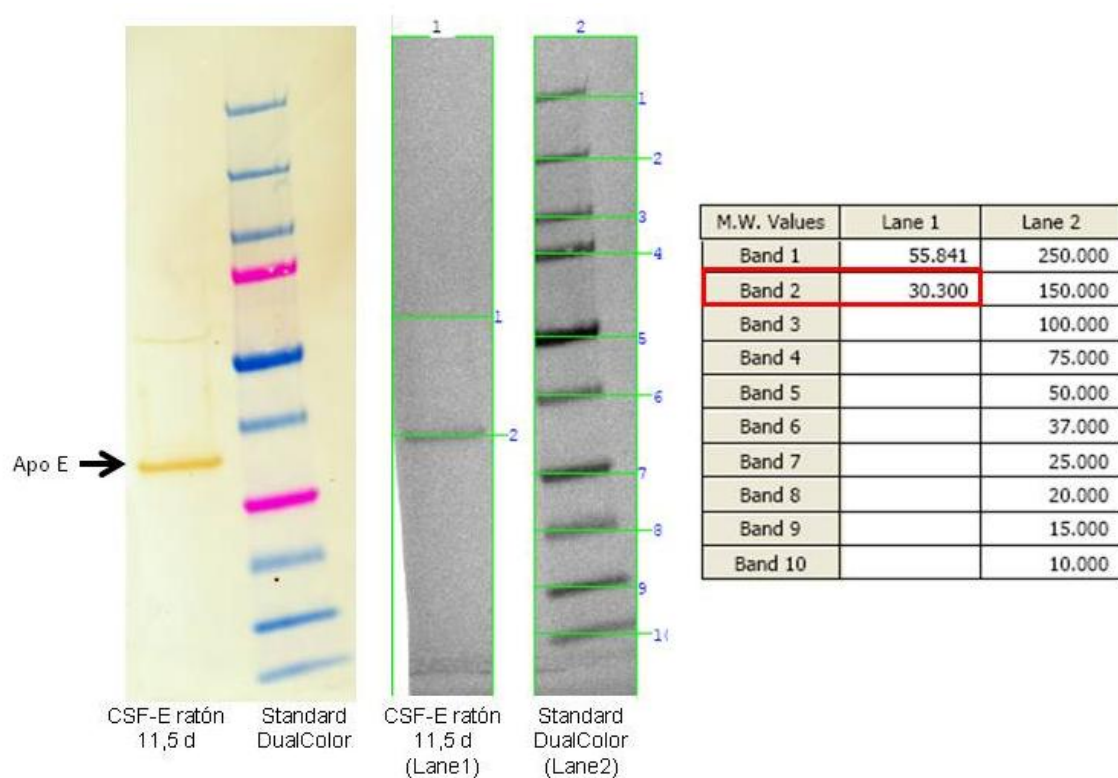


Fig. 44. Inmudección mediante la técnica de western-blot para Apo E. La imagen de la izquierda corresponde a la membrana de nitrocelulosa y las dos bandas de la derecha a las imágenes capturadas para el análisis densiométrico. La tabla muestra los pesos moleculares de las bandas del marcador utilizado (Lane 2); el peso molecular de la banda correspondiente al de Apo AIV aparece marcado en rojo en la columna Lane 1, band 2.

## 2.5. APOLIPOPROTEÍNA M.

El peso molecular definido para esta apolipoproteína es de 21 KDa. Para detectar su presencia en el CSE-E de ratón de 11.5 días, se ha utilizado un anticuerpo Anti Apo M de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (sc-67806). Los resultados obtenidos demuestran la presencia de una banda de unos 26 KDa.

La banda de 26 KDa se corresponde con el peso molecular descrito para la apolipoproteína M. La concentración de la banda es muy pequeña en comparación con las obtenidas para las anteriores apolipoproteínas.

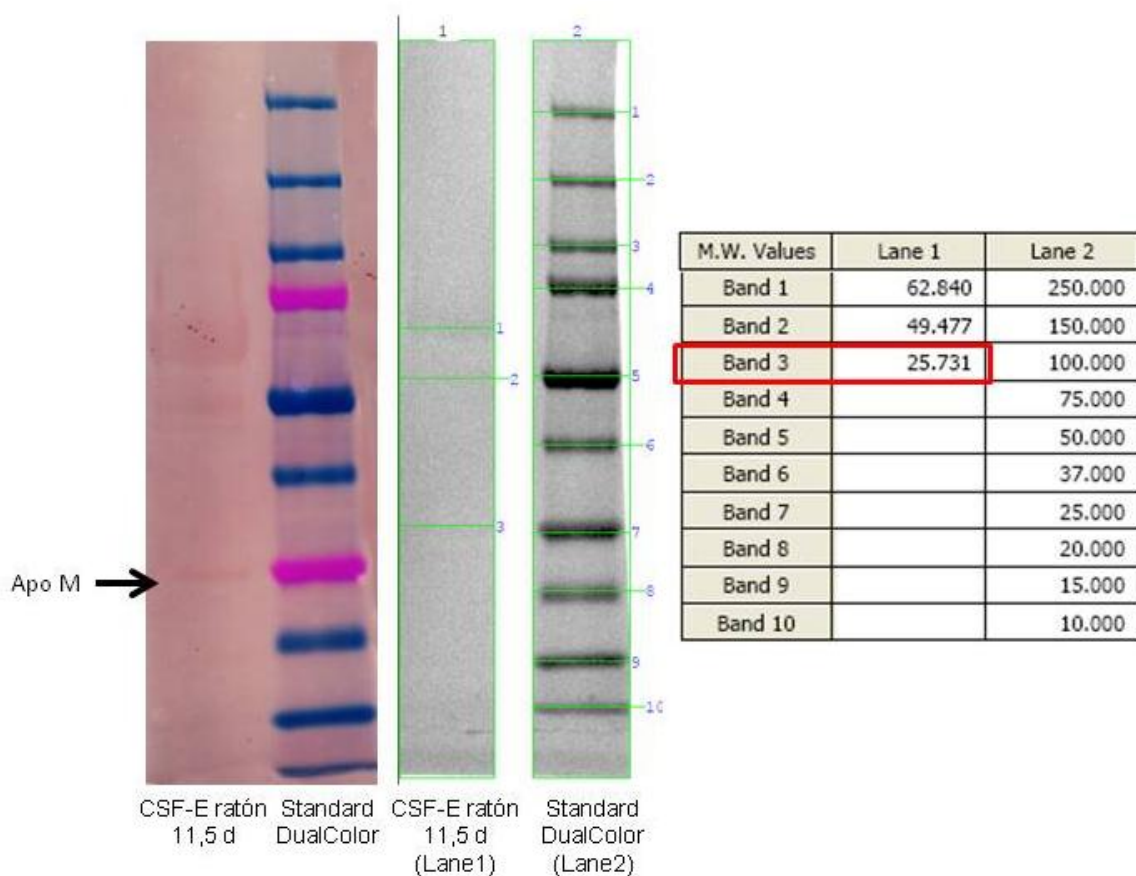
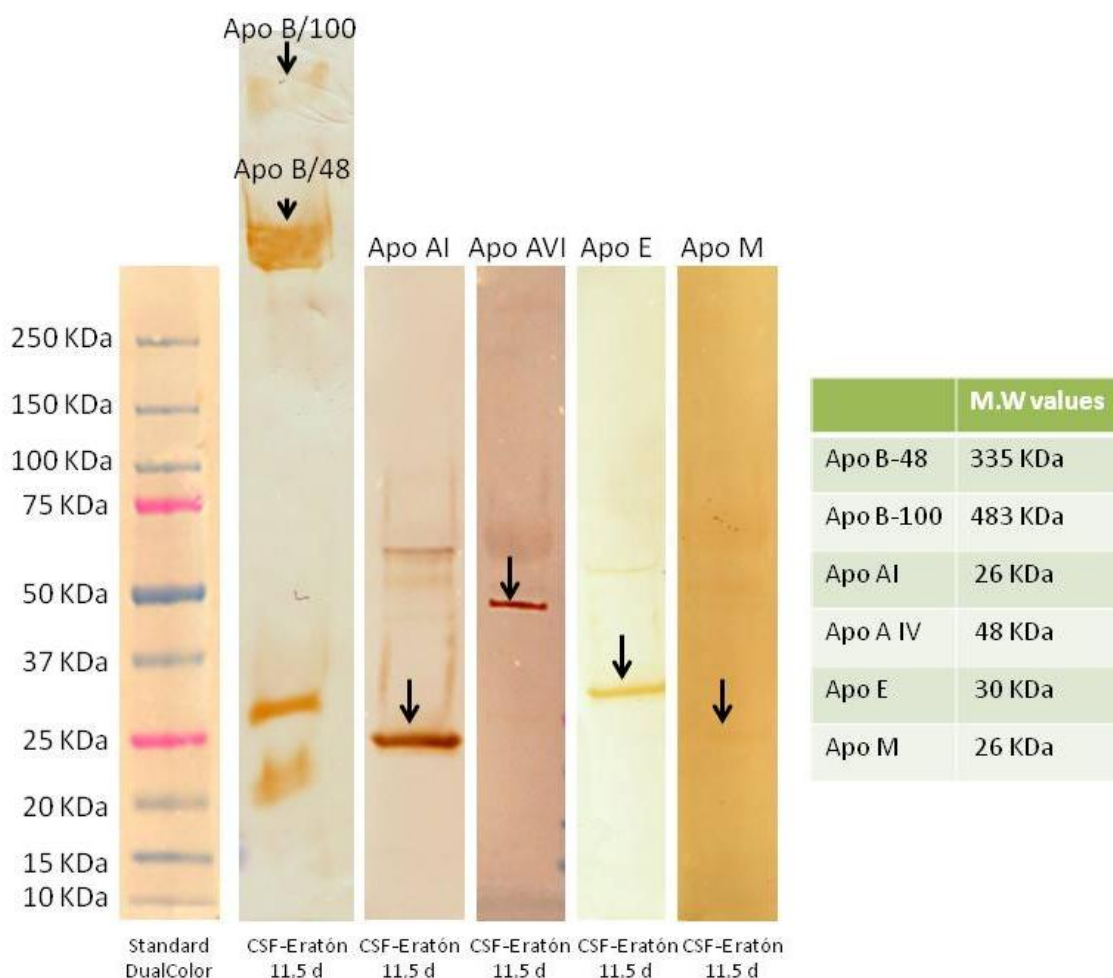


Fig. 45. Inmudetección mediante la técnica de western-blot para Apo M. La imagen de izquierda corresponde a la membrana de nitrocelulosa y las dos bandas de la derecha a las imágenes capturadas para el análisis densiométrico. La tabla muestra los pesos moleculares de las bandas del marcador utilizado (Lane 2); el peso molecular de la banda correspondiente al de Apo M aparece marcado en rojo en la columna Lane 1, band 3.

En resumen, nuestros resultados demuestran la presencia de las apolipoproteínas previamente descritas en el CSF-E de rata, Apo B, Apo AI, Apo AIV, Apo E Apo M, en el CSF-E de ratón de 11.5 días de desarrollo. Las apolipoproteínas mayoritarias en el CSF-E de ratón son Apo B, Apo AI, Apo AVI y Apo E, a diferencia del CSF-E de rata que son Apo B, Apo AI y Apo M.

En el caso del CSF-E de ratón, la concentración de Apo M es mucho menor en comparación con el resto de apolipoproteínas y con la concentración presente en el CSF-E de rata.



*Fig. 46. Presencia de las diferentes apolipoproteínas del estudio en el CSF-E de ratón. La imagen muestra la presencia de cada una de las apolipoproteínas del estudio detectadas en las membranas de nitrocelulosa, mediante inmunodetección. La primera imagen muestra el estándar utilizado y los pesos moleculares de cada una de las bandas; en las siguientes imágenes se muestra con una flecha la presencia de cada una de las apolipoproteínas, Apo B/48 y Apo B/100, Apo AI, Apo AIV, Apo E y Apo M. La tabla muestra los pesos moleculares de cada una de ellas.*

### 3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES APOLIPOPROTEÍNAS EN EMBRIONES DE RATÓN.

Para determinar el patrón de expresión de las diferentes apolipoproteínas en el neuroepitelio del cerebro embrionario de ratón, se han realizado ensayos de inmunofluorescencia indirecta en cortes transversales de embriones de ratón de diferentes estadios.

En las siguientes imágenes, se muestran cortes teñidos con hematoxilina/eosina, de las zonas en las que se han llevado a cabo los estudios de inmunofluorescencia. Hemos elegido un estadio intermedio, 11.5 días de desarrollo, como representación de todos los estadios estudiados.

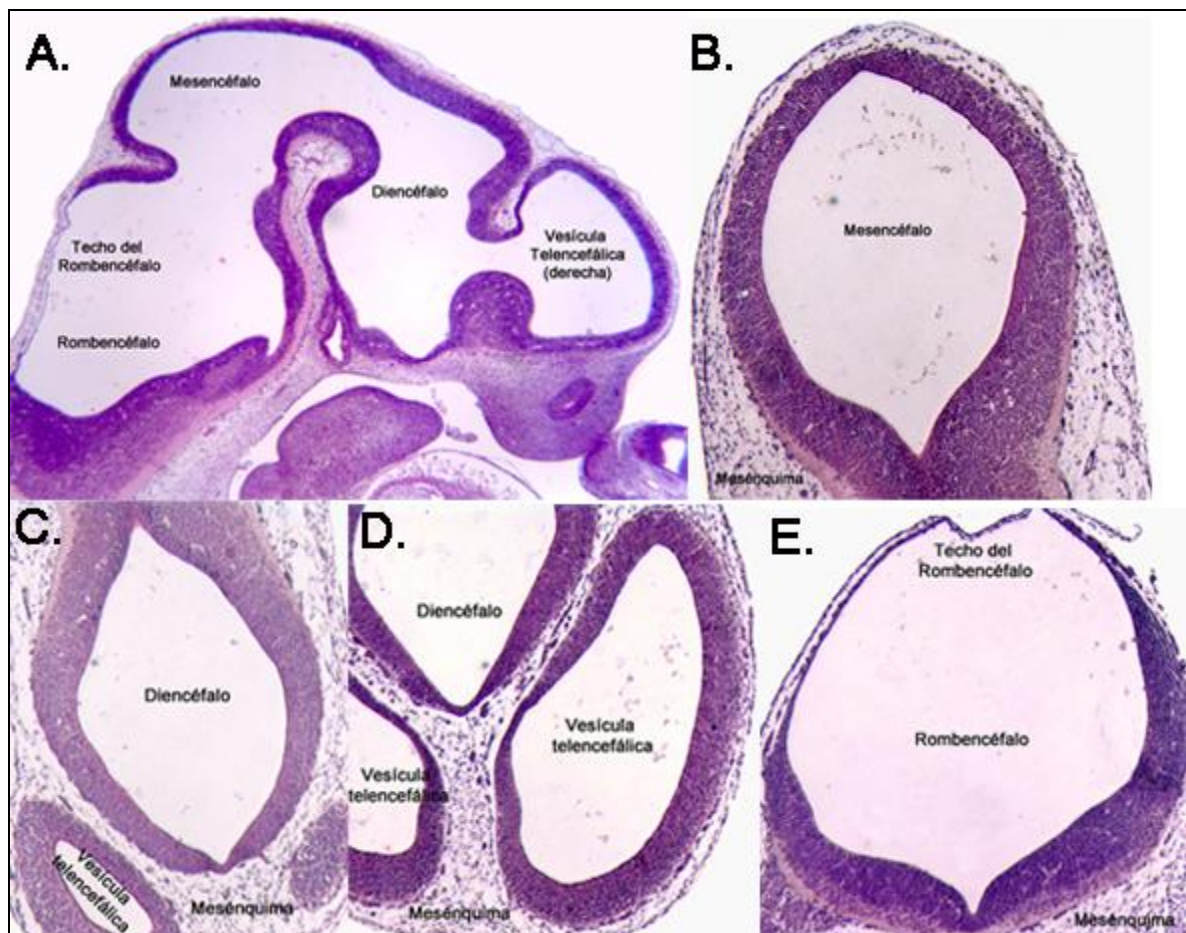


Fig. 47. Secciones de embriones de ratón de 11.5 días de desarrollo, hematoxilina-eosina. La imagen 47.A muestra una sección sagital medial donde se pueden observar las diferentes vesículas cerebrales. Las imágenes 47.B, 47.C, 47.D y 47.E muestran cortes transversales de las diferentes vesículas cerebrales.

### 3.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO B 48/100.

#### 3.1.1. EMBRIONES DE RATÓN DE 9.5 DÍAS p.c.

El estudio del patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 9.5 días p.c., demuestra que:

Existe un material precipitado abundante e intensamente marcado dentro de las diferentes vesículas cerebrales, con estructura reticular, como puede ser observado en la figura 48.A y a mayor aumento en la figura 48.E.

Llama la atención el intenso inmunomarcaje que aparece en la superficie apical de las células neuroepiteliales, como se observa en la figura 48.A, 48.B y 48.C. El estudio con una mayor magnificación, revela que dicho marcaje apical, aparentemente, es un marcaje intracelular que se vuelve más intenso en la pared de determinadas formaciones esféricas de la superficie apical celular (Fig. 48.F, puntas de flecha) muy abundantes en determinadas zonas y que sugieren un proceso de liberación de estructuras membranosas hacia la cavidad del tubo nervioso. La presencia de áreas con una gran concentración de estas formaciones, como es la pared del romboencéfalo, permite apreciar distintos estadios de evolución en la formación de estas estructuras vesiculares, lo que sugiere un proceso activo de extrusión de la membrana apical (Fig. 48.F). En la figura 48.C (puntas de flecha) puede apreciarse un marcaje basal en el neuroepitelio, menos intenso que el apical, y restringido fundamentalmente a las regiones ventrales o futura placa del suelo del rombencéfalo. Finalmente es de destacar la presencia de un marcaje intenso en el mesénquima, en especial en el entorno de la notocorda. Aparentemente las estructuras vasculares, aorta y venas dorsales, presentan un intenso marcaje en su pared (Fig. 48.A y 48.C)

Finalmente el patrón de inmunomarcaje descrito para Apo B 100/48, parece estar más claramente establecido en mesencéfalo y diencefalo que en romboencéfalo, donde este patrón se restringe a las paredes laterales (Fig. 48.B y 48.C), mientras que el techo presenta un marcaje apical discreto. (Fig. 48.D).

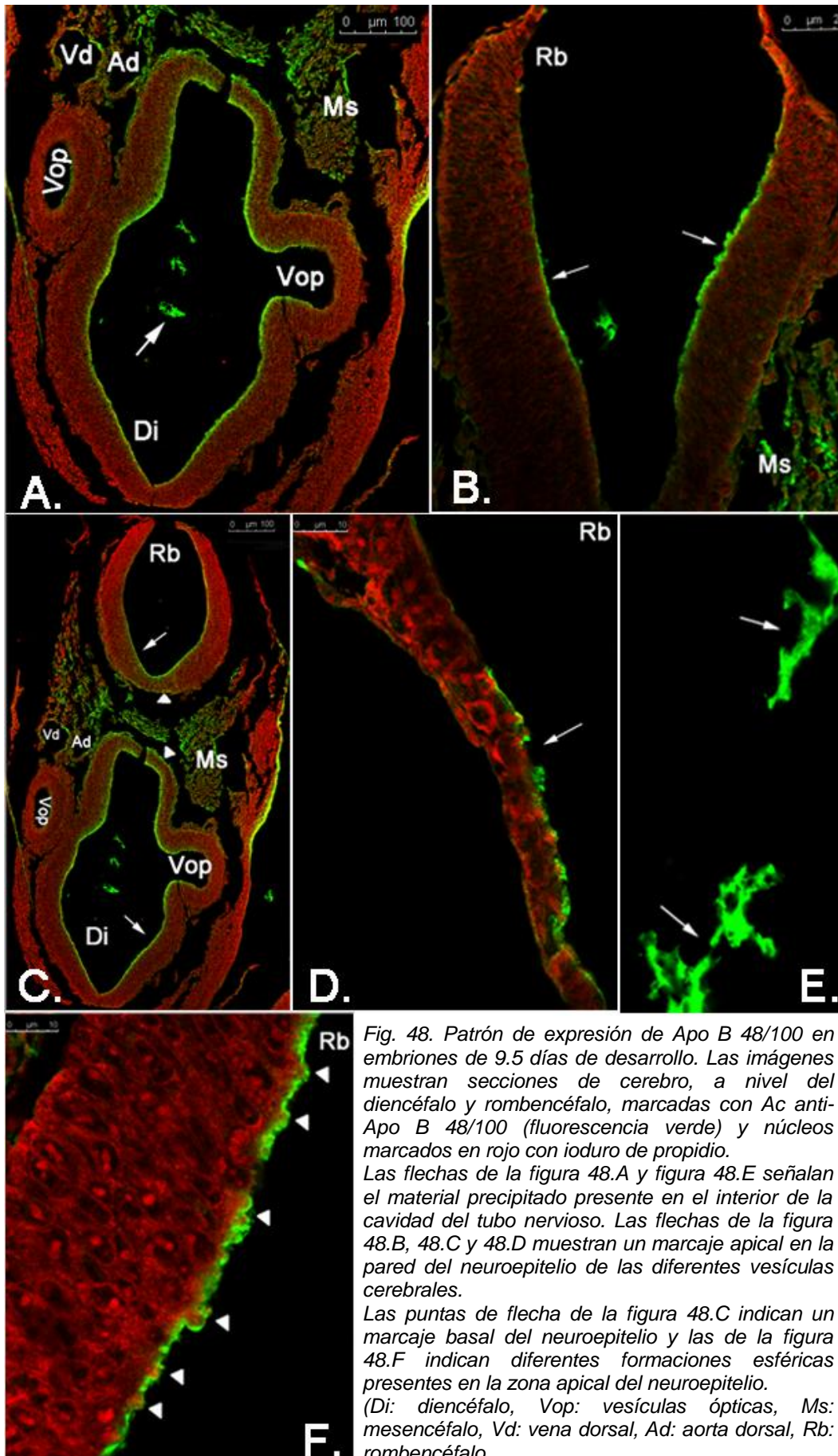


Fig. 48. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 9.5 días de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del diencefalo y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo B 48/100 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas de la figura 48.A y figura 48.E señalan el material precipitado presente en el interior de la cavidad del tubo nervioso. Las flechas de la figura 48.B, 48.C y 48.D muestran un marcaje apical en la pared del neuroepitelio de las diferentes vesículas cerebrales. Las puntas de flecha de la figura 48.C indican un marcaje basal del neuroepitelio y las de la figura 48.F indican diferentes formaciones esféricas presentes en la zona apical del neuroepitelio. (Di: diencefalo, Vop: vesículas ópticas, Ms: mesencéfalo, Vd: vena dorsal, Ad: aorta dorsal, Rb: rombencéfalo).

### 3.1.2. EMBRIONES DE RATÓN DE 10.5 DÍAS p.c.

En este estadio el patrón de inmunexpresión de Apo B 48/100, está básicamente conservado, aunque presenta ciertas particularidades. Al igual que en el estadio anterior existe una abundante cantidad de material precipitado en la luz del tubo nervioso, intensamente positivo y presenta unas características similares a las descritas anteriormente. (Fig. 49.A, flecha fina).

Igualmente, el neuroepitelio presenta un marcaje apical intenso pero más generalizado. El marcaje basal es menos intenso que el apical y está algo más extendido que en el estadio anterior (Fig. 49.A)

Finalmente el mesénquima también presenta un intenso marcaje y, a diferencia que en el anterior estadio, parece afectar a todo él (Fig. 49.A)

La observación con alta magnificación revela datos interesantes. Por una parte la persistencia de las formaciones apicales, que protruyen hacia la luz (Fig. 49.D, punta de flecha). El hecho más llamativo es que el marcaje apical de las células neuroepiteliales ha dejado de estar circunscrito a la superficie apical de estas células y en determinadas localizaciones aparece como una banda más profunda que abarca de 3 a 4 núcleos celulares de grosor hacia el interior del neuroepitelio (Fig. 49.B, 49.C y 49.D, flechas finas). Finalmente la figura 49.D, nos muestra cómo el marcaje de la región basal parece circunscribirse a la lámina basal y aparentemente a los vasos adheridos a ella, sin embargo, a este nivel presenta numerosas discontinuidades.



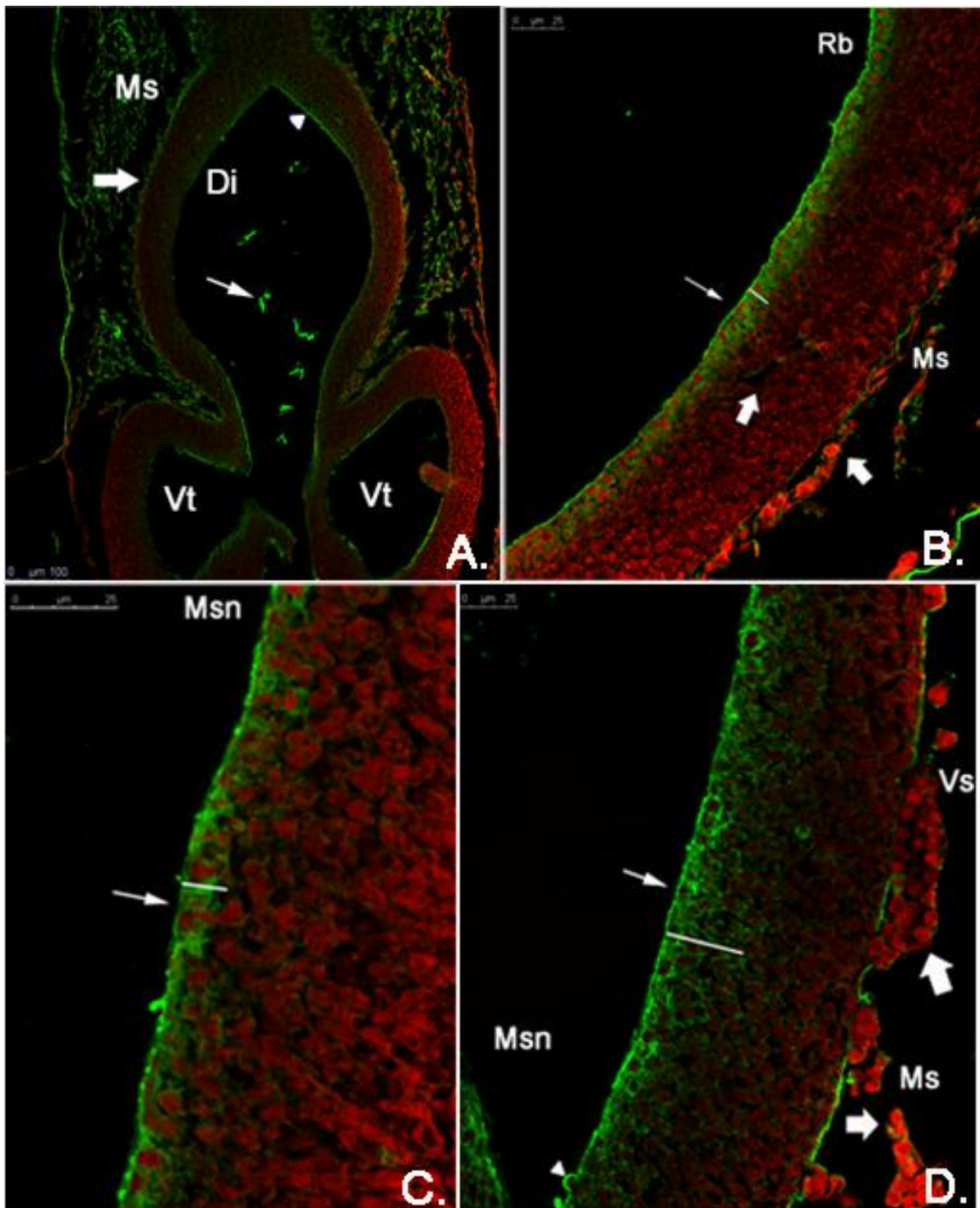


Fig. 49. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 10.5 d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencéfalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo B 48/100 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con ioduro de propidio. En la figura 49.A, las flechas finas indican la presencia de material precipitado en el interior de la cavidad, las flechas gruesas señalan un marcaje basal y las puntas de flecha un marcaje apical del neuroepitelio.

En la figura 49.B, 49.C y 49.D, las flechas indican un marcaje apical más profundo, las flechas gruesas indican un marcaje positivo de estructuras vasculares (49.B y 49.C), las puntas de flecha indican la presencia de estructuras esféricas presentes en la superficie apical del neuroepitelio.

(Vt: vesículas telencefálico, Di: diencéfalo, Ms: mesénquima, Vs: vasos sanguíneos, Msn: mesencéfalo, Rb: rombencéfalo).

### 3.1.3. EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.

El patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de ratón de estadio 11.5 días de desarrollo, se mantiene estable con respecto al estadio anterior. Se aprecia un abundante material precipitado en la luz, con la apariencia descrita anteriormente y marcado intensamente. El marcaje del neuroepitelio es apical, en determinadas localizaciones más intenso que en el estadio anterior, observándose algunas células marcadas, dispersas en el espesor del neuroepitelio. En cualquier caso este patrón es generalizado en las diferentes vesículas del tubo nervioso. El marcaje basal es algo menos intenso y también ocasionalmente discontinuo. Finalmente y como ocurría en el estadio anterior, el marcaje del mesénquima cefálico es intenso y generalizado (Fig. 50.A).

La apariencia a mayor aumento no muestra diferencias en el marcaje apical y basal con respecto al estadio anterior. Se observa una banda de 3 a 4 núcleos celulares y un marcaje basal discontinuo, respectivamente (Fig. 50.C). Sin embargo, el marcaje apical presenta en determinadas localizaciones unas prolongaciones citoplasmáticas que se introducen en el neuroepitelio (Fig. 50.B), al tiempo que aparecen con frecuencia células en la zona central del neuroepitelio de las diferentes vesículas cuyo citoplasma se marca positivamente, la disposición de estas células, sugiere que se trate de estructuras vasculares (Fig. 50.D y 50.E).

Otra región de particular interés es el techo del romboencéfalo, en el que se aprecia un marcaje continuo tanto en la superficie apical como en la basal. En la superficie apical aparece un número significativo de células que protruyen claramente hacia la cavidad y con un marcaje periférico intenso (Fig. 50.F).

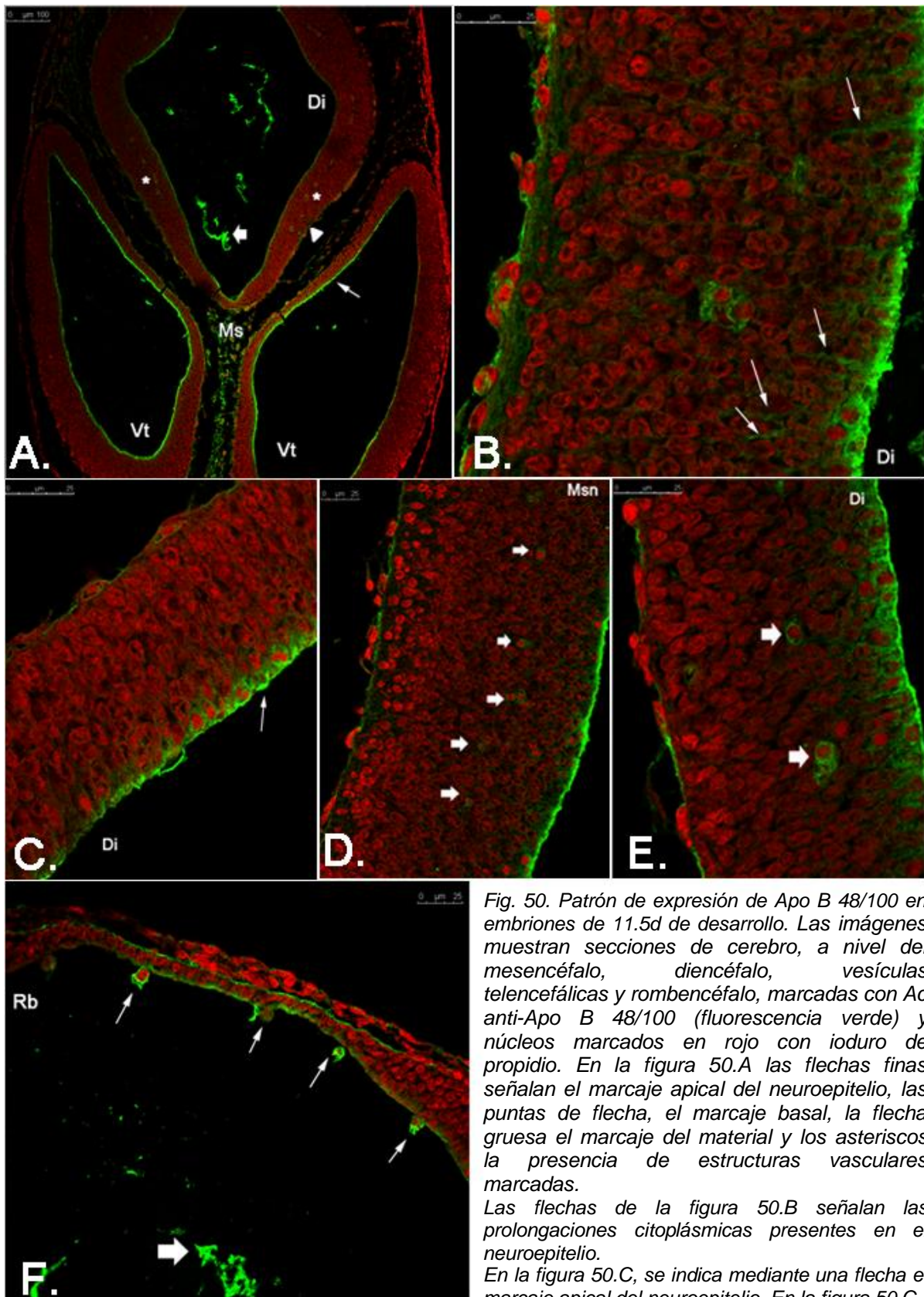


Fig. 50. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 11.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencefalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo B 48/100 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con ioduro de propidio. En la figura 50.A las flechas finas señalan el marcaje apical del neuroepitelio, las puntas de flecha, el marcaje basal, la flecha gruesa el marcaje del material y los asteriscos la presencia de estructuras vasculares marcadas.

Las flechas de la figura 50.B señalan las prolongaciones citoplásmicas presentes en el neuroepitelio.

En la figura 50.C, se indica mediante una flecha el marcaje apical del neuroepitelio. En la figura 50.C

y 50.D las estructuras vasculares marcadas se indican mediante flechas gruesas. Las flechas finas de la figura 50.F señalan formaciones esféricas presentes en el neuroepitelio y la flecha gruesa indica material precipitado en el interior de la cavidad. (Vt: vesículas telencefálicas, Di: diencefalo, Ms: mesénquima, Vs: vasos sanguíneos, Msn: mesencéfalo, Rb: rombencéfalo).

#### 3.1.4. EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.

El progreso en el desarrollo embrionario hasta estadios de 12.5 días hace que el patrón de expresión de Apo B 48/100 acentúe las condiciones comentadas en el estadio anterior. El material precipitado en la cavidad del cerebro embrionario está más marcado, es abundante y mantiene la misma apariencia reticular ya comentada. Por otra parte, el marcaje apical del neuroepitelio es intenso y aparentemente, tiende a ser más homogéneo en todas las vesículas cerebrales. Sin embargo, el marcaje basal permanece heterogéneo y, en muchas zonas, difícil de diferenciar del marcaje de los vasos que se desarrollan en contacto con el neuroepitelio. Finalmente no apreciamos variaciones en el marcaje del mesénquima que sigue siendo intenso y afecta prácticamente de forma homogénea a todo el mesénquima cefálico (Fig. 51.A).

La observación a mayor aumento revela una acentuación de los cambios en la expresión de Apo B 48/100 en el neuroepitelio cerebral. El marcaje apical es heterogéneo en las diferentes localizaciones, presentando en ocasiones una banda apical de unos 2-3 niveles de núcleos, mientras que en otras localizaciones, como en el mesencéfalo, se pueden apreciar zonas en las que esta banda de marcaje Apo B positivo intenso, se extiende hasta 6 o más núcleos celulares. Además en múltiples localizaciones dispersas tanto del diencefalo, como del telencefalo y mesencéfalo se puede apreciar un marcaje discreto citoplasmático en múltiples células del interior de los dos tercios apicales del neuroepitelio (Fig. 51.C y 51.D). En este caso los vasos, cuyas células también aparecen marcadas, son claramente diferenciables, por lo que suponemos que las células anteriormente comentadas, son células de estirpe neural (Fig. 51.D).

Las prolongaciones celulares completas o citoplásmicas, desprendiéndose hacia la cavidad se han intensificado notablemente, dando la sensación de corresponderse con un mecanismo de liberación de ApoB (Fig. 51.B, 51.E y 51.F).

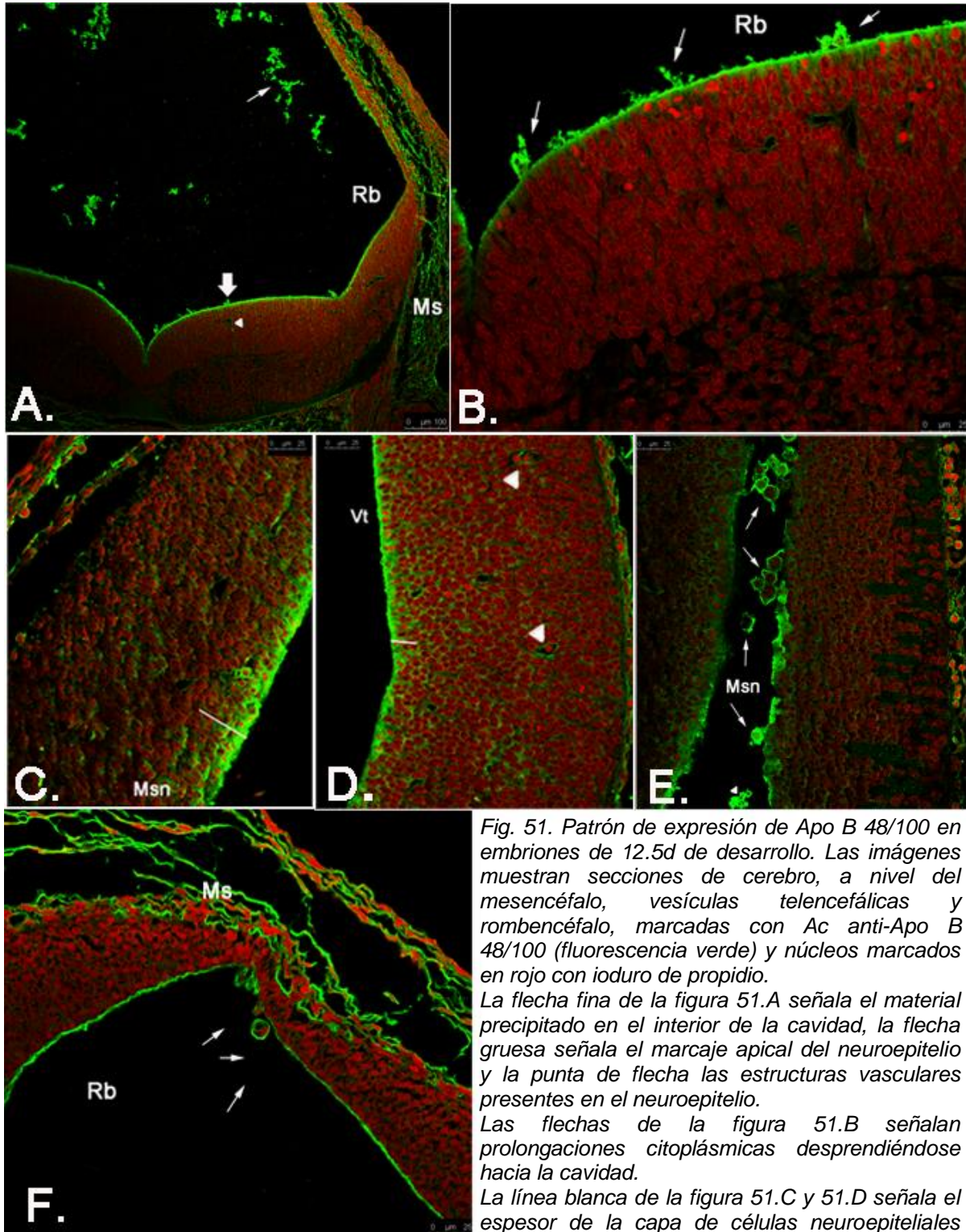


Fig. 51. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 12.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo B 48/100 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con ioduro de propidio.

La flecha fina de la figura 51.A señala el material precipitado en el interior de la cavidad, la flecha gruesa señala el marcaje apical del neuroepitelio y la punta de flecha las estructuras vasculares presentes en el neuroepitelio.

Las flechas de la figura 51.B señalan prolongaciones citoplásmicas desprendiéndose hacia la cavidad.

La línea blanca de la figura 51.C y 51.D señala el espesor de la capa de células neuroepiteliales

En la figura 51.D, las puntas de flecha indican la presencia de estructuras vasculares en el interior del neuroepitelio.

Las flechas de la figura 51.E y 51.F indican formaciones esféricas que protruyen hacia la cavidad. (Rb: rombencéfalo, Ms: mesénquima, Msn: mesencéfalo, Vt: vesículas telencefálicas).

### 3.1.5. EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.

En los embriones de 13.5 días de desarrollo, el patrón de expresión no difiere, en líneas generales, para el descrito en 12.5 días. Como puede apreciarse en la figura 52.A, el marcaje es intensamente positivo en la porción apical del neuroepitelio, concretamente en el tercio apical del neuroepitelio y en los 2/3 basales, el marcaje se restringe a los vasos y a los hematíes, también se aprecia marcaje en el mesénquima circundante.

A gran aumento se observa que el neuroepitelio mantiene el marcaje positivo en la superficie apical, que alcanza un número elevado de núcleos celulares, de 6 a 8 (Fig. 52.C). Los vasos son identificables por el intenso marcaje inmunopositivo en sus paredes (Fig. 52.E). Igualmente se aprecia la presencia de numerosas prolongaciones citoplásmicas extruidas hacia la luz, con intenso marcaje positivo (Fig. 52.E y 52.F).

Una zona particularmente llamativa es el techo del romboencéfalo, en el que se aprecia el esbozo de los futuros plexos coroideos, que no presenta un marcaje diferenciado con respecto a otras zonas (Fig. 52.B y 52.D).

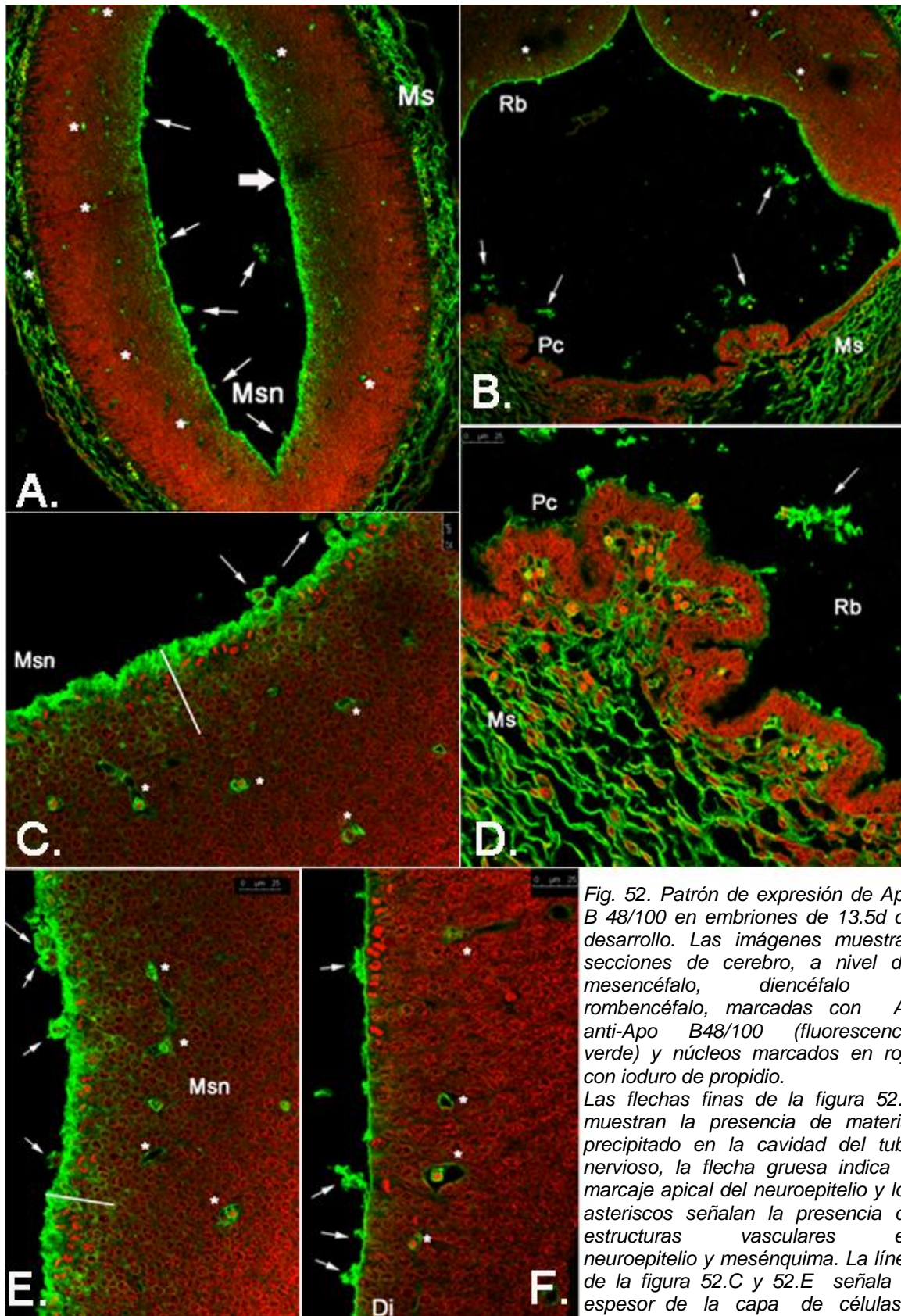


Fig. 52. Patrón de expresión de Apo B 48/100 en embriones de 13.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencefalo y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo B48/100 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas finas de la figura 52.A muestran la presencia de material precipitado en la cavidad del tubo nervioso, la flecha gruesa indica el marcaje apical del neuroepitelio y los asteriscos señalan la presencia de estructuras vasculares en neuroepitelio y mesénquima. La línea de la figura 52.C y 52.E señala el espesor de la capa de células

neuroepiteliales marcadas, las flechas señalan la presencia de prolongaciones citoplasmáticas hacia la cavidad cerebral y los asteriscos la presencia de estructuras vasculares. Las flechas de la figura 52.B y 52.D indican la presencia de material precipitado en la cavidad del tubo nervioso y los asteriscos la presencia de estructuras vasculares. (Msn: mesencéfalo, Ms: mesénquima, Rb: rombencéfalo, Pc: plexos coroideos, Di: diencefalo)

Con los resultados obtenidos podemos resumir que el patrón de expresión de Apo B48/100 en embriones de ratón de diferentes estadios de desarrollo es bastante similar:

- Marcaje generalizado del neuroepitelio en todas las vesículas cerebrales analizadas.
- En todos los estadios se observa un marcaje intenso de material precipitado en el interior de la cavidad de apariencia reticular.
- Marcaje apical intenso, en los estadios más tempranos como el de 9.5 días se restringe a la primera capa de núcleos celulares, mientras que en los estadios posteriores, el marcaje apical abarca a un mayor número de núcleos celulares, en el caso del mesencéfalo se extiende a una capa de hasta 6 núcleos.
- En todos los estadios se observa la presencia de formaciones apicales, que sugieren un proceso de secreción hacia la luz. En algunos casos también se observa la presencia de prolongaciones citoplasmáticas que se introducen en el neuroepitelio, como en el caso de los embriones de 11.5 días de desarrollo.
- Marcaje de las estructuras vasculares intraneuroepiteliales a partir del estadio de 10.5 días de desarrollo.
- Marcaje basal generalizado y continuo en todas las vesículas cerebrales.
- El marcaje del mesénquima se encuentra asociado al marcaje de las numerosas estructuras vasculares.



## 3.2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO AI.

En lo referente al patrón de expresión de la Apolipoproteína AI, seguiremos el mismo esquema que en el caso anterior, describiremos su patrón de expresión en el neuroepitelio cerebral en función de la evolución ontogénica entre los estadios 9.5 y 13.5 días de desarrollo.

### 3.2.1. EMBRIONES DE RATÓN DE 9.5 DÍAS p.c.

En los embriones de ratón de 9.5 días de desarrollo, existe un intenso inmunomarcaje con anticuerpo anti Apo AI, que sigue un patrón de distribución específico. En primer lugar se aprecia un intenso inmunomarcaje en la superficie apical del neuroepitelio, similar, en intensidad, al marcaje del material precipitado dentro de la cavidad. En términos generales el espesor del neuroepitelio no presenta marcaje y la porción basal del mismo, junto con los vasos periféricos, presentan un marcaje muy discreto y discontinuo. Llama la atención la existencia de un intenso marcaje en el mesénquima (Fig. 53.A y 53.C).

El estudio a más aumento, confirma que el marcaje que acabamos de describir como apical se restringe a la capa más superficial de células, que en su mayoría muestra una distribución muy regular (Fig. 53.D y 53.E), dando una aspecto de línea continua. En el romboencéfalo el único marcaje es el apical. Sin embargo, en el cerebro anterior, se aprecian células cuyo citoplasma esta discretamente marcado y se introduce, ligeramente en el espesor del neuroepitelio (Fig. 53.E).

En la figura 53.D se puede observar la presencia de formaciones esféricas en la porción apical del neuroepitelio.

En cuanto al patrón de distribución por vesículas cerebrales cabe decir que, si bien el marcaje afecta a todas las vesículas cerebrales, parece ser más intenso a nivel rombencefálico.

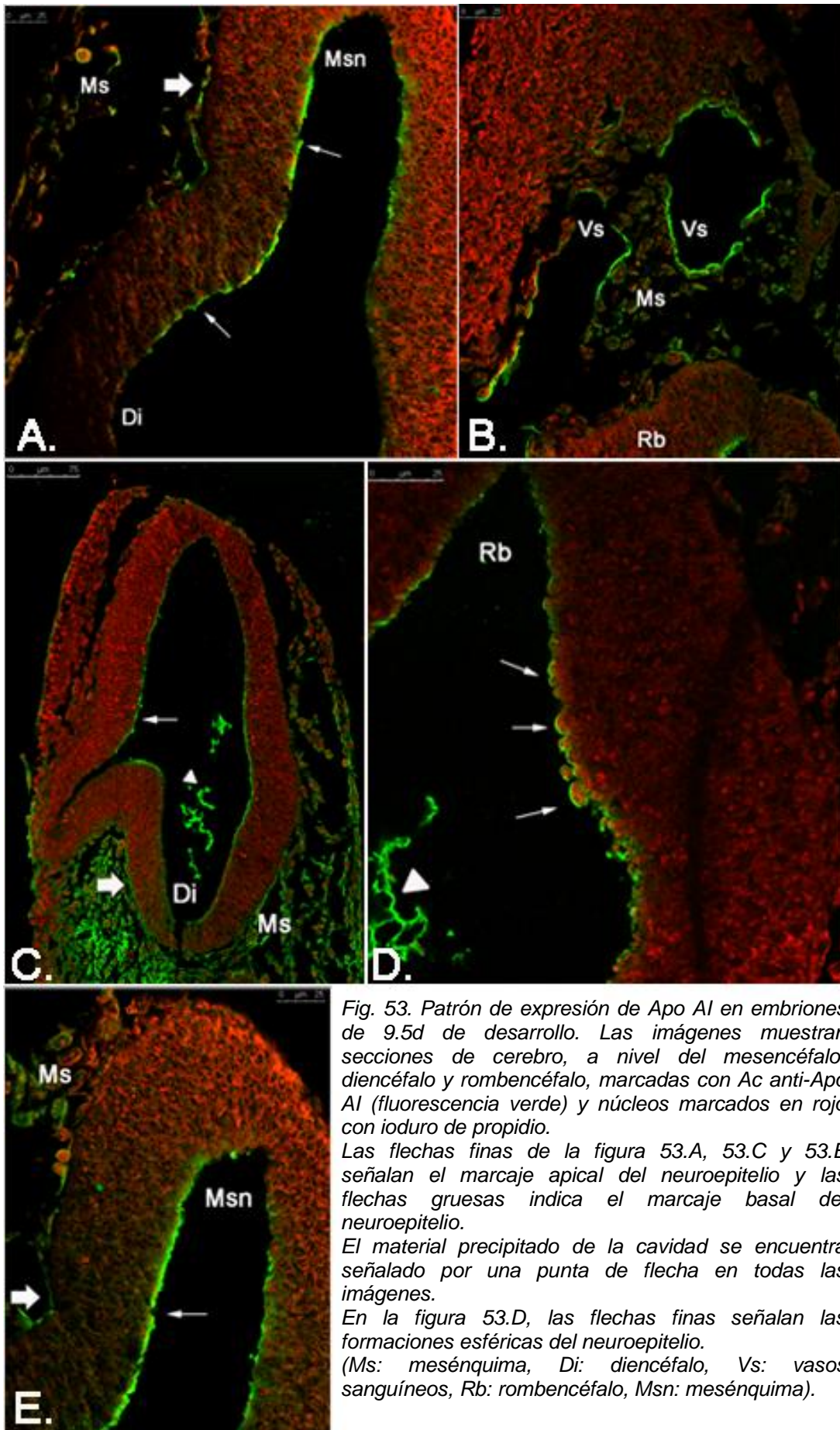


Fig. 53. Patrón de expresión de Apo A1 en embriones de 9.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencefalo y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo A1 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio.

Las flechas finas de la figura 53.A, 53.C y 53.E señalan el marcaje apical del neuroepitelio y las flechas gruesas indica el marcaje basal del neuroepitelio.

El material precipitado de la cavidad se encuentra señalado por una punta de flecha en todas las imágenes.

En la figura 53.D, las flechas finas señalan las formaciones esféricas del neuroepitelio.

(Ms: mesénquima, Di: diencefalo, Vs: vasos sanguíneos, Rb: rombencéfalo, Msn: mesénquima).

### 3.2.2. EMBRIONES DE RATÓN DE 10.5 DÍAS p.c.

En el estadio 10.5 días de desarrollo, las imágenes demuestran que el marcaje sigue restringiéndose a una fina capa apical en el neuroepitelio, que parece estar presente en todas las vesículas cerebrales (Fig. 54.A, 54.D y 54.C). El marcaje basal en determinadas zonas del neuroepitelio es nulo o escaso y solo ocasionalmente hemos encontrado marcaje en el mesénquima, aunque también muy discreto (Fig. 54.A, 54.D y 54.E). Como muestran las imágenes, la matriz es intensamente positiva. (Fig. 54.A, 54.B y 54.D).

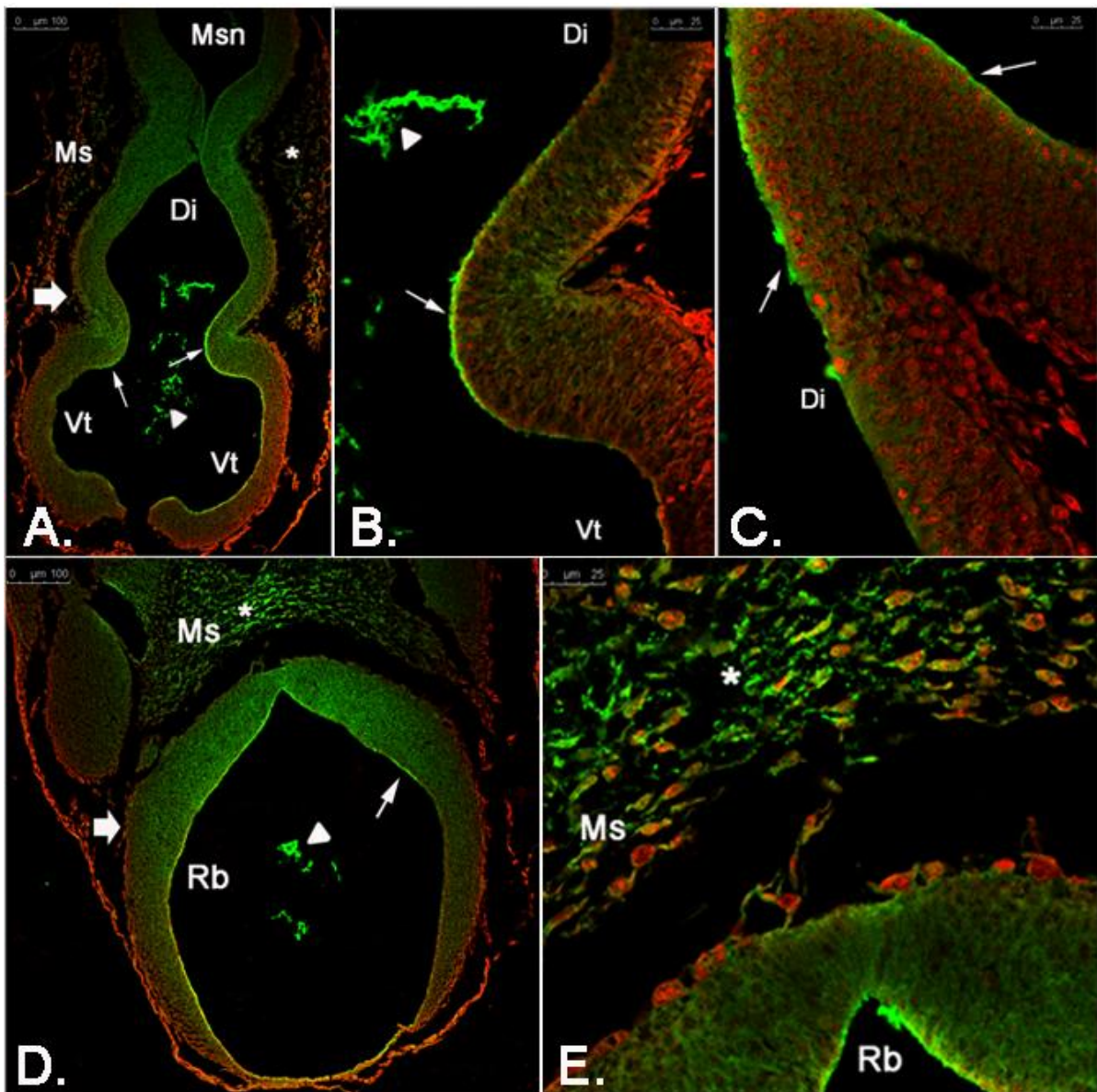


Fig. 54. Patrón de expresión de Apo A1 en embriones de 10.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencéfalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo A1 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas finas en todas las imágenes señalan el marcaje apical del neuroepitelio, las flechas gruesas indican el marcaje basal, las puntas de flecha el material precipitado en el interior de las vesículas cerebrales y los asteriscos señalan el marcaje del mesénquima. (Msn: mesencéfalo, Di: diencéfalo, Vt: vesículas telencefálicas, Rb: rombencéfalo, Ms: mesénquima).

### **3.2.3. EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.**

A los 11.5 días de desarrollo, el marcaje con anticuerpo anti Apo AI del material precipitado en la cavidad y en la superficie apical, sigue siendo particularmente intenso. Aparece un discreto marcaje a nivel basal y el mesénquima aparece menos marcado que en estadios anteriores (Fig. 55.A, 55.D, 55.E)

Con respecto al patrón de expresión de Apo AI en la superficie apical del neuroepitelio, se aprecian cambios significativos con respecto a los estadios anteriores, ya que aparte de la lámina apical, intensamente positiva, se aprecia un incremento en el marcaje intracelular de las dos o tres primeras capas de células neuroepiteliales, próximas al ventrículo. Este marcaje, en ocasiones, se observa como prolongaciones citoplasmáticas alargadas (Fig. 55.B, 55.C, 55.E y 55.F).

Finalmente la expresión de Apo AI en este estadio parece ser homogéneo en todas las vesículas cerebrales (Fig. 55.A, 55.D y 55.E).

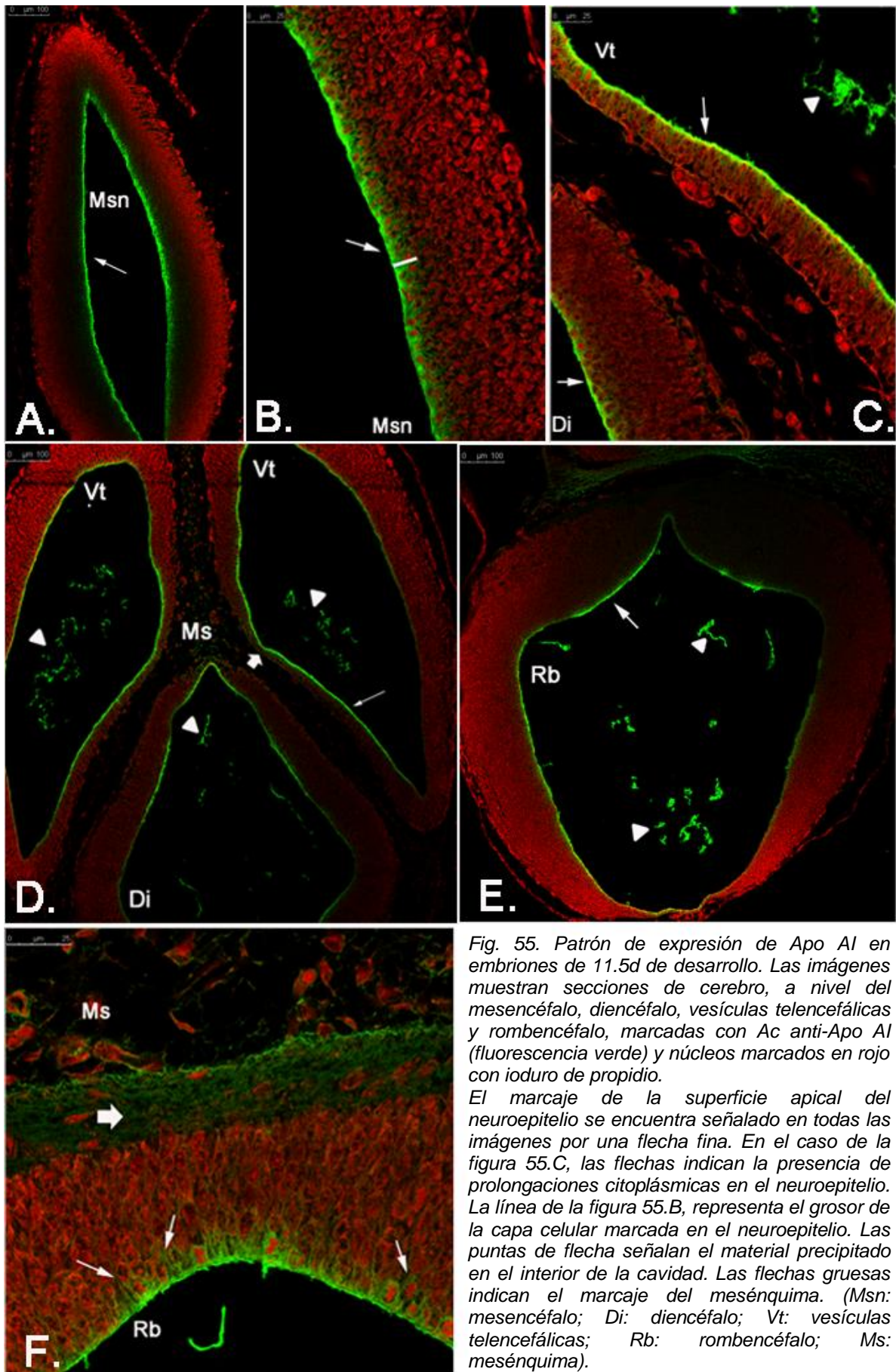


Fig. 55. Patrón de expresión de Apo A1 en embriones de 11.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencéfalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo A1 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio.

El marcaje de la superficie apical del neuroepitelio se encuentra señalado en todas las imágenes por una flecha fina. En el caso de la figura 55.C, las flechas indican la presencia de prolongaciones citoplásmicas en el neuroepitelio. La línea de la figura 55.B, representa el grosor de la capa celular marcada en el neuroepitelio. Las puntas de flecha señalan el material precipitado en el interior de la cavidad. Las flechas gruesas indican el marcaje del mesénquima. (Msn: mesencéfalo; Di: diencéfalo; Vt: vesículas telencefálicas; Rb: rombencéfalo; Ms: mesénquima).

3.2.4. EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.

En el estadio 12.5 días de desarrollo, la expresión de Apo A1 no varía significativamente con respecto a lo descrito en los estadios anteriores, tanto en su localización en las distintas partes del embrión como en las diferentes vesículas cerebrales (Fig. 56.A y 56.B).

No obstante, aparentemente, el grosor de la capa apical es discretamente menor que en el estadio anterior y llama también la atención la proyección en el rombencéfalo de múltiples formaciones esféricas, intensamente marcadas, adheridas a la pared (aparentemente con contenido nuclear) y reaparecen de nuevo las formaciones marcadas que protruyen de la superficie apical (Fig. 56.B, 56.C, 56.D y 56.E).

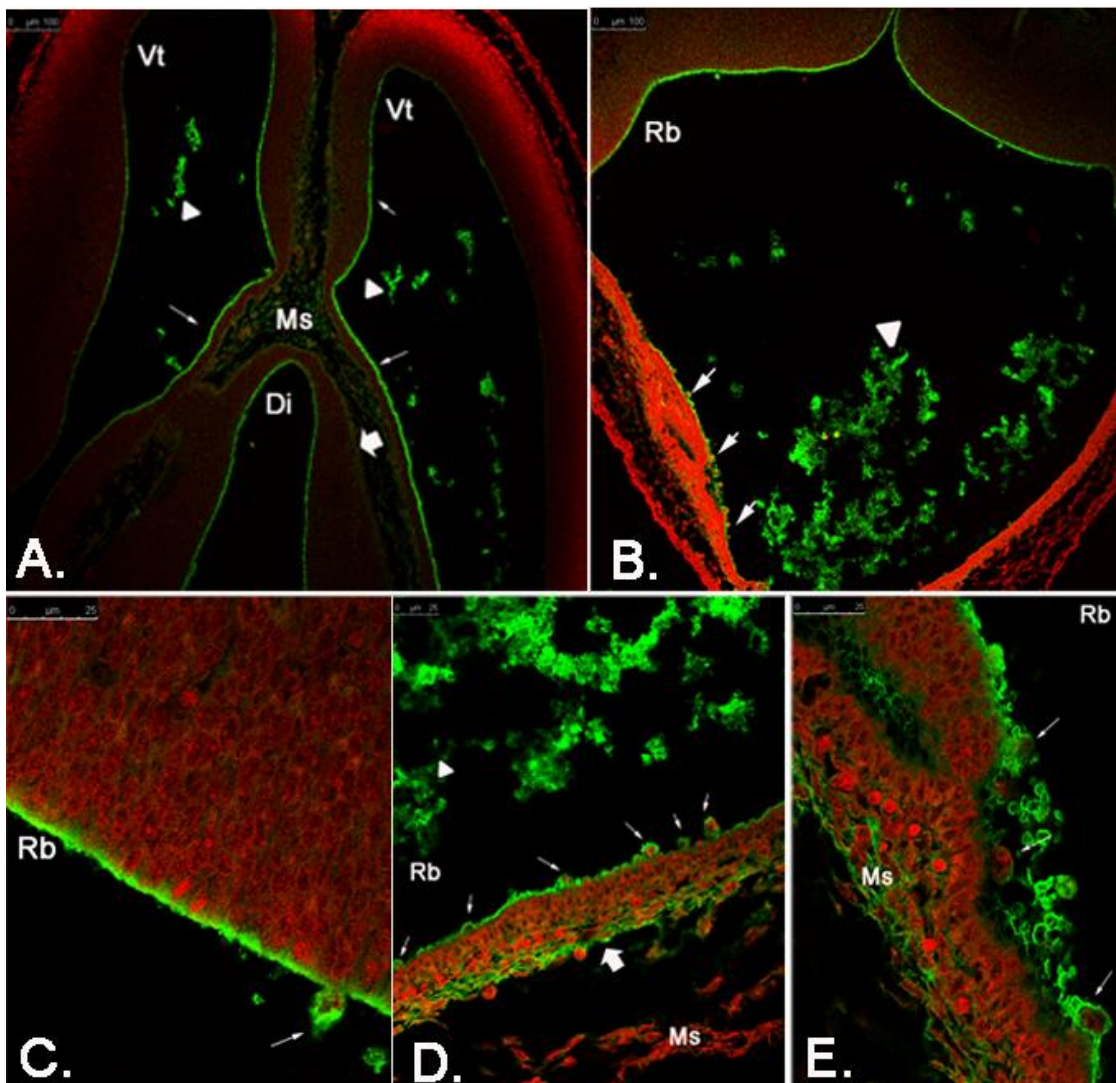


Fig. 56. Patrón de expresión de Apo A1 en embriones de 12.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencefalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo A1 (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas finas de la figura 56.A señalan la superficie apical del neuroepitelio. En el resto de las imágenes las flechas finas señalan las formaciones esféricas presentes en la superficie apical del neuroepitelio. Las puntas de flecha indican el material precipitado presente en el interior de las vesículas del tubo nervioso. Las flechas gruesas señalan el marcaje basal del neuroepitelio. (Di: diencefalo; Vt: vesículas telencefálicas; Rb: rombencéfalo; Ms: mesénquima).

3.2.5. EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.

En el estadio 13.5 días de desarrollo, no se observan diferencias significativas con respecto a los estadios anteriores, tanto en su distribución en los diferentes tejidos embrionarios, como en sus vesículas.

Aparentemente la intensidad del marcaje de la capa apical es similar al estadio anterior. Se observan abundantes protrusiones celulares, similares a las ya descritas (Fig. 57.A y 57.C).

Se aprecia también un marcaje evidente en las estructuras vasculares en el interior del neuroepitelio y también en el mesénquima cefálico (Fig. 57.B).

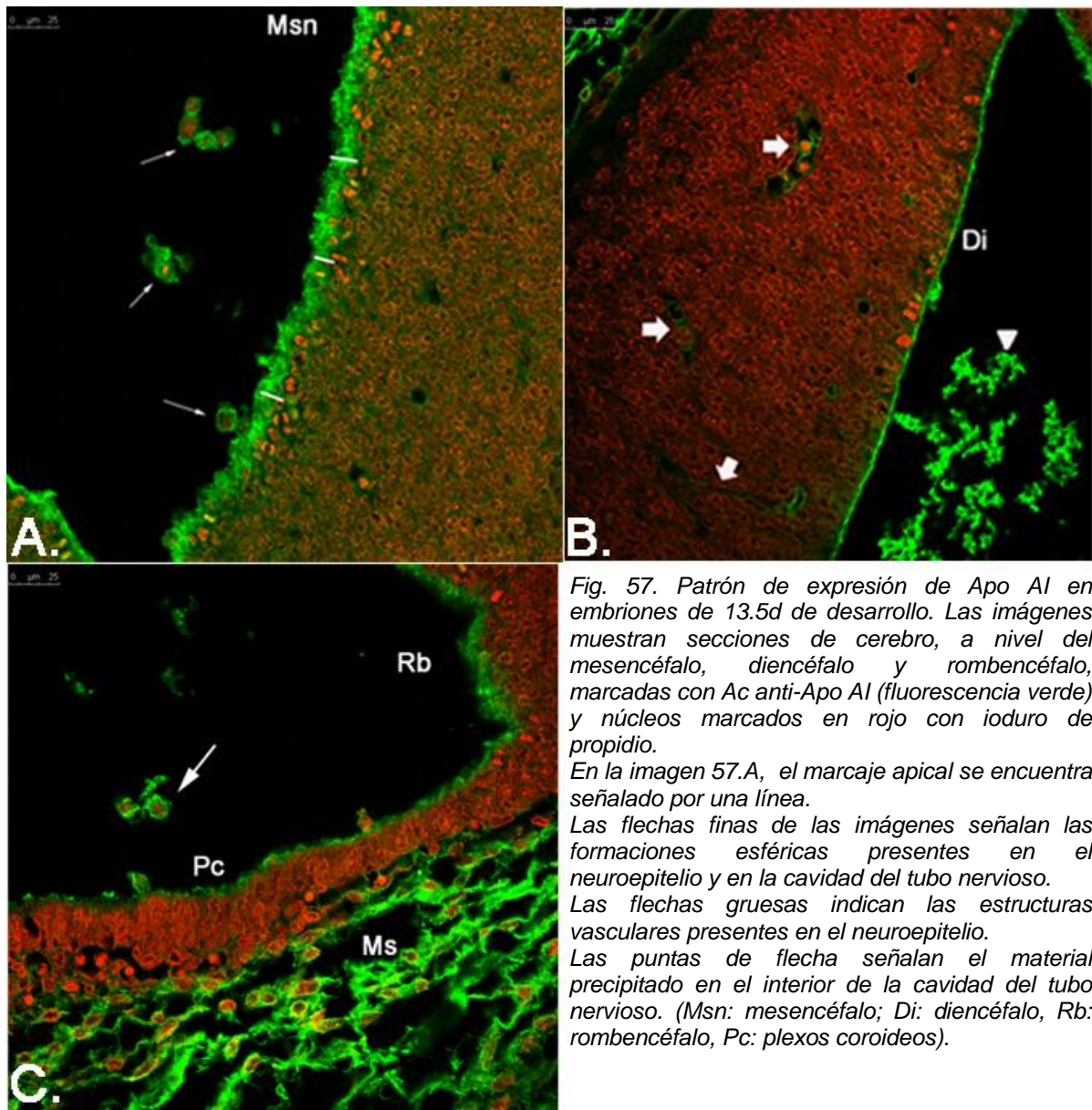


Fig. 57. Patrón de expresión de Apo AI en embriones de 13.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencefalo y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo AI (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio.

En la imagen 57.A, el marcaje apical se encuentra señalado por una línea.

Las flechas finas de las imágenes señalan las formaciones esféricas presentes en el neuroepitelio y en la cavidad del tubo nervioso.

Las flechas gruesas indican las estructuras vasculares presentes en el neuroepitelio.

Las puntas de flecha señalan el material precipitado en el interior de la cavidad del tubo nervioso. (Msn: mesencéfalo; Di: diencefalo, Rb: rombencéfalo, Pc: plexos coroideos).

Con los resultados obtenidos podemos resumir que el patrón de expresión de Apo AI en embriones de ratón de diferentes estadios de desarrollo es bastante similar:

- El patrón de distribución por vesículas cerebrales es similar, aunque en estadios más tempranos, 9.5 días, parece ser más intenso a nivel rombencefálico.
- El material precipitado en el interior de la cavidad del tubo nervioso se encuentra intensamente marcado en todos los estadios y con apariencia reticular.
- En todos los estadios estudiados, se observa que el marcaje apical se restringe a una capa superficial de células, con una distribución muy regular. A excepción del estadio 11.5 días en el que se incrementa el marcaje intracelular, que abarca las dos o tres primeras capas de células neuroepiteliales, y en ocasiones se observan estructuras a modo de prolongaciones citoplásmicas que se introducen hacia el interior del neuroepitelio.
- Las formaciones esféricas aparecen en los estadios más tardíos, a los 12.5 y 13.5 días de desarrollo.
- Marcaje basal generalizado en todas las vesículas cerebrales.
- El mesénquima presenta un marcaje intenso, similar en todos los estadios, al igual que las estructuras vasculares presentes en éste y en el neuroepitelio.



### 3.3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO A IV.

En lo referente al patrón de expresión de la Apolipoproteína A IV, seguiremos el mismo esquema que en los casos anteriores, describiremos su patrón de expresión en el neuroepitelio cerebral en función de la evolución ontogénica entre los estadios 9.5 y 13.5 días de desarrollo.

La expresión de Apo A IV en los estadios 9.5 y 10.5 días de desarrollo, no muestra un marcaje específico en el neuroepitelio.

#### 3.3.1. EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.

En el estadio 11.5 días de desarrollo se puede observar un cierto marcaje del mesénquima y un marcaje apical tenue del neuroepitelio.

Se aprecia también un marcaje evidente en las estructuras vasculares en el interior del neuroepitelio (Fig. 58.B).

En algunas zonas del neuroepitelio aparecen estructuras esféricas que protruyen hacia el interior de la cavidad del tubo nervioso (Fig. 58.B y 58.C). Al igual que en los casos anteriormente descritos, aparece un marcaje intenso de material precipitado en la cavidad del tubo nervioso.

En general en este estadio el marcaje basal del neuroepitelio es prácticamente nulo.

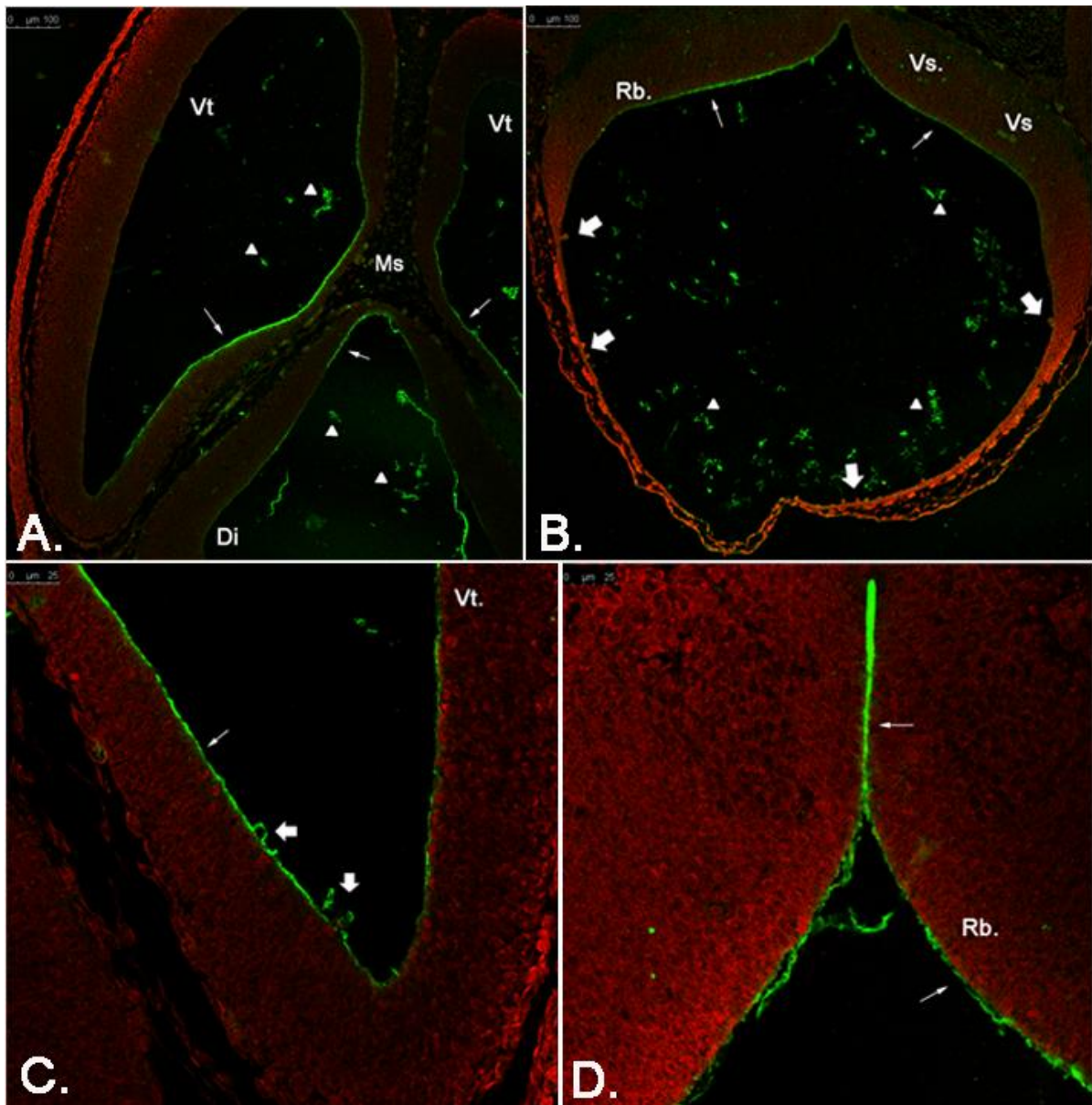


Fig. 58. Patrón de expresión de Apo A IV en embriones de 11.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del, diencefalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo AVI (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas finas de las imágenes señalan el marcaje apical del neuroepitelio. Las puntas de flecha indican el material precipitado en el interior de la cavidad de las vesículas cerebrales. Las flechas gruesas señalan estructuras que protruyen hacia el exterior de la cavidad. (Vt: vesículas telencefálicas, Di: diencefalo, Ms: mesénquima, Rb: rombencéfalo, Vs: vasos sanguíneos).

3.3.2. EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.

En el estadio 12.5 días de desarrollo, el marcaje apical del neuroepitelio se restringe a la superficie. Se observan protrusiones celulares (Fig. 59.A y 59.C).

El marcaje basal es prácticamente nulo (Fig. 59.B) y el mesénquima subyacente presenta un marcaje muy tenue (Fig. 59.B).

El material precipitado en el interior de la cavidad del tubo nervioso está intensamente marcado (Fig. 59.C).

Se aprecia un marcaje de las estructuras vasculares del neuroepitelio (Fig. 59.B y 59.C).

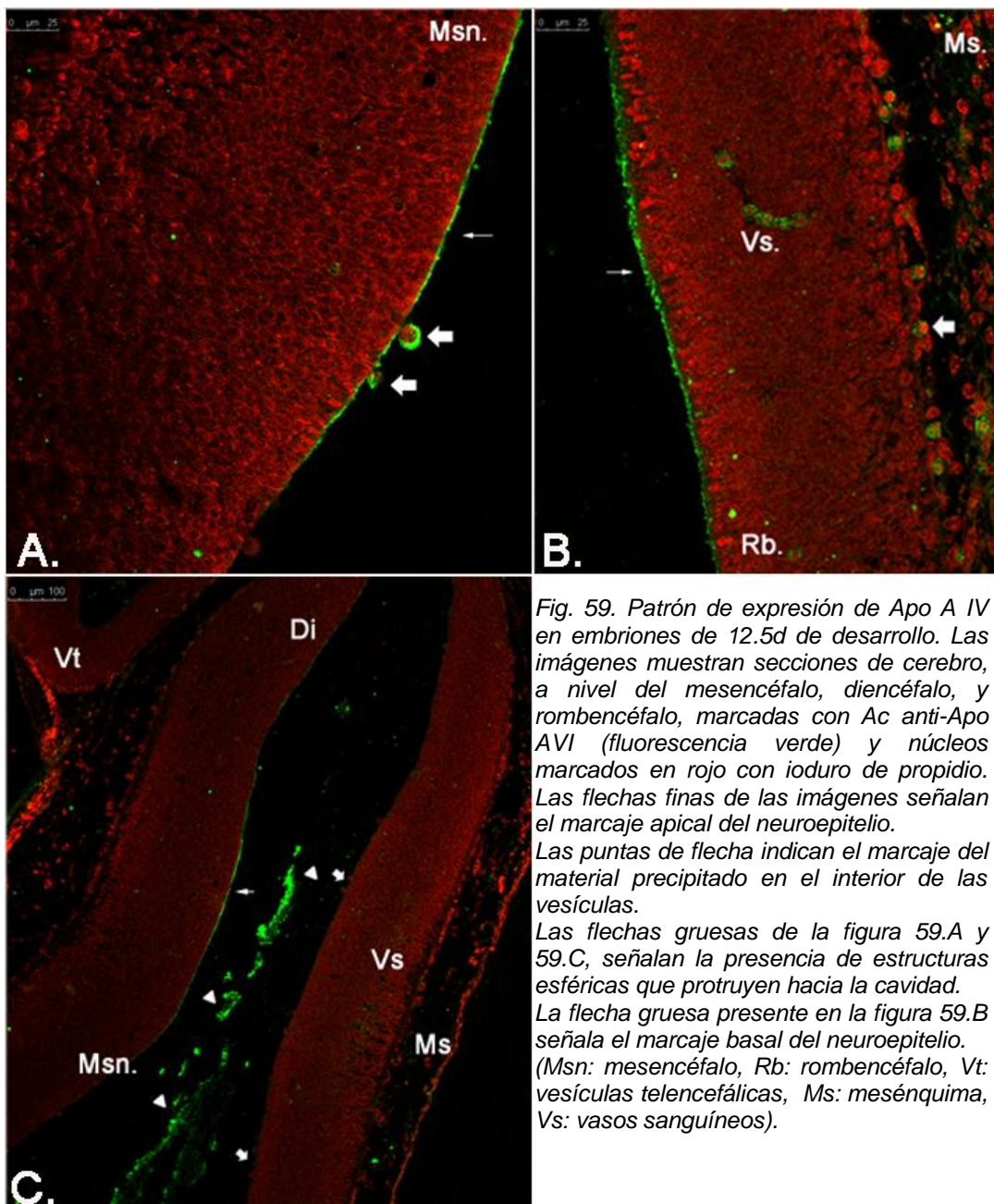
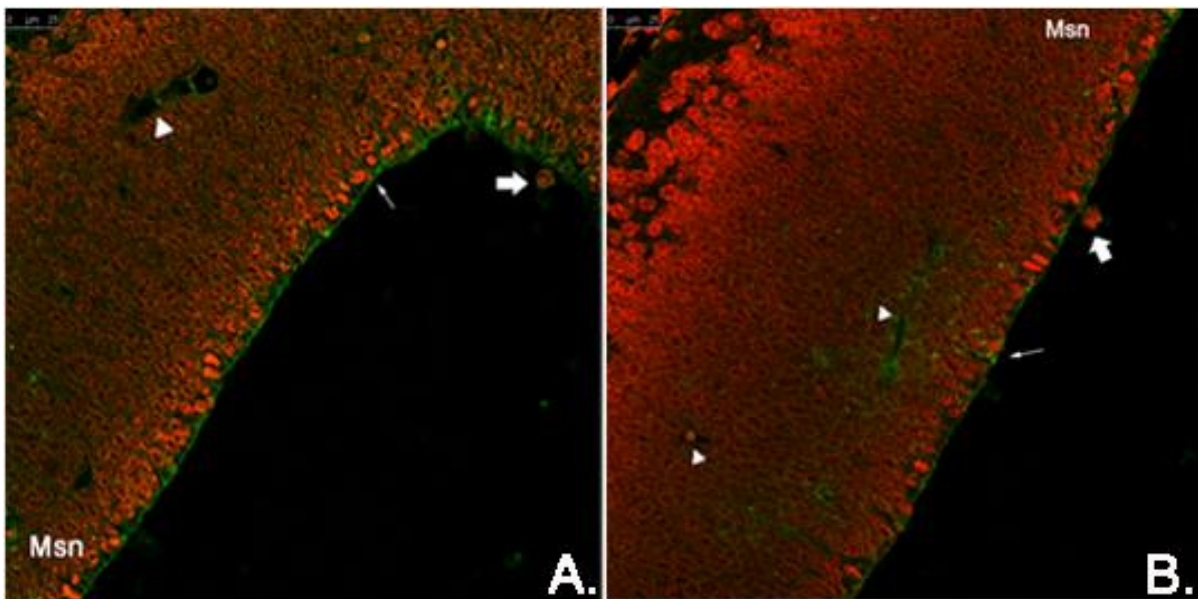


Fig. 59. Patrón de expresión de Apo A IV en embriones de 12.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencefalo, y rombencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo AVI (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas finas de las imágenes señalan el marcaje apical del neuroepitelio. Las puntas de flecha indican el marcaje del material precipitado en el interior de las vesículas. Las flechas gruesas de la figura 59.A y 59.C, señalan la presencia de estructuras esféricas que protruyen hacia la cavidad. La flecha gruesa presente en la figura 59.B señala el marcaje basal del neuroepitelio. (Msn: mesencéfalo, Rb: rombencéfalo, Vt: vesículas telencefálicas, Ms: mesénquima, Vs: vasos sanguíneos).

### 3.3.3. EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.

En el estadio 13.5 días de desarrollo se observa un marcaje apical tenue, similar en todas la vesículas cerebrales, se observan abundantes protrusiones celulares, similares a las descritas anteriormente.

Se aprecia también un marcaje evidente en las estructuras vasculares en el interior del neuroepitelio. El marcaje del mesénquima cefálico es escaso al igual que el marcaje basal del neuroepitelio.



*Fig. 60. Patrón de expresión de Apo A IV en embriones de 13.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, marcadas con Ac anti-Apo AVI (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas finas señalan el marcaje apical del neuroepitelio. Las flechas gruesas señalan formaciones esféricas que protruyen hacia el interior de la cavidad del tubo nervioso y las puntas de flecha indican el marcaje de estructuras vasculares presentes en el neuroepitelio. (Msn: mesencéfalo).*

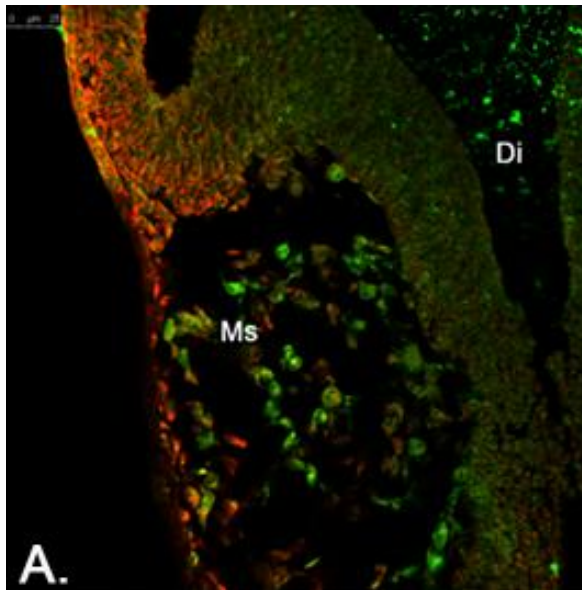
Con los resultados obtenidos podemos resumir que el patrón de expresión de Apo AVI en embriones de ratón difiere en los diferentes estadios analizados:

- En los estadios más tempranos del desarrollo (9.5 y 10.5 días) no se observa un marcaje específico del neuroepitelio.
- En los estadios posteriores (11.5, 12.5 y 13.5 días de desarrollo) se observa:
  - El patrón de distribución por vesículas cerebrales es similar.
  - Marcaje del material precipitado en el interior de la cavidad cerebral.
  - Marcaje apical restringido a la primera capa de células neuroepiteliales.
  - Presencia de estructuras esféricas que protruyen hacia el interior de la cavidad.
  - Marcaje de las estructuras vasculares presentes en el neuroepitelio.
  - Marcaje basal nulo.
  - Marcaje tenue del mesénquima, asociado al marcaje de las estructuras vasculares.

### 3.4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO E.

#### 3.4.1. EMBRIONES DE RATÓN DE 9.5 DÍAS p.c.

La expresión de Apo E en embriones de ratón de 9.5 días es prácticamente nula. El neuroepitelio no presenta marcaje y solo se aprecia algo de marcaje en el mesénquima, aunque muy tenue.

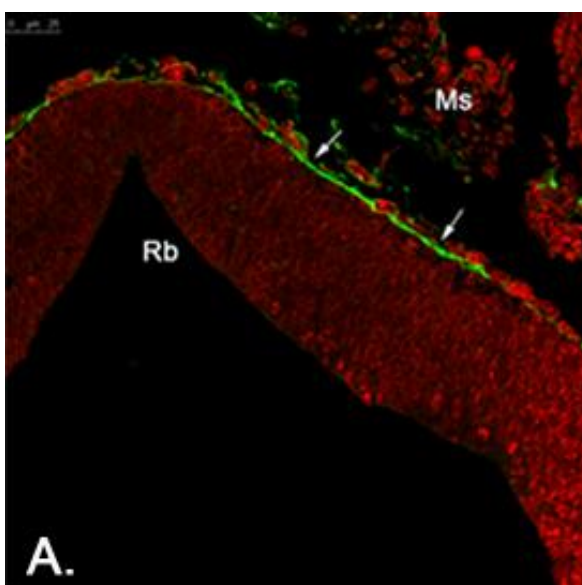


*Fig. 61. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 9.5d de desarrollo. La imagen muestra una sección de cerebro, a nivel del diencéfalo, marcada con Ac anti-Apo E (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con ioduro de propidio. En la imagen se observa que el neuroepitelio no presenta marcaje y únicamente el mesénquima presenta un marcaje muy tenue.*

*(Di: diencéfalo, Ms: mesénquima).*

#### 3.4.2. EMBRIONES DE RATÓN DE 10.5 DÍAS P.C.

En el estadio de 10.5 días de desarrollo, Apo E parece expresarse en la porción basal y en los vasos. El mesénquima también presenta un discreto marcaje de forma irregular. No se aprecia la presencia de marcaje dentro de la cavidad.



*Fig. 62. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 10.5d de desarrollo. La imagen muestra una sección de cerebro, a nivel del rombencéfalo, marcada con Ac anti-Apo E (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con ioduro de propidio. Las flechas señalan el marcaje positivo en la porción basal del neuroepitelio.*

*(Rb: rombencéfalo, Di: diencéfalo).*

3.4.3. EMBRIONES DE RATÓN DE 11.5 DÍAS p.c.

En este estadio, se aprecia más nítidamente que la ubicación de la Apo E está relacionada con la membrana basal del neuroepitelio y con formaciones vasculares tanto extra como intraneuroepiteliales. Así mismo, se aprecia la presencia de material marcado positivamente en determinadas localizaciones del mesénquima y, ocasionalmente, en la cavidad del tubo nervioso (Fig. 63.B, 63.C y 63.D). El marcaje del neuroepitelio es un marcaje disperso y no muy intenso en los 2/3 apicales (línea blanca, fig. 63.A, 63.C y 63.D).

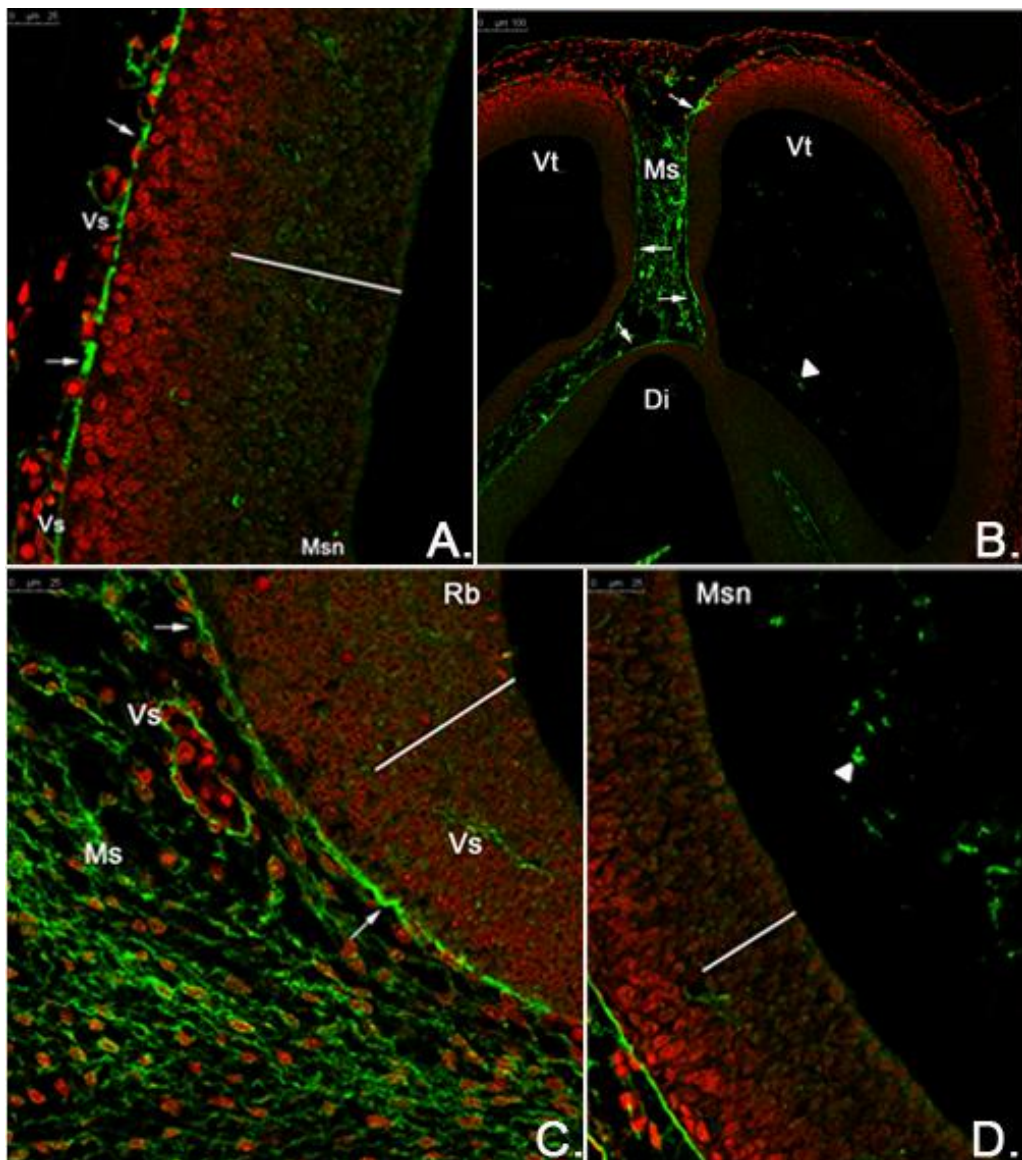


Fig. 63. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 11.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo, diencefalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo marcadas con Ac anti-Apo E (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Se aprecia un marcaje basal del neuroepitelio (flechas finas) y de las formaciones vasculares tanto extra como intraneuroepiteliales (Vs). La línea blanca indica el marcaje apical del neuroepitelio y las puntas de flecha señalan el material precipitado presente en la cavidad del tubo nervioso. (Msn: mesencéfalo, Vt: vesículas telencefálicas, Di: diencefalo, Rb: rombencéfalo, Ms: mesénquima, Vs: vasos sanguíneos).

3.4.4. EMBRIONES DE RATÓN DE 12.5 DÍAS p.c.

En el estadio de desarrollo de 12.5 días, el patrón de expresión es similar al resto de estadios anteriores, el marcaje se encuentra relacionado con la membrana basal del neuroepitelio y con las estructuras vasculares (Fig. 64.A y 64.B). Al igual que en el estadio anterior, se observa un marcaje disperso en los 2/3 apicales del neuroepitelio (Fig. 64.C).

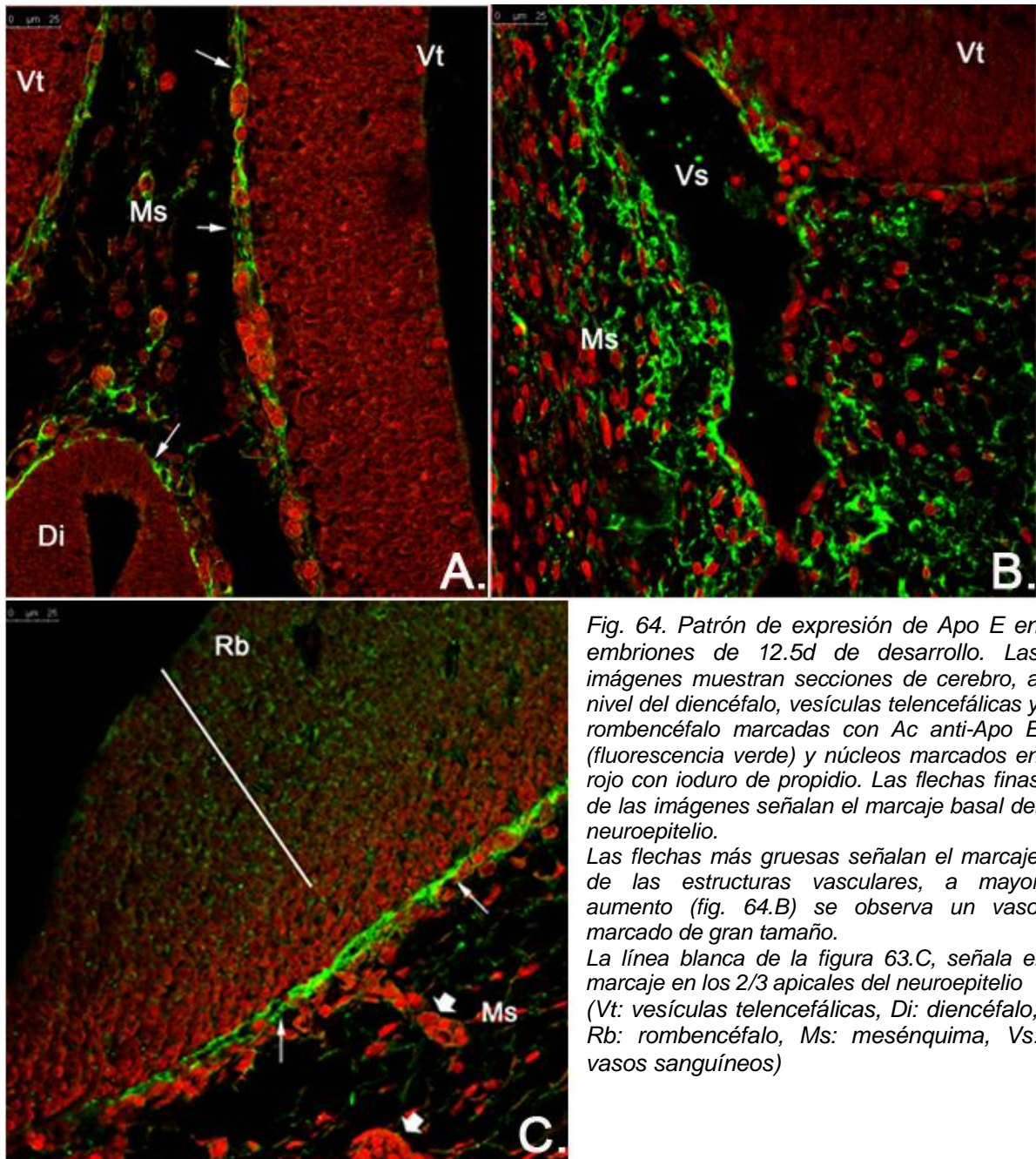


Fig. 64. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 12.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del diencéfalo, vesículas telencefálicas y rombencéfalo marcadas con Ac anti-Apo E (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con yoduro de propidio. Las flechas finas de las imágenes señalan el marcaje basal del neuroepitelio. Las flechas más gruesas señalan el marcaje de las estructuras vasculares, a mayor aumento (fig. 64.B) se observa un vaso marcado de gran tamaño. La línea blanca de la figura 63.C, señala el marcaje en los 2/3 apicales del neuroepitelio (Vt: vesículas telencefálicas, Di: diencéfalo, Rb: rombencéfalo, Ms: mesénquima, Vs: vasos sanguíneos)



3.4.5. EMBRIONES DE RATÓN DE 13.5 DÍAS p.c.

Finalmente, en el estadio de 13.5 días, en el que ya se aprecia la presencia de unos plexos coroideos bien desarrollados (Fig. 65.B), el patrón de expresión de Apo E, aun estando presente en la superficie apical del neuroepitelio, presenta variaciones sustanciales, especialmente por su expresión apical en las células de los plexos coroideos y por el notable incremento en el marcaje del material intracavitario.

En la figura 65.C se muestra una vista del mesénquima cercano al epitelio olfativo de las placodas olfatorias (PcO) y al romboencéfalo (Rb), marcado intensamente.

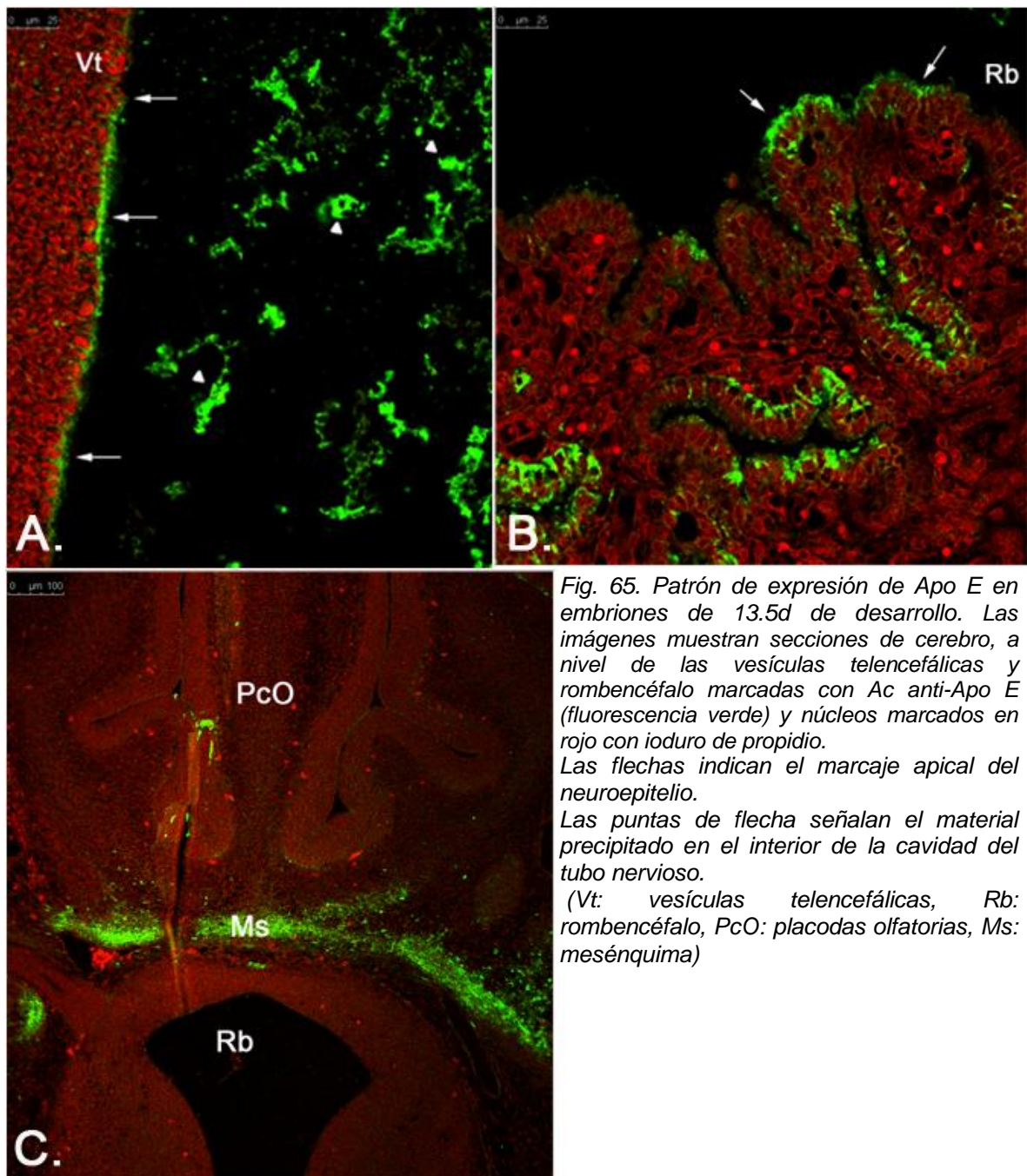


Fig. 65. Patrón de expresión de Apo E en embriones de 13.5d de desarrollo. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel de las vesículas telencefálicas y rombencéfalo marcadas con Ac anti-Apo E (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con ioduro de propidio. Las flechas indican el marcaje apical del neuroepitelio. Las puntas de flecha señalan el material precipitado en el interior de la cavidad del tubo nervioso. (Vt: vesículas telencefálicas, Rb: rombencéfalo, PcO: placodas olfatorias, Ms: mesénquima)

Con los resultados obtenidos podemos resumir que el patrón de expresión de Apo E en embriones de ratón de diferentes estadios de desarrollo difiere entre los estadios más tempranos con respecto al resto de estadios:

- La expresión de Apo E en los estadios más tempranos del desarrollo (9.5 y 10.5 días) es prácticamente nula en el neuroepitelio y únicamente aparece un marcaje muy tenue del mesénquima. Tampoco se aprecia un marcaje de material precipitado en el interior de la cavidad.
- En los estadios 11.5 y 12.5 días de desarrollo, se observa un marcaje apical del neuroepitelio, disperso y no muy intenso que abarca los 2/3 apicales en algunas zonas como el mesencéfalo y el rombencéfalo.
- En el estadio 13,5 días se observa un marcaje apical asociado a la superficie de las células neuroepiteliales, este marcaje es más intenso en los plexos coroideos.
- El material precipitado marcado en el interior de la cavidad comienza a ser visible en el estadio 11.5 días y aumenta en cantidad en el estadio de 13.5 días de desarrollo.
- En estadios más posteriores (11.5 días en adelante), se observa un marcaje basal del neuroepitelio y de las estructuras vasculares circundantes.
- Marcaje tenue del mesénquima.

### 3.5. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE APO M.

En el estadio 9.5 días de desarrollo, el inmunomarcaje con el anticuerpo Anti Apo M, se centra casi exclusivamente en un marcaje discreto, poco intenso y en muchas ocasiones discontinuo, de la superficie apical del neuroepitelio. Ocasionalmente, la apariencia es que solamente se marcan algunas de las células que conforman la capa superficial del neuroepitelio (Fig. 66.A y 66.B).

Este patrón de expresión se mantiene en cuanto a localización, pero va disminuyendo en intensidad en el resto de los estadios estudiados.

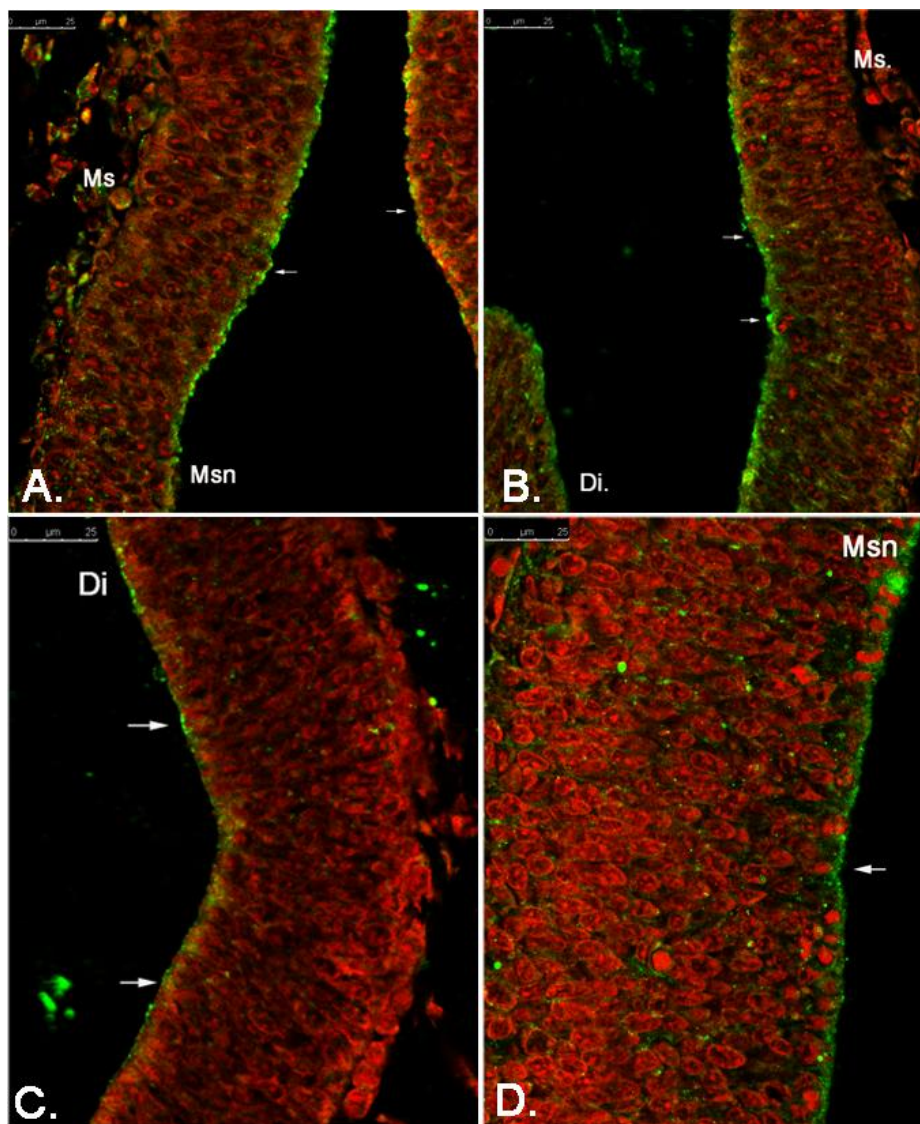


Fig. 66. Patrón de expresión de Apo M en embriones de ratón. Las imágenes muestran secciones de cerebro, a nivel del mesencéfalo y diencefalo, marcadas con Ac anti-Apo E (fluorescencia verde) y núcleos marcados en rojo con ioduro de propidio. La figura 66.A y 66.B se corresponden con embriones de 9.5 días de desarrollo, las flechas finas indican la presencia de algunas células superficiales marcadas. Las flechas de la figura 66.C, muestran un marcaje menos intenso del neuroepitelio en los embriones 10.5 días de desarrollo. La imagen 66.D se corresponde con un embrión de 11.5 d, la flecha indica el marcaje positivo del neuroepitelio. (Msn: mesencéfalo, Di: diencefalo, Mn. Mesénquima).

## 4. EXPERIMENTOS DE INMUNOBLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE APO B 48/100 EN EL CSF-E DE RATÓN.

Con objeto de comprobar el papel de la Apolipoproteína B 48/100 dentro del efecto general del CSF-E de ratón de 11.5 días de desarrollo, sobre el comportamiento de los precursores neuroepiteliales, hemos recurrido a una estrategia experimental basada en el cultivo organotípico de neuroepitelio y el inmunobloqueo de la actividad de Apo B 48/100.

### 4.1. ESTUDIO DEL ÍNDICE DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

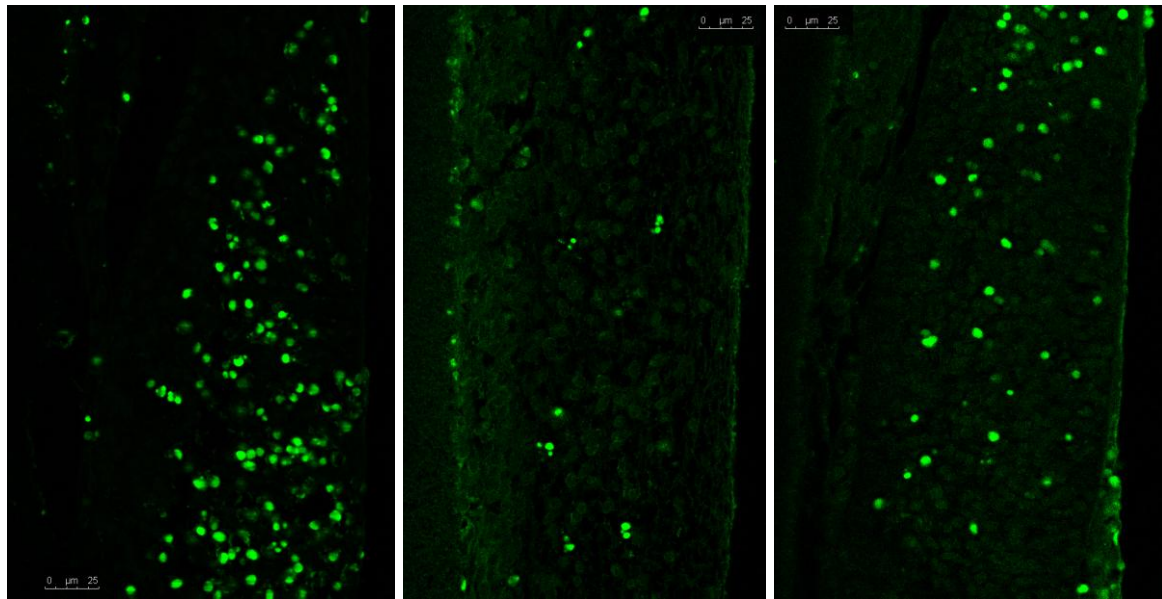
Uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación es comprobar si, al igual que ocurre en otros sistemas biológicos, las Apolipoproteínas del CSF-E están relacionadas con la supervivencia de los precursores neuroepiteliales. Para ello como hemos comentado previamente, desarrollamos dos abordajes experimentales, una el inmunobloqueo de la actividad de Apo B 48/100 en cultivos de neuroepitelio y el otro el empleo de ratones KO para Apo B-100.

Para determinar el nivel de apoptosis en el neuroepitelio en cada una de las condiciones experimentales, hemos valorado la apoptosis mediante la técnica de T.U.N.E.L., visualizada mediante un microscopio confocal (Leica TCS SPE), empleando en todos los casos la misma magnificación (40X).

Para valorar el índice de muerte celular programada (IMCP) en cada condición experimental, hemos realizado un estudio sobre 30 muestras distintas de, al menos, 3 experimentos diferentes, con objeto de asegurar la significatividad de los resultados.

En los cultivos control, es decir, con medio definido, se observa un intenso proceso de muerte celular distribuido por todo el neuroepitelio, mientras que en aquellos dónde se añadió medio de cultivo + CSF-E de ratón de 11.5 días, el grado de muerte celular se ve reducido hasta niveles equiparables a los que tienen lugar in vivo (véase gato et al 2005 y 2009) por lo que se puede deducir el CSF tiene un efecto neuroprotector. En los cultivos dónde se añadió medio de cultivo definido + CSF-E+ anti-Apo B (bloqueo de la Apo B) se observa una mayor muerte celular, de lo que se puede deducir que se inhibe parte de la acción protectora del CSF (Ver imagen 20).

Los datos obtenidos del recuento del número de células apoptóticas, revela que los datos son significativos y que por lo tanto el IMCP es significativamente menor en la condición medio+ CSF-E con respecto a las otras dos y a su vez la condición medio+ CSF-E+ Anti ApoB 48/100 es significativamente menor que la condición medio (Ver gráfico 1 y tabla 9).



MEDIO

MEDIO+CSF-E

MEDIO+CSF-E+ Anti Apo B

Imagen 1. Análisis del Índice de Muerte Celular Programada en Cultivo de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11.5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales. Los núcleos marcados en verde se corresponden con las células apoptóticas (valoración realizada mediante la técnica de T.U.N.E.L).

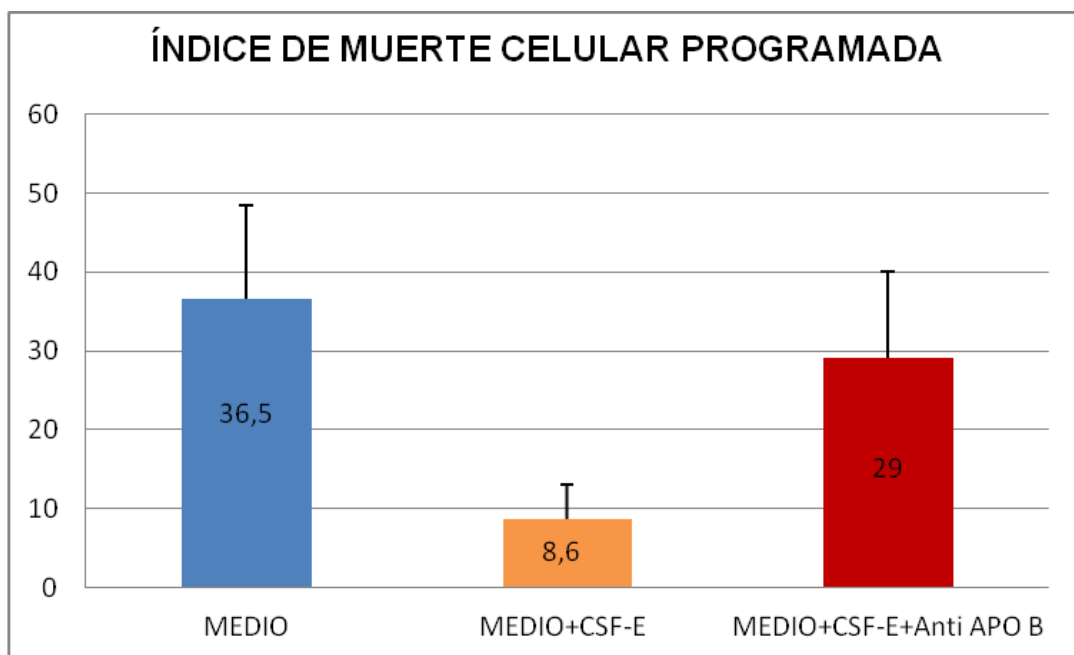


Gráfico 1. Índice de Muerte Celular Programada en Cultivos de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11,5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales.

ANOVA RESULTS				
No. of subjects:		90		
No. Of groups:		3		
GROUPS				
Name	N	Avg.	SD	
1. Medio	30	36,5	12,0193	
2. Medio+CSF-E	30	8,63	4,3429	
3. Medio+CSF-E+Anti ApoB 48/100	30	29,03	11,0343	
TEST FOR EQUAL VARIANCE				
F	DFn	DFd	P	
8,2483	2	87	0,00052	
ANALYSIS OF VARIANCE				
	SS	DF		
Between	12484,6222	2		
Within	8267,4333	87		
F	65,6891982			
P	4,1065E-18		***	
POSTHOC RESULTS: BONFERRONI-HOLM				
Group 1	Group 2	Result	P	Adj.
Medio	Medio+CSF-E	Significant	2,88E-17	0,0167
Medio+CSF-E	Medio+CSF-E+ Anti ApoB.	Significant	2,68E-13	0,025
Medio	Medio+CSF-E+ Anti ApoB.	Significant	0,01501	0,05

Tabla 9. Anova de las diferencias en el índice de muerte celular en las tres condiciones descritas:  $p < 0'05$  y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra que hay diferencias significativas entre las tres condiciones de cultivo.

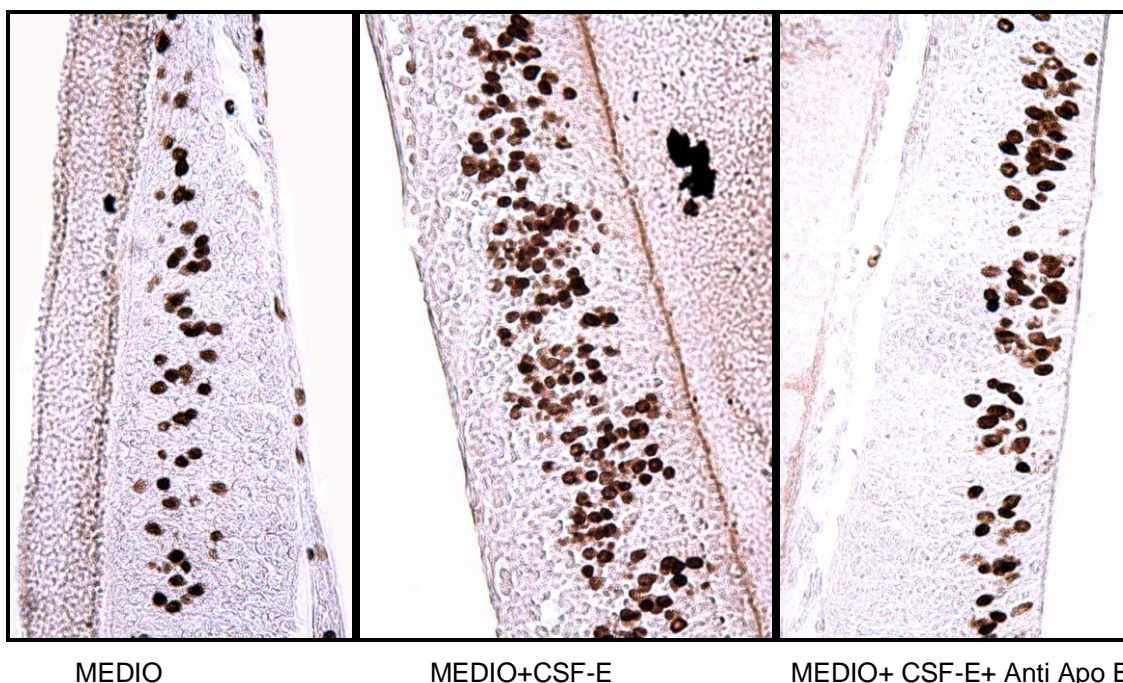
## 4.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR: CONTEO DE MITOSIS.

Para valorar la incidencia de cada condición experimental en la proliferación de las células neuroepiteliales en cada condición experimental, contamos con 90 muestras distintas de, al menos, tres experimentos diferentes por cada diseño experimental. Con el fin de determinar la variación en el patrón de síntesis de DNA realizamos un recuento del número de células neuroepiteliales cuyo núcleo resultó marcado con anticuerpo anti-BrdU (considerándose a dicha célula como positiva en este caso).

Con ayuda de un microscopio óptico Nikon Microphot-FXA y, empleando en todos los casos la misma magnificación (20X) para la obtención de cada campo, procedimos al recuento de núcleos teñidos considerados como positivos.

Los datos obtenidos y analizados estadísticamente muestran que existen diferencias significativas entre las tres condiciones, siendo las diferencias mayores entre el grupo tratado solo con medio con respecto a las otras dos condiciones (Ver gráfico 2 y tabla 10)

De los resultados obtenidos podemos deducir que, el bloqueo de Apo B produce una disminución significativa en la replicación celular, y además se verifica que el CSF-E actúa como un potente mitógeno de las células madre neuroepiteliales.



*Imagen 2. Análisis de la replicación celular en Cultivo de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11.5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales. Los núcleos marcados en marrón se corresponden con células en replicación (valoración realizada mediante la técnica de la BrdU).*

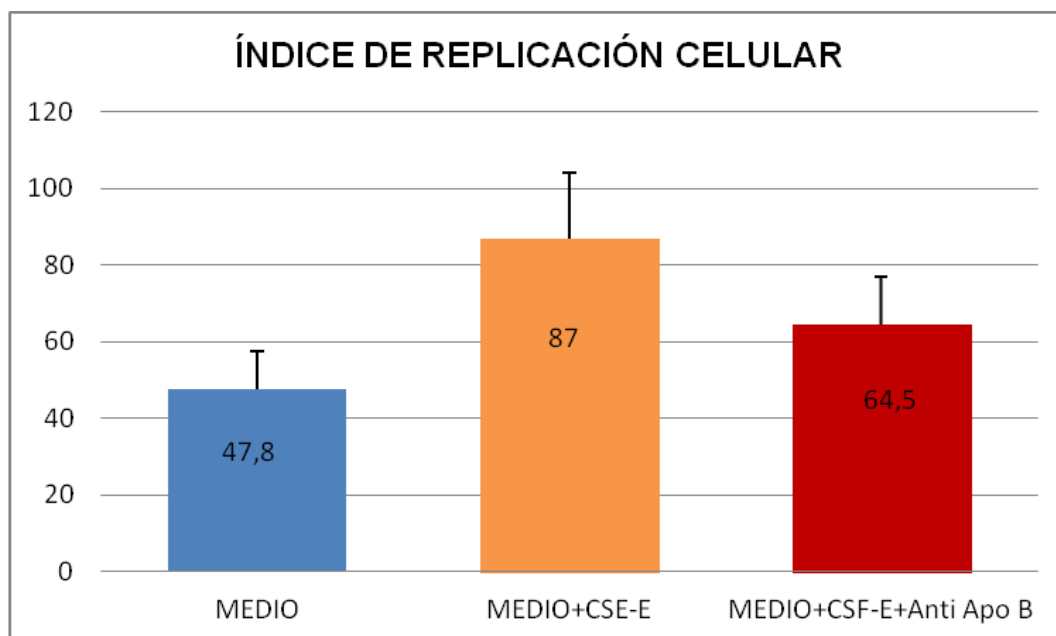


Gráfico 2. Índice de Replicación Celular en Cultivos de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11.5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales.

ANOVA RESULTS				
No. of subjects:	90			
No. Of groups:	3			
<b>GROUPS</b>				
<b>Name</b>	<b>N</b>	<b>Avg.</b>	<b>SD</b>	
1. Medio	30	47,73	9,7297	
2. Medio+CSF-E	30	86,96	17,223	
3. Medio+CSF-E+Anti ApoB 48/100	30	64,46	12,651	
<b>TEST FOR EQUAL VARIANCE</b>				
<b>F</b>	<b>DFn</b>	<b>DFd</b>	<b>P</b>	
4,3306	2	87	0,0161	
<b>ANALYSIS OF VARIANCE</b>				
	<b>SS</b>	<b>DF</b>		
Between	23217,8	2		
Within	15989,8	87		
<b>F</b>	63,1636			
<b>P</b>	1,1365E-17		***	
<b>POSTHOC RESULTS: BONFERRONI-HOLM</b>				
<b>Group 1</b>	<b>Group 2</b>	<b>Result</b>	<b>P</b>	<b>Adj.</b>
Medio	Medio+CSF-E	Significant	1,36E-15	0,0166
Medio+CSF-E	Medio+CSF-E+ Anti ApoB.	Significant	3,29E-07	0,025
Medio	Medio+CSF-E+ Anti ApoB.	Significant	3,76E-07	0,05

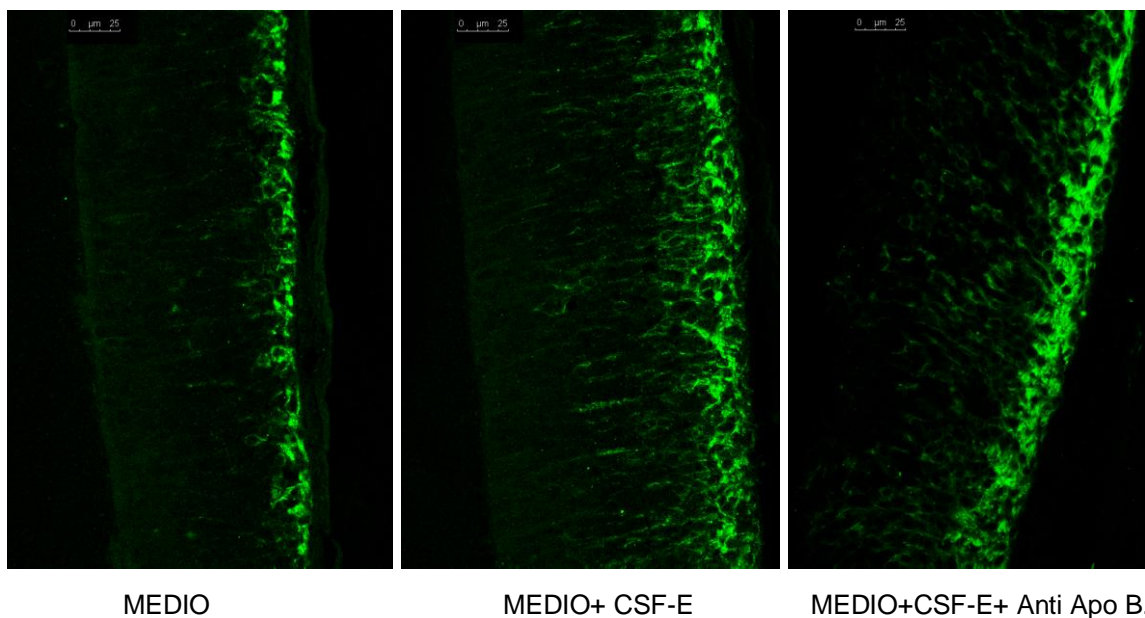
10 1 Tabla 10. Anova de las diferencias en el índice de proliferación celular en las tres condiciones descritas:  $p < 0,05$  y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra que las diferencias significativas se dan entre las tres condiciones de cultivo.



### 4.3. ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

Como ya hemos comentado en el material y métodos, la diferenciación neuronal se ha valorado mediante inmunodetección de microtúbulos citoplásmicos denominados  $\beta$ III-Tubulina y al igual que en el caso anterior, hemos obtenido imágenes tomadas con un microscopio confocal, empleando en todos los casos la misma magnificación (40X).

En cuanto a la diferenciación neuronal, se observa un menor índice de neurogénesis en los cultivos tratados solo con medio. En aquellos tratados con medio+CSF-E y medio+CSF-E+Anti Apo B 48/100 no se observan diferencias significativas por lo que el bloqueo de Apo B no produce una disminución estadísticamente significativa en la neurogénesis (Ver gráfico 3 y tabla 11).



*Imagen 3. Análisis del Índice de Diferenciación Neuronal en Cultivos de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11.5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales. Las células en diferenciación se encuentran marcadas en verde (valoración realizada mediante la técnica  $\beta$ III-Tubulina).*

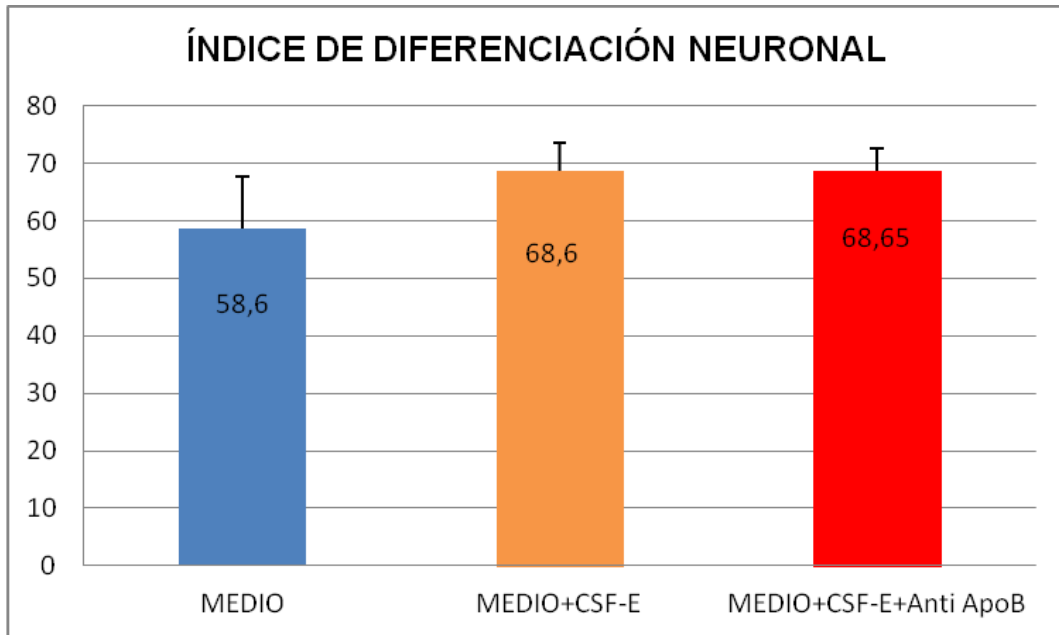


Gráfico 3. Índice de Diferenciación Celular en Cultivos de Neuroepitelio (CNE) de ratón de 11.5 días de desarrollo, en las diferentes condiciones experimentales.

ANOVA RESULTS				
<b>No. of subjects:</b>	60			
<b>No. Of groups:</b>	3			
<b>GROUPS</b>				
<b>Name</b>	<b>N</b>	<b>Avg.</b>	<b>SD</b>	
1. Medio	20	58,6	9,0635	
2. Medio+CSF-E	20	68,6	4,9247	
3. Medio+CSF-E+Anti ApoB 48/100	20	68,65	3,8426	
<b>TEST FOR EQUAL VARIANCE</b>				
<b>F</b>	<b>DFn</b>	<b>DFd</b>	<b>P</b>	
4,8888	2	57	0,01098	
<b>ANALYSIS OF VARIANCE</b>				
	<b>SS</b>	<b>DF</b>		
Between	1340,033	2		
Within	2302,15	57		
<b>F</b>	16,5892			
<b>P</b>	<b>2,0989E-6</b>	<b>***</b>		
<b>POSTHOC RESULTS: BONFERRONI-HOLM</b>				
<b>Group 1</b>	<b>Group 2</b>	<b>Result</b>	<b>P</b>	<b>Adj.</b>
Medio	Medio+CSF-E+ Anti ApoB.	Significant	5,106E-05	0,0166
Medio	Medio+CSF-E.	Significant	1,031E-04	0,025
Medio+CSF-E	Medio+CSF-E+ Anti ApoB.	No Significant	0,97163	0,05

Tabla 11. Anova de las diferencias en el índice de diferenciación neuronal en las tres condiciones descritas:  $p < 0'05$  y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra que las diferencias significativas se dan entre las condiciones Medio+ CSF-E - Medio y Medio+ CSF-E+ Anti ApoB – Medio.

## 5. ESTUDIO DEL NEUROEPITELIO DE EMBRIONES DE RATÓN K.O Apo B<sup>tm1Unc<sup>o</sup></sup>/J.

Para confirmar si la Apolipoproteína B altera el patrón de supervivencia, proliferación y diferenciación en las células neuroepiteliales del cerebro embrionario, se utilizaron ratones K.O Apo B<sup>tm1Unc<sup>o</sup></sup>/J. Esta mutación dirigida produce una forma truncada de la apoB 100, denominada ApoB 70. Los ratones homocigotos para la mutación, muestran una reducción en plasma de los niveles de ApoB, beta-lipoproteínas y del total del colesterol, junto con una elevada incidencia de exencefalia e hidrocefalia. Los ratones heterocigotos muestran un pequeño incremento sobre los wildtype en la incidencia de hidrocefalia.

Para llevar a cabo este estudio, obtuvimos embriones de ratón de 10,5 días p.c. Antes de ser fijados, se les cortaron las colas para su posterior genotipaje, seleccionando embriones +/- y +/+. Una vez procesados y cortados, se realizaron los siguientes análisis:

- Estudio del Índice de muerte celular programada.
- Estudio de la Proliferación Celular.
- Estudio del Índice de Diferenciación Neuronal.

### 5.1. ESTUDIO DEL ÍNDICE DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL NEUROEPITELIO CEREBRAL EMBRIONARIO.

Para determinar el papel de Apo B-100 en la supervivencia de las células neuroepiteliales de ambos tipos de embriones, hemos valorado la apoptosis mediante la técnica de T.U.N.E.L., visualizada mediante un microscopio confocal (Leica TCS SPE), utilizando siempre la misma magnificación (40X).

Para valorar el índice de muerte celular programada (IMCP) en mesencéfalo en cada condición experimental, contamos con 10 muestras distintas de, al menos 3, embriones diferentes de 10.5 días de desarrollo. Los embriones wildtype (+/+) se han usado como control y los embriones heterocigotos (+/-) se han usado como experimentales. Los embriones homocigotos (-/-) para la mutación son difíciles de obtener, ya que las hembras heterocigotas no se quedan preñadas, en caso de hacerlo la reabsorción de los embriones es alta y no hemos conseguido una muestra suficiente de éstos.

Los datos obtenidos del recuento del número de células apoptóticas en mesencéfalo, fueron analizados estadísticamente mediante una T de Student. Los resultados obtenidos revelan que las diferencias son significativas y que por lo tanto el IMCP es significativamente menor en los embriones +/+ que en los +/- (ver tabla 12 y gráfico 4).

En la imagen 23, se puede observar que el número de células apoptóticas (flechas) en la pared lateral del mesencéfalo en los embriones wildtype (+/+) es menor que en los embriones KO heterocigotos (+/-).

Estos resultados confirman los resultados obtenido en los cultivos, avalando el inmunobloqueo.

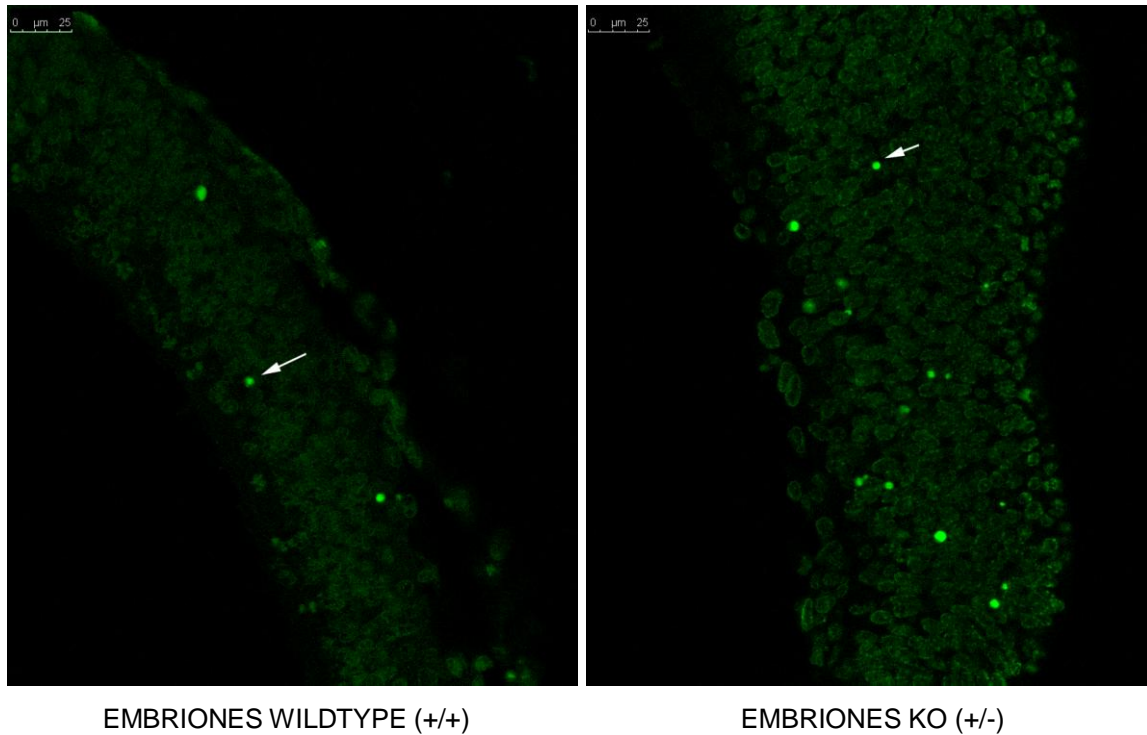


Imagen 4. Células apoptóticas en la pared lateral del mesencéfalo de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10.5 días. Los núcleos marcados en verde se corresponden con las células apoptóticas (valoración realizada mediante la técnica de T.U.N.E.L), las flechas señalan alguna de las células apoptóticas neuroepiteliales.

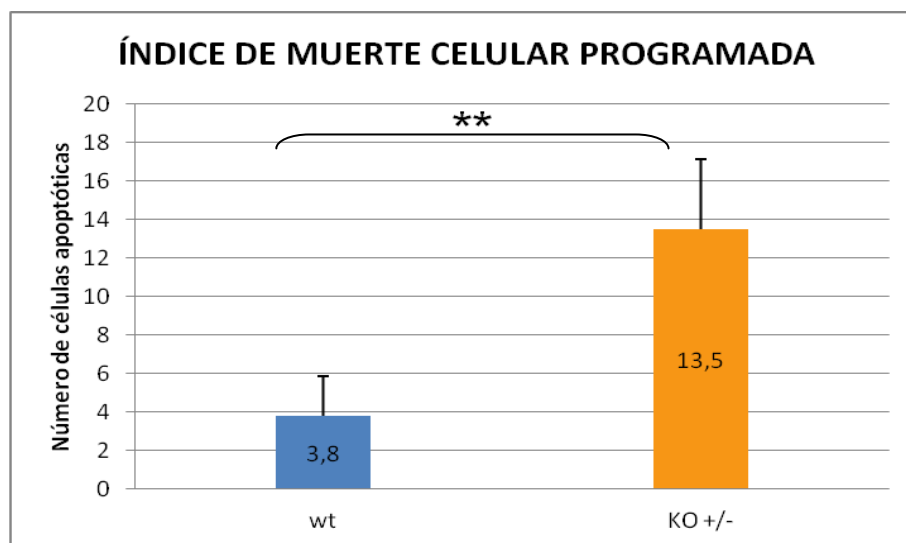


Gráfico 4. Índice de Muerte Celular programada en la pared mesencefálica de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10.5 días de desarrollo.

	wt	K.O +/-
<b>Nº de Células positivas</b>	3,8 ± 2,04*	13,5 ± 3,66*

Tabla 12. Resultados de la cuantificación de células en apoptosis en la pared lateral del mesencéfalo en embriones wildtype y KO heterocigotos en estadio 10.5d. (\*\*P valor<0,001, para una prueba T de Student de dos colas, tipo 3).

## 5.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL NEUROEPITELIO CEREBRAL EMBRIONARIO.

Para determinar el papel de Apo B-100 en la proliferación de las células neuroepiteliales de ambos tipos de embriones, hemos medido la expresión nuclear de PCNA, en este caso no hemos utilizado BrdU ya que a las ratonas preñadas no se les inyectó BrdU antes de la extracción de los embriones y por lo tanto las células neuroepiteliales no lo incorporan a su DNA.

Para la identificación de células PCNA positivas, hemos obtenido imágenes tomadas con un microscopio óptico Nikon Microphot-FXA y, empleando en todos los casos la misma magnificación (20X).

Para valorar la diferenciación neuronal en mesencéfalo en cada condición experimental, contamos con 10 muestras distintas de, al menos, 3 embriones diferentes de 10.5 días de desarrollo.

Los resultados muestran que los datos obtenidos no son significativos y por lo tanto no hay diferencias en el número de células en replicación entre los embriones wildtype (+/+) y los KO heterocigotos (+/-) (Ver gráfico 5, tabla 13 e imagen 24). Estos resultados podrían explicarse, teniendo en cuenta que los embriones KO heterocigotos muestran un pequeño incremento sobre los wildtype en la incidencia de hidrocefalia, esto explicaría que el índice de replicación sea similar en los dos casos. Si la expansión del cerebro es dependiente de la presión hidrostática, en respuesta al aumento de presión, las paredes de los ventrículos se expanden y por lo tanto es necesario que ocurra un aumento de la población celular del neuroepitelio, aumentando así la densidad mitótica (Desmond et al., 2005).



Imagen 5. Células neuroepiteliales en replicación en la pared lateral del mesencéfalo de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10.5 días. Los núcleos marcados en marrón se corresponden con células en replicación (valoración realizada mediante la técnica de la PCNA). Las flechas indican núcleos en replicación.

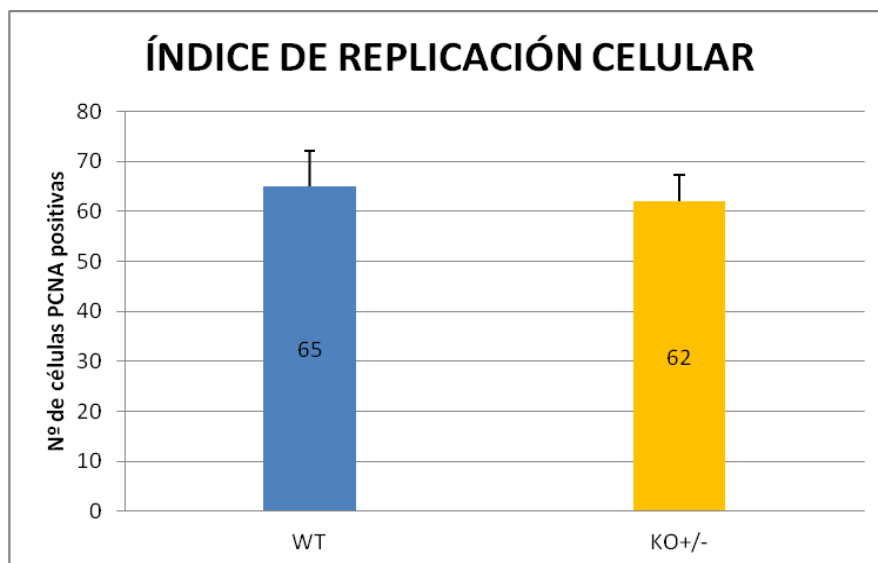


Gráfico 5. Índice de Replicación Celular de las células neuroepiteliales en la pared mesencefálica de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10.5 días de desarrollo.

	wt	K.O +/-
<b>Nº de Células PCNA positivas</b>	65± 7,11*	62± 5,28*

Tabla 13. Resultados de la cuantificación de células neuroepiteliales en replicación en la pared lateral del mesencéfalo en embriones KO heterocigotos en estadio 10.5d. (P valor > 0,05, para una prueba T de Student de dos colas).

### 5.3. ESTUDIO DEL ÍNDICE DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN EL NEUROEPITELIO CEREBRAL EMBRIONARIO.

Para la identificación de las células  $\beta$ -III-Tubulina positivas y al igual que en el caso anterior, hemos obtenido imágenes tomadas con un microscopio confocal (Leica TCS SPE), utilizando siempre la misma magnificación (40X).

Para valorar la diferenciación neuronal en mesencéfalo en cada condición experimental, contamos con 10 muestras distintas de, al menos, 3 embriones diferentes de 10.5 días de desarrollo.

Los datos obtenidos del recuento del número de células en diferenciación en mesencéfalo, fueron analizados estadísticamente mediante una T de Student. Los resultados obtenidos revelan que los datos son significativos y que por lo tanto el índice de diferenciación neuronal es significativamente mayor en el mesencéfalo de los embriones wildtype (+/+) que en los embriones KO heterocigotos (+/-) (Ver gráfico 6 y tabla 14).

En la imagen 25, se puede observar que el número de células en diferenciación en la pared del neuroepitelio (flechas) en los embriones de ratón wildtype (+/+) (Imagen 25. A) es significativamente mayor que en los embriones KO heterocigotos (+/-) (Imagen 25. B). Se observa que el número de células en diferenciación es más homogéneo a lo largo de la pared del mesencéfalo en los embriones wildtype.

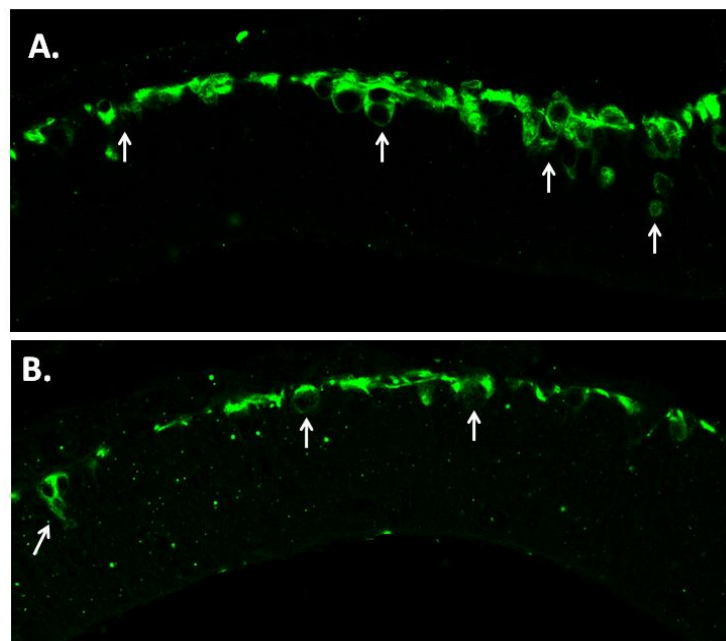


Imagen 6. Células neuroepiteliales en diferenciación en la pared lateral del mesencéfalo de embriones de ratón wildtype (A) y KO heterocigotos (B) de 10.5 días. Las células en diferenciación se encuentran marcadas en verde (valoración realizada mediante la técnica  $\beta$ III-Tubulina). Las flechas indican alguna de las células en diferenciación.

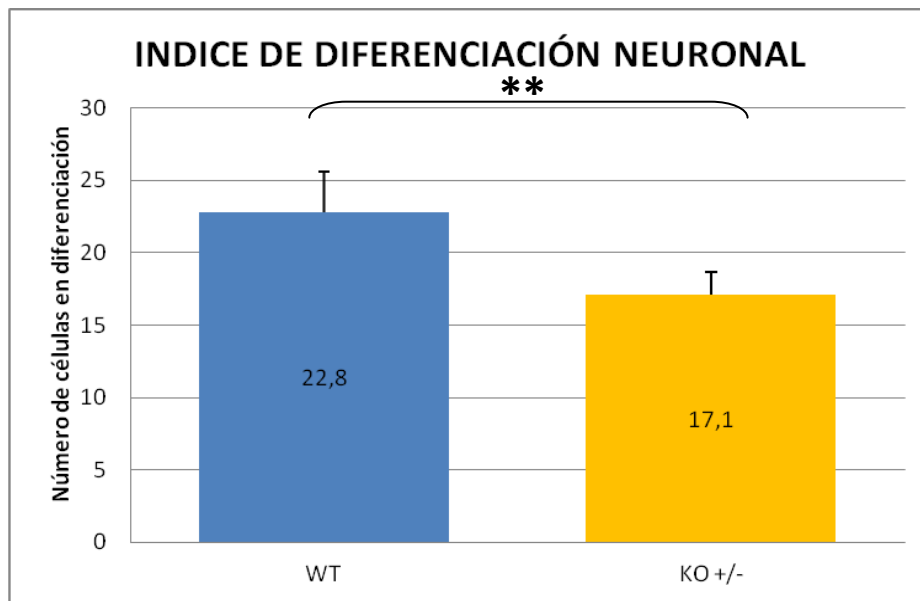


Gráfico 6. Índice de Diferenciación Neuronal en la pared mesencefálica de embriones de ratón wildtype y KO heterocigotos de 10.5 días de desarrollo.

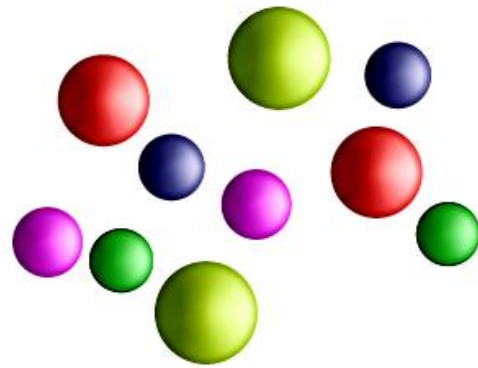
	wt	K.O +/-
<b>Nº de Células <math>\beta</math>-III-Tubulina positivas</b>	22,8 $\pm$ 2,78*	17,1 $\pm$ 1,52*

Tabla 14. Resultados de la cuantificación de células neuroepiteliales en diferenciación en la pared lateral del mesencéfalo en embriones wildtype y KO heterocigotos en estadio 10.5d. (\*\*P valor<0,001, para una prueba T de Student de dos colas).





# DISCUSIÓN



*“Lo que oyes lo olvidas, lo que ves lo recuerdas, lo que haces lo aprendes.”*

*Proverbio chino*



## 1. EL CSF-E DE RATÓN CONTIENE UN PATRÓN COMPLEJO DE APOLIPOPROTEÍNAS.

La inmunodetección realizada mediante la técnica de western-blot en el CSF-E de embriones de ratón en fases tempranas del desarrollo embrionario, demuestra la presencia de Apo B 48/100, Apo AI, Apo AIV, Apo E y Apo M, siendo mayoritaria la presencia de Apo B48/100, Apo AI y Apo AIV (ver figura 46).

Existen datos previos en la literatura que demuestran la presencia de apolipoproteínas en el CSF durante el desarrollo embrionario en diversas especies como el pollo (Parada et al., 2006) y la rata (Parada et al., 2005b). Nuestros resultados demuestran que en otras especies de roedores como es el ratón, el CSF-E también contiene estas moléculas, lo cual apoya la teoría de que la presencia de estas moléculas en el CSF durante el desarrollo cerebral podría ser un factor filogenéticamente constante. Por otra parte, tanto el tipo de apolipoproteínas como su concentración relativa valorada mediante WB (ver figura 40 y 46) demuestran que hay una práctica coincidencia en la composición de apolipoproteínas en el CSF-E de rata y ratón, que como se ha demostrado previamente presentan una diferencia sustancial con la composición de apolipoproteínas del CSF-E de pollo (Parada et al., 2005b). Estos datos vienen a confirmar nuestra hipótesis previa de que existe una evolución filogenética en la composición del CSF-E que probablemente está relacionada con el distinto grado de desarrollo funcional que alcanza el cerebro en las distintas especies. Finalmente no existen datos en la bibliografía acerca de estas apolipoproteínas en el CSF-E en humanos, sin embargo el trabajo de Zapatterra et al., 2007 sugiere que por la similitud en la composición de este fluido en ambas especies, las apolipoproteínas podrían estar presentes también en el fluido cerebroespinal embrionario humano.

## 2. LOS PRECURSORES NEUROEPITELIALES DEL CEREBRO EMBRIONARIO EXPRESAN LAS APOLIPOPROTEÍNAS PRESENTES EN EL CSF-E.

Los resultados aportados en la presente tesis doctoral demuestran que las apolipoproteínas detectadas en el CSF-E están también presentes en el neuroepitelio de las diferentes cavidades cerebrales de embriones de ratón de diferentes estadios, Además las diferencias cuantitativas en la expresión de Apolipoproteína en el neuroepitelio cerebral se corresponden con las diferencias de concentración observadas mediante la técnica de WB, por lo tanto parece existir una correlación directa entre el CSF-E y el neuroepitelio que podría estar relacionada con la función biológica de las Apolipoproteinas en el desarrollo cerebral. En este sentido nuestros datos están apoyados por la descripción previa de otros autores, de la expresión de distintas apolipoproteínas en el neuroepitelio cerebral durante el desarrollo en especies tan distantes como el pez cebra (Babin et al., 1997), el pollo (Parada et al., 2008a) y el ratón (Sánchez et al., 2002). Estos datos, al igual que los del párrafo anterior, vienen a demostrar que la expresión de apolipoproteínas durante el desarrollo cerebral embrionario, parece ser un factor filogenéticamente constante. Al mismo tiempo nuestros resultados aportan un patrón de expresión de diversas apolipoproteinas en el desarrollo temprano del cerebro embrionario de ratón.

El análisis del patrón de expresión de las diferentes Apolipoproteinas, indica que existen diferencias significativas tanto en el patrón de expresión temporal como en el espacial, de hecho las dos apolipoproteínas mayoritarias, Apo AI y Apo B tienen un patrón de expresión temprana (9.5 días) que se incrementa a los 11.5 días y decae a los 13.5 días coincidiendo con una aparente incremento en la concentración de estas apolipoproteínas en el CSF-E. En el caso de Apo AIV y Apo E no se aprecia un marcaje específico hasta el estadio 11.5 y el de Apo M aparece en estadios tempranos, 9.5 días y va disminuyendo en intensidad en los estadios posteriores.

Esto sugiere que existen mecanismos en el cerebro en desarrollo capaces de regular ontogénicamente y de forma diferencial la expresión de las distintas apolipoproteínas.

Otro dato interesante obtenido a partir del análisis del patrón de expresión es la localización espacial de las distintas apolipoproteínas dentro del neuroepitelio. En este sentido parece existir distintos patrones, específicos de cada apolipoproteína, que podrían estar relacionados con diferencias en su función biológica. Los patrones menos específicos

corresponden a la apolipoproteína AIV que se expresa fundamentalmente en la porción apical del neuroepitelio, con un marcaje intenso y continuo. La apolipoproteína E se expresa fundamentalmente en la porción basal aunque hay una tenue expresión en la mitad apical del neuroepitelio y Apo M, cuya expresión es fundamentalmente apical y que disminuye según avanza el desarrollo cerebral. Por otro lado, tanto Apo B como AI, que son como ya hemos comentado las de mayor concentración en CSF-E y en el neuroepitelio, presentan un patrón de expresión más complejo, de forma que su expresión a nivel de la membrana basal incluyendo los vasos adheridos a ella y el mesénquima, es intensa, además presentan un marcaje apical intenso y ocasionalmente discontinuo, en el que se aprecian formaciones esféricas intensamente marcadas que muestran distinto grado de desprendimiento y que aumentan aparentemente según progresa el desarrollo. Por último y de forma característica, se aprecia un marcaje citoplásmico apical cuyo grosor llega a ser mayor en la Apolipoproteína B, abarcando de seis a ocho niveles de núcleos en algunas vesículas cerebrales, que en la apolipoproteína AI que solo alcanza dos o tres niveles de núcleos marcados. Estos datos sugieren, intensamente, la existencia de un proceso dinámico de transición entre el neuroepitelio y la cavidad por parte de estas apolipoproteínas cuya direccionalidad no podemos aclarar en nuestro estudio ya que si bien el trabajo de Bachy et al. 2008, indica que existen procesos endocitóticos de internalización de apolipoproteínas en las células neuroepiteliales, lo cual hablaría a favor de una dirección CSF-E-neuroepitelio, existen otros autores (Alonso et al., 1998, Corbeil et al., 2010, Marzesco et al., 2005., y Parvas y Bueno, 2009) que demuestran que el neuroepitelio tiene mecanismos de transporte y secreción de partículas hacia la cavidad y por tanto hacia el CSF-E (Ver figura 15), lo cual es más probable, teniendo en cuenta que la cavidad cerebral es una estructura sellada y aislada del exterior por la superficie apical de las células neuroepiteliales.

Por otra parte las imágenes del marcaje citoplásmico tanto de Apo B como de Apo AI en las células localizadas en la parte más próxima a la superficie apical y la ausencia de marcaje en el resto, sugieren un proceso de síntesis y secreción local por parte de las células neuroepiteliales similar al descrito por Gato et al., 1993 y Alonso et al., 1998 para otras moléculas presentes en el CSF-E. En este sentido Parvas et al., 2008 han descrito la existencia de un área en el neuroepitelio mesen-prosencefálico ventral encargada del transporte de moléculas presentes en el CSF-E desde los vasos sanguíneos periféricos adheridos al neuroepitelio, sugiriendo un mecanismo de transporte trans o paracelular. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las moléculas del CSF-E pueden tener un doble origen por transporte transneuroepitelial y por síntesis y secreción apical.

### 3. EL CSF-E REGULA DE FORMA DIFERENCIAL EL COMPORTAMIENTO DE LOS PRECURSORES NEUROEPITELIALES.

Dentro del amplio rango de apolipoproteínas detectadas durante el desarrollo del cerebro embrionario, hemos centrado nuestro estudio en el papel biológico que juega la apolipoproteína B en la regulación del comportamiento de los precursores neuroepiteliales. La elección de esta apolipoproteína se ha basado en que es una de las que presentan mayor concentración en el CSF-E, tiene un patrón de expresión neuroepitelial complejo y ha sido directamente relacionada con el correcto desarrollo del esbozo cerebral (Homanics et al., 1995). Además existen antecedentes bibliográficos que relacionan a la apolipoproteína B con la inhibición de procesos de muerte celular programada (Farese et al., 1995, Bereczki et al., 2008). En consecuencia la parte experimental de nuestro estudio se ha centrado en determinar el papel de la apolipoproteína B del CSF-E en el proceso de supervivencia de los precursores neuroepiteliales durante el desarrollo del cerebro embrionario de ratón. La estrategia experimental de nuestro estudio se ha basado en el empleo conjunto de dos técnicas orientadas a bloquear la actividad de esta apolipoproteína. Por una parte hemos empleado el cultivo organotípico de neuroepitelio con inmunobloqueo de la actividad Apo B en el CSF-E y por otra parte embriones KO para la apolipoproteína B.

El cultivo de neuroepitelio de cerebro de ratones de 11.5 días de desarrollo, demuestra que el inmunobloqueo selectivo de la actividad de apo B, aumenta de forma significativa el proceso de muerte celular programada al mismo tiempo que produce una disminución significativa de la replicación y no altera el proceso de neurogénesis.

El estudio del neuroepitelio cerebral de los embriones de ratón KO heterocigotos para la apolipoproteína B, confirma el aumento significativo del proceso de muerte celular programada de los precursores neuroepiteliales, sin embargo en este caso no se altera el proceso de replicación celular y disminuye discreta pero significativamente la neurogénesis.

Estos resultados nos llevan a pensar que el efecto principal producido por el inmunobloqueo de la actividad apo B en el desarrollo cerebral es un incremento del número de núcleos apoptóticos, mientras que las diferencias en la influencia sobre la replicación y la neurogénesis, pueden ser una consecuencia del incremento de células

apoptóticas o bien estar condicionadas por la duración de la privación de apo B en cada una de las técnicas.

Según nuestros datos, parece existir una relación directa entre la actividad de la apolipoproteína B del CSF-E y el proceso de supervivencia de las células neuroepiteliales. En este sentido se ha demostrado que, el fluido cerebroespinal embrionario ejerce un efecto trófico sobre los precursores neuroepiteliales que se pone de manifiesto por su capacidad de favorecer la supervivencia celular, activar la replicación e inducir la neurogénesis (Gato et al., 2005, Martín et al., 2009, Lhetinen y Walsh, 2011). No obstante dada la compleja composición del CSF-E, se ha planteado la posibilidad de que cada una de estas acciones (supervivencia, replicación y neurogénesis) sea debida a la presencia de mecanismos específicos para cada una de ellas (Gato y Desmond, 2009; Panchision y McKay, 2002). En este sentido el FGF-2 y el IGF-1, presentes en el CSF, han sido implicados como responsables de la actividad mitogénica de este fluido en estadios embrionarios (Martín et al., 2006; Lhetinen et al., 2011) y fetales (Miyama et al., 2006). Igualmente, se han identificado componentes del CSF-E como la RBP y el retinol que están implicados en la regulación de la síntesis de un potente factor neurogénico, como es el ácido retinoico en las células neuroepiteliales (Parada et al., 2008b y Alonso et al., 2011). Hasta el momento no se habían identificado factores concretos presentes en el CSF-E implicados en el mantenimiento de la supervivencia celular. Nuestros resultados demuestran que, al menos una de las apolipoproteínas mayoritarias del CSF-E de ratón está relacionada con dicho proceso, sin perjuicio de que otros autores relacionen estas moléculas del CSF-E con el proceso de diferenciación neural temprana a través de su relación con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Parada et al., 2008a). Dada la compleja composición del CSF-E, la identificación de los factores específicos implicados en los diferentes procesos regulados por el CSF, es imprescindible para el futuro desarrollo del CSF-E como herramienta terapéutica.

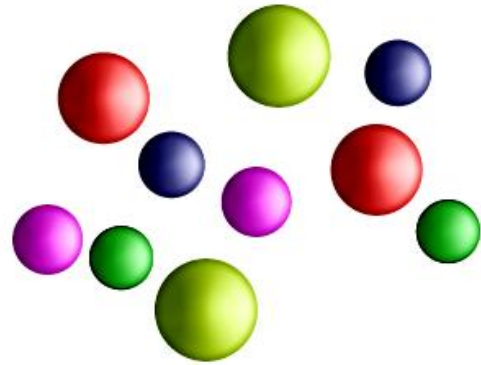


#### 4. EL ESTRÉS OXIDATIVO ES UN POSIBLE MECANISMO DE ACTUACIÓN EN LA INHIBICIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA POR PARTE DE APO B.

Una vez establecida la relación entre la apolipoproteína B del CSF-E y el proceso de supervivencia celular de los progenitores neurales, cabe plantearse a través de qué mecanismos ejerce dicha actividad. A pesar de que existe una gran cantidad de estudios científicos que relacionan a las apolipoproteínas con el transporte de moléculas lipídicas, vitaminas, etc., en la actualidad existe suficiente base bibliográfica para establecer una relación directa entre apolipoproteínas y supervivencia celular a través del control de los procesos REDOX, conocidos como estrés oxidativo. El estrés oxidativo produce la formación de una serie de radicales libres, capaces de interferir con el metabolismo celular y desencadenar un proceso de muerte celular programada (Liu et al., 2009). Al mismo tiempo la relación apolipoproteína-estrés oxidativo-muerte celular, ha sido establecida tanto para la apolipoproteína D (Ganfornina et al., 2008), la apolipoproteína E (Pedersen et al., 2000; Mahley et al., 2006, Bu et al., 2009), la apolipoproteína AIV (Spaulding et al., 2006), por lo que cabe pensar que la apolipoproteína B puede estar también relacionada con estos procesos, sin embargo la confirmación de este mecanismo de acción requiere de estudios complementarios que se escapan del ámbito de trabajo de esta tesis doctoral.

Existen en la bibliografía numerosos datos que relacionan al estrés oxidativo con la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas (Mattson et al., 1998; Hayashi, 2009; Mohsenzadegan y Mirshafiey, 2012), a su vez, también existen datos que relacionan las alteraciones en los niveles de apolipoproteínas con procesos neurodegenerativos (Mahley et al., 2006,2009; Pedersen et al., 2000). En este sentido y a pesar de que diversos trabajos han relacionado la alteración de las apolipoproteínas con los depósitos de B-amiloide (Bu et al., 2009; Fazekas et al., 2006), también existe soporte bibliográfico que afirma que el mecanismo de actuación de las apolipoproteínas en las enfermedades neurodegenerativas es a través de su influencia en la formación de radicales libres y su influencia directa en la neurodegeneración (Bu et al., 2009; Mahley et al., 2006, 2009; Pedersen et al., 2000; Bajo-Grañeras et al., 2011). Teniendo en cuenta estas últimas consideraciones podemos concluir que nuestro estudio deja abierta la posibilidad de que el CSF-E a través de su composición apolipoproteica pueda ser la base de una estrategia terapéutica basada en mecanismos de neuroprotección.

# CONCLUSIONES



*“Lo más importante es no dejar de hacerse preguntas”*

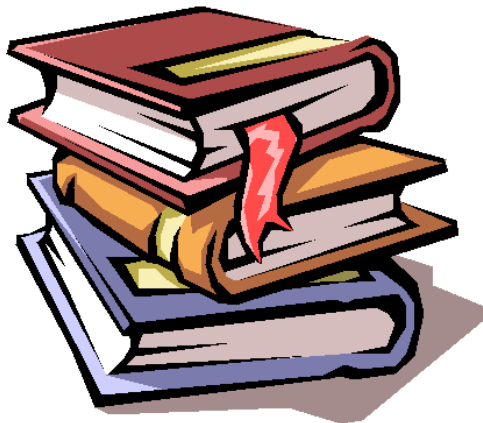


### CONCLUSIONES.

- Las apolipoproteínas presentes en el CSF-E de rata, Apo B, Apo AI, Apo AIV, Apo E y Apo M, se encuentran presentes en el CSF-E de ratón.
- Las apolipoproteínas más abundantes en el CSF-E de ratón son la apolipoproteína B 48/100 y la apolipoproteína AI.
- Nuestro estudio muestra la presencia de estas apolipoproteína en el neuroepitelio y su patrón temporo-espacial de expresión en el cerebro embrionario y sugiere un mecanismo de síntesis y secreción apical.
- El bloqueo de la actividad biológica de la apolipoproteína B afecta de forma significativa al proceso de supervivencia celular de los progenitores neurales.
- El posible mecanismo de actuación de Apo B sería en base a su influencia sobre el proceso de estrés oxidativo.
- Los resultados de este estudio, permiten afirmar que el fluido cerebroespinal embrionario, controla el proceso de supervivencia celular de los progenitores neuronales, a través de mecanismos específicos.
- El control de la muerte celular por parte de las apolipoproteínas del CSF-E puede ser de utilidad terapéutica como mecanismo de neuroprotección.



# BIBLIOGRAFÍA





**BIBLIOGRAFÍA.**

001. ABERCROMBIE M. (1970). Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro*, **6**: 128–142.
002. ALONSO M.I, MORO J.A., MARTIN P., BARBOSA E., GATO A. (2000). Enzymatic digestion of neural tube fluid proteoglycans leads to brain growth disruption. *Eur. J. Anat.*, **4**(3): 161–167.
003. ALONSO M.I., GATO A., MORO J.A., BARBOSA E. (1998). Disruption of proteoglycans in neural tube fluid by  $\beta$ -d-xyloside alters brain enlargement in chick embryos. *Anat. Rec.*, **252**: 499-508.
004. ALONSO M.I., GATO A., MORO J.A., MARTIN P., BARBOSA E. (1999). Involvement of sulfated proteoglycans in embryonic brain expansion at earliest stages of development in rat embryos. *Cells Tissues Organs*, **165**: 1–9
005. ALONSO M.I., MARTÍN C., CARNICERO E., BUENO D., GATO A. (2011). Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Dev. Dyn.*, **240** (7): 1650-1659.
006. ÁLVAREZ-BUYLLA A., GARCÍA-VERDUGO J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.*; **22** (3): 629-634. (Review).
007. ANDERSEN J.F., GUDDERRA N.P., FRANCISCHETTI M.I., RIBEIRO J.M. (2005). The role of salivary lipocalinas in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **58** (2): 97-105.
008. BABIN P.J., THISSE C., DURLIAT M., ANDRE M., AKIMENKO M.A., THISSE B. (1997). Both apolipoprotein E and AI genes present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 8622-8627.
009. BACHY I., KOZYRAKI R., WASSEF M. (2008). The particles of the embryonic cerebrospinal fluid: how could they influence brain development? *Brain Res. Bull.*, **75**: 289–294.



010. BAJO-GRAÑERAS R., SANCHEZ D., GUTIERREZ G., GONZÁLEZ C., DO CARMO S., RASSART E., GANFORNINA M.D. (2011). Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. *J. Neurochem.*, **117** (6): 949-960.
011. BELLOSTA S., NATHAN B.P., ORTH M., DONG L.M., MAHLEY R.W., PITAS R.E. (1995). Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, **10**: 27063-27071.
012. BEREZKI E., BERNÁT G., CSONT T., FERDINANDY P., SCHEICH H., SÁNTHA M. (2008). Overexpression of human apolipoprotein B-100 induces severe neurodegeneration in transgenic mice. *J. Proteome. Res.*, **7** (6): 2246-2252.
013. BICK M.D., DAVIDSON R.L. (1974). Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 2082–2208.
014. BIRGE W.J., ROSE A.D., HAYWOOD J.R., DOOLIN P.F. (1974). Development of the blood-cerebrospinal fluid barrier to proteins and differentiation of cerebrospinal fluid in the chick embryo. *Dev. Biol.*, **41**: 245–254.
015. BORG D.C. (1993). Oxygen free radicals and tissue injury. In oxygen free radicals in tissue damage. Tarr M and Samson, eds., **1**: 12-53
016. BORGENS B., SHI R. (1995). Uncoupling histiogenesis from morphogenesis in the vertebrate embryo by collapse of the transneuronal tube potential. *Dev. Dyn.*, **203**: 456-467.
017. BROWN N.A., FABRO S. (1981). Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology.*, **24**(1):65-78.
018. BU G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**(5):333-344 (Review).
019. BURDON R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad. Biol.*, **18**: 775-794.

020. BURDON R.H., GILL V., RICE-EVANS C. (1989). Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun*, **6**: 345-350.
021. BURGESS W.H., MACIAG T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 575-606.
022. CADET J.L. (1988). Free radical mechanisms in the central nervous system: An overview. *Int. J. Neurosc.*, **40**: 13-8.
023. CARNICERO E., GARRIDO J.J., ALONSO M.T., SCHIMMANG T. (2001). Roles of fibroblast growth factor 2 during innervation of the avian inner ear. *J. Neurochem.*, **77**: 786-795
024. CHECIU I., PRELIPCEANU O., POPESCU O. (1984). The role of cerebrospinal fluid during embryonic development. A biochemical study. *Morphol. Embryol. (Bucur)*, **30**: 243-250.
025. COLAS J.F., SCHOENWOLF G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn.*, **221** (2): 117-45. (Review).
026. CORBEIL D., MARZESCO A.M., WILSCH-BRÄUNINGER M., HUTTNER W.B. (2010). The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Lett.*, **584** (9): 1659-1664
027. CRAIG C.G., TROPEPE V., MORSHEAD C.M., REYNOLDS B.A., WEISS S., VAN DER KOOY D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J. Neurosci.*, **16** (8): 2649-2658.
028. CUMSEE C., LANDSHAMER S. (2006). Molecular insights into mechanism of cell death program: role in the progression of mitochondrial neurodegenerative disorders. *Curr. Alzheimer Res.*, **3**: 269-283.

029. DASURI K., ZHANG L., KELLER J.N. (2012). Oxidative Stress, Neurodegeneration, and the Balance of Protein Degradation and Protein Synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
030. DE PAZ F. (1999). Morphometric study of the brain expansion in birds and mammals. Doctoral thesis presented to the Faculty of Medicine, University of Valladolid, Valladolid, Spain, 223 pp.
031. DESMOND M.E. (1982). Description of the occlusion of the lumen of the spinal cord in early human embryos. *Anat. Rec.*, **204**: 89–93.
032. DESMOND M.E., DUZY M.J., FEDERECI B.D. (1993). Second messenger regulation of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo. *Dev. Dyn.*, **197**: 291–306.
033. DESMOND M.E., FIELD M.C. (1992). Evaluation of neural fold fusion and coincident initiation of spinal cord occlusion in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, **319** (2): 246-60.
034. DESMOND M.E., JACOBSON A.G. (1977). Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure. *Develop. Biol.*, **57**: 188-198.
035. DESMOND M.E., LEVITAN M.L. (2002). Brain expansion in the chick embryo initiated by experimentally produced occlusion of the spinal neurocoel. *Anat. Rec.*, **268** (2): 147-59.
036. DESMOND M.E., LEVITAN M.L., HAAS A.R. (2005). Internal luminal pressure during early chick embryonic brain growth: descriptive and empirical observations. *Anat. Rec.*, **285A**: 737–747.
037. DESMOND M.E., O'RAHILLY R. (1981). The growth of the human brain during the embryonic period proper. *Anat. Embryol.*, **162**: 137–151.
038. DESMOND M.E., SCHOENWOLF A.G. (1985). Timing and positioning of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, **235**: 479–487.
039. DESMOND M.E., SCHOENWOLF A.G. (1986). Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **97**: 26-46.

040. DHIKAV V., ANAND K. (2011). Potential predictors of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*, **28** (1): 1-11.
041. DONO R., TEXIDO G., DUSSEL R., EHMKE H., ZELLER R. (1998) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *Embo. J.*, **17** (15): 4213-4225.
042. DRECHSEL D.A., PATEL M. (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **44** (11): 1873-1886.
043. DZIEGIELEWSKA K.M., EVANS C.A.N., FOSSAN G., MALINOWSKA D.H., MOLLGARD K., REYNOLDS M.L., SAUNDERS N.R. (1980b). Blood-cerebrospinal fluid transfer of plasma proteins during fetal development in the sheep. *J. Physiol.*, **300**: 457-465.
044. DZIEGIELEWSKA K.M., EVANS C.A.N., FOSSAN G., LORSCHIEDER F.L., MALINOWSKA D.H., MOLLGARD K., REYNOLDS M.L., SAUNDERS N.R., WILKINSON S. (1980a). Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal sheep during development. *J. Physiol.*, **300**: 441-455.
045. ENZINGER C., ROPELE S., STRASSER-FUCHS S., KAPPELLER P., SCHMIDT H., POLTRUM B., SCHMIDT R., HARTUNG H.P., FAZEKAS F. (2003). Lower levels of N-acetylaspartate in multiple sclerosis patients with the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Arch. Neurol.*, **60** (1): 65-70.
046. ESTERBAUER H., SCHAUR R.J., ZOLLNER H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, **11** (1): 81-128.
047. ETIENNE J. (2001). Bioquímica Genética. Biología Molecular, (1ª Edición). Masson, S.A. Barcelona-España, **pp464**
048. FABER K., HVIDBERG V., MOESTRUP S.K., DAHLBÄCK B., NIELSEN L.B. (2006). Megalin is a receptor for apolipoprotein M, and kidney-specific megalin-deficiency confers urinary excretion of apolipoprotein M. *Mol. Endocrinol.*, **20** (1): 212-218.
049. FARESE R.JR., RULAND S., FLYNN L., STOKOWSKI R., YOUNG S. (1995). Knockout of the mouse apolipoproteína B gene results in embryonic lethality in homozygotes

- and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 1774-1778.
050. FAZEKAS F., ENZINGER C., ROPELE S., SCHMIDT H., SCHMIDT R., STRASSER-FUCHS S. (2006). The impact of our genes: consequences of the apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer disease and multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, **245**: 35-39.
051. FERRER VIANT D., JORGE FONSECA C., CUTIÑO CLAVEL I., GARCÍA RODRÍGUEZ R.E., ARCE GÓMEZ D.L. (1999). Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal. *Medisan.*, **3** (3): 5-11.
052. FIELITZ W., ESTEVES A., MORO R. (1984). Protein composition of cerebrospinal fluid in the developing chick embryo. *Brain Res.*, **315**: 111-115.
053. FLOWER D.R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, **318**: 1-14.
054. FREEMAN B.G. (1972). Surface modifications of neural epithelial cells during formation of the neural tube in the rat embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **28**: 437-448.
055. FRIEDEN C., GARAI K. (2012). Structural differences between apoE3 and apoE4 may be useful in developing therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **109** (23): 8913-8.
056. FUKUSHIMA D., YOKOYAMA S., KÉZDY F.J., KAISER E.T. (1981). Binding of amphiphilic peptides to phospholipid/cholesterol unilamellar vesicles: a model for protein-cholesterol interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (5): 2732-2736.
057. FUSTER V., ROSS R., TOPOL E.J. (1997). Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Springer-Verlag Ibérica, S.A. Barcelona. Volumen I.
058. GALLERA J. (1971). Primary induction in birds. *Adv. Morphog.*, **9**: 149-180. (Review).
059. GALZIE Z., KINSELLA A.R., SMITH J.A. (1997). Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem. Cell Biol.*, **75** (6): 669-685.

060. GANFORNINA M.D., DO CARMO S., LORA J.M., TORRES-SCHUMANN S., VOGEL M., ALLHORN M., GONZÁLEZ C., BASTIANI M.J., RASSART E., SANCHEZ D. (2008). Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell.*, **7**: 506-515.
061. GANFORNINA M.D., GUTIÉRREZ G., BASTIANI M., SÁNCHEZ D. (2000). A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol. Biol. Evol.*, **17** (1): 114-26.
062. GARCÍA G.A., CLAVIJO D., MEJÍA O.R., GARCÍA A., VITTORINO M., CASADIEGO C.A., HERNÁNDEZ S., COBOS C., TOVAR J., REY C.A., ZAMUDIO C. (2007). Aspectos biomédicos de la familia de las lipocalinas. *Universitas Médica*, **48** (2): 118-128.
063. GATO A., DESMOND M.E. (2009). Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Dev. Biol.*, **327** (2): 263-272.
064. GATO A., MARTIN C., ALONSO M.I., MARTINEZ-ALVAREZ C., MORO J.A. (2001). Chondroitin sulphate proteoglycan is involved in lens vesicle morphogenesis in chick embryos. *Exp. Eye Res.*, **73** (4): 469-478.
065. GATO A., MARTINEZ M.L., TUDELA C., ALONSO I., MORO J.A., FORMOSO M.A., FERGUSON M.W., MARTÍNEZ-ALVAREZ C. (2002). TGF-beta(3)-induced chondroitin sulphate proteoglycan mediates palatal shelf adhesion. *Dev. Biol.*, **250** (2): 393-405.
066. GATO A., MARTÍN P., ALONSO M.I., MARTÍN C., PULGAR M.A., MORO J.A. (2004). Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, **301A**: 280-289.
067. GATO A., MORO J.A., ALONSO M.I., BUENO D., DE LA MANO A., MARTÍN C. (2005). Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat. Rec. A.*, **284A**: 475-484.
068. GATO A., MORO J.A., ALONSO M.I., PASTOR J.F., REPRESA J.J., BARBOSA E. (1993). Chondroitin sulfate proteoglycan and embryonic brain enlargement in the chick. *Anat. Embryol.*, **188**: 101-106.
069. GILBERT S.F. (2005). *Biología del desarrollo* (7ª ed.). Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid-España.

070. GILBERT S.F. (2006). *Developmental Biology*, (Eight Edition). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
071. GOLDEN J.A., CHERNOFF G.F. (1993). Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice. *Teratology*, **47**: 73-80.
072. GONÇALVES M.B., BOYLE J., WEBBER D.J., HALL S., MINGER S.L., CORCORAN J.P. (2005). Timing of the retinoid-signalling pathway determines the expression of neuronal markers in neural progenitor cells. *Dev. Bio.*, **278**: 60-70.
073. GUTIÉRREZ G., GANFORNINA M.D., SÁNCHEZ D. (2000). Evolution of the lipocalin family as inferred from a protein sequence phylogeny. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1482** (1-2): 35-45
074. HALLIWELL B. (2012a). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.*, **70** (5): 257-65. Review.
075. HALLIWELL B. (2012b). The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br. J. Clin. Pharmacol.*, DOI: 10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x
076. HAMBURGER V., HAMILTON H.L. (1951). A series of normal stages of the development of chick embryo. *J. Exp. Morphol.*, **88**: 49-92
077. HAYASHI. (2009). Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology* 29: 1-8.
078. HASHIMOTO R., HIRATA Y., ASADA T., YAMASHITA F., NEMOTO K., MORI T., MORIGUCHI Y., KUNUGI H., ARIMA K., OHNISHI T. (2009). Effect of the brain-derived neurotrophic factor and the apolipoprotein E polymorphisms on disease progression in preclinical Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.*, **8** (1): 43-52.
079. HOE H.S., HARRIS D.C., REBECK G.W. (2005). Multiple pathways of apolipoprotein E signalling in primary neurons. *J. Neurochem.*, **93** (1): 145-155.
080. HOMANICS G.E., MAEDA N., TRABER M.G., KAYDEN H.J., DEHART D.B., SULIK K.K. (1995). Exencephaly and hydrocephaly in mice with targeted modification of the apolipoprotein B (ApoB) gene. *Teratology*, **51** (1): 1-10.

081. HOTARY K.B., ROBINSON K.R. (1991). The neural tube of the *Xenopus* embryo maintains a potential difference across itself. *Dev. Brain Res.*, **59**: 65–73.
082. HULL-THOMPSON J., MUFFAT J., SANCHEZ D., WALKER D.W., BENZER S., GANFORNINA M.D., JASPER H. (2009). Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS. Genet.*, **5** (4): e1000460.
083. JACOBS S., LIE D.C., DECICCO K.L., SHI Y., DELUCA L.M., GAGE F.H., EVANS R.M. (2006) Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *PNAS*. **103**: 3902-3907.
084. JELINEK R., PEXIEDER T. (1968). The pressure of encephalic fluid in chick embryos between the 2nd and 6th day of incubation. *Physiol. Bohemoslov.*, **17**: 297-305.
085. JOHANSSON P.A., DZIEGIELEWSKA K.M., ELK C.J, HABGOOD M.D., MOLGARD K., POTTER A., SCHULIGA M., SAUNDERS N.R. (2005). Aquaporin-1 in the choroid plexuses of developing mammalian brain. *Cell Tissue Res.*, **322**: 353-364.
086. JURGENS G., LANG J., ESTERBAUER H. (1986). Modification of human low-density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochim. Biophys. Acta*, **875**: 103-114.
087. KANNER J., GERMAN J.B., KINSELLA J.E. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **25**: 317-364.
088. KELLER J.N., PANG Z., GEDDES J.W., BEGLEY J.G., GERMEYER A., WAEG G., MATTSON M.P. (1997). Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid  $\beta$ -peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J. Neurochem.*, **69**: 273-284.
089. KUHN H.G., WINKLER J., KEMPERMANN G., THAL L.J., GAGE F.H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.*, **17** (15): 5820-9.
090. KRUMAN I., BRUCE-KELLER A.J., BREDESEN D.E., WAEG G., MATTSON M.P. (1997). Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **17**: 5089-5100



091. LACONTI J.J., JABLONSKI M.G., DESMOND M.E. (2004). N-cadherin maintains occlusion of the chick neural tube. *FASEB Abstr. No. LB*, p 10.
092. LEHTINEN M.K., WALSH C.A. (2011). Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**: 653-679 (Review).
093. LEHTINEN M.K., ZAPPATERRA M.W., CHEN X., YANG Y.J., HILL A.D., LUN M., MAYNARD T., GONZALEZ D., KIM S., YE P., D'ERCOLE A.J., WONG E.T., LAMANTIA A.S., WALSH C.A. (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*. **69** (5): 893-905.
094. LEVITAN M. L., DESMOND M. E. (2009). Expansion of the human embryonic brain during rapid brain growth: area analysis. *Anat. Rec.*, **292** (4): 472-480.
095. LI X.Y., DESMOND M.E. (1991). Modulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pumps in the heart of the chick embryo influences brain expansion. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **17**: 21.16
096. LIU C.Y., LEE C.F., WEI Y.H. (2009). Role of reactive oxygen species-elicited apoptosis in the pathophysiology of mitochondrial and neurodegenerative diseases associate with mitochondrial DNA mutations. *J. Formos Med. Assoc.*, **108**: 599-611 (Review).
097. LOMONTE B., ROJAS L. Inmunología General: Manual de laboratorio. Instituto Clodomiro Picado. Universidad Costa Rica. 1995. Capítulo 13: 92-101.
098. LOWERY L.A., SIVE H. (2005). Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the nagie oko and snakehead/atp1a1a.1 gene products. *Development*, **132**: 2057-2067.
099. MADEN M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3** (11): 843-53. (Review).
100. MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H., HUANG Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.*, **Suppl**: S183-8.

101. MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H., HUANG Y. (2006). Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *PNAS*, 103: 5644-5651.
102. MARK R.J., LOVELL M.A., MARKESBERY W.R., UCHIDA K., MATTSON M.P. (1997). A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.*, **68** (1): 255-64.
103. MARTIN C., ALONSO M.I., SANTIAGO C., MORO J.A., DE LA MANO A., CARRETERO R., GATO A. (2009). Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **27** (7): 733-40.
104. MARTÍN C., BUENO D., ALONSO M.I., MORO J.A., CALLEJO S., PARADA C., MARTÍN P., CARNICERO E., GATO A. (2006). FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cell. *Dev. Biol.*, **297**: 402-416.
105. MARZESCO A.M., JANICH P., WILSCH-BRAUNINGER M., DUBREUIL V., LANGENFELD K., CORBEIL D., HUTTNER W.B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.*, **118**: 2849–2858.
106. MATTSON M.P. (1998). Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neural degeneration and adaptive plasticity. *Trends. Neurosc.* **21** (22): 53-57.
107. MCCAFFERY P., DRÄGER U.C. (2000). Regulation of acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth FR.*, **11**: 233-249.
108. MCLAREN A. (1965). Placental weight loss in late pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, **9**: 343-346.
109. MIYAN J.A., NABIYOUNI M., ZENDAH M. (2003). Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, **81** (4): 317-28.

110. MIYAN J.A., ZENDAH M., MASHAYEKHI F., OWEN-LYNCH P.J. (2006). Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells in vitro, mirroring in vivo development. *Cerebrospinal Fluid Res.*, **3**: 2.
111. MOHSENZADEGAN M., MIRSHAFIEY A. (2012). The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, **11** (3): 203-216.
112. MONCADA S., HIGGS E.A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Investig.*, **21**: 361-374.
113. MORO BALBÁS J.A., GATO A., ALONSO REVUELTA M.I., PASTOR J.F., REPRESA J.J., BARBOSA E. (1993). Retinoica cid induces changes in the romboencephalic neural crest cell migration and extracelular matrix composition in chick embryos. *Teratology*, **48**: 197-206.
114. MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, WATERSTON R.H., LINDBLAD-TOH K., BIRNEY E., ROGERS J., ABRIL J.F., AGARWAL P., AGARWALA R., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. **420** (6915): 520-62.
115. MUFFAT J., WALKER D.W., BENZER S. (2008). Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **105** (19): 7088-93.
116. NASKI M.C., ORNITZ D.M. (1998). FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci.*, **3**: d781-794.
117. NICO B., FRIGERI A., NICCHIA G.P., QUONDAMATTEO F., HERKEN R., ERREDE M., RIBATTI D., SVELTO M., RONCALI L. (2001). Role of aquaporin-4-water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J. Cell. Sci.*, **114** (7): 1297-1307.
118. NIEVELSTEIN R.A., HARTWIG N.G., VERMEIJ-KEERS C., VALK J. (1993). Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology.*, **48** (1): 21-31.
119. OZAWA K., URUNO T., MIYAKAWA K., SEO M., IMAMURA T. (1996). Expression of the fibroblast growth factor family and their receptor family genes during mouse brain development. *Mol. Brain Res.*, **41**: 279-288.

120. PANCHISION D.M., MCKAY R.D. (2002). The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12** (4): 478-87.
121. PARADA C., ESCOLÀ-GIL J.C., BUENO D. (2008a). Low-density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid are required for neural differentiation. *J. Neurosci. Res.*, **86**: 2674-2684.
122. PARADA C., GATO A., APARICIO M., BUENO D. (2006). Proteome análisis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *Proteomics.*, **6**: 312-320.
123. PARADA C., GATO A., BUENO D. (2005b). Mammalian embryonic cerebrospinal fluid proteome, has greater Apolipoprotein and enzyme pattern complexity than the avian proteome. *J. Proteome Res.*, **4**: 2420-2428.
124. PARADA C., GATO A., BUENO D. (2008b). All trans retinol and retinol-binding proteins from embryonic cerebrospinal fluid exhibit dynamic behaviour during early central nervous system development. *Neuroreport*, **19** (9): 945–950.
125. PARADA C., MARTIN C., ALONSO M:I., MORO J.A, BUENO D., GATO A. (2005a) Embryonic cerebrospinal fluid collaborates with the isthmic organizer to regulate mesencephalic gene expression. *J. Neurosci. Res.*, **82**: 333–345.
126. PARVAS M., BUENO D. (2009). The embryonic blood-CSF barrier has molecular elements to control E-CSF osmolarity during early CNS development. *J. Neurosci Res.*, **88** (6): 1205-12.
127. PARVAS M., PARADA C., BUENO D. (2008). A blood-CSF barrier function controls embryonic CSF protein composition and homeostasis during early CNS development. *Dev. Biol.*, **321** (1): 51-63.
128. PEDERSEN W.A., CASHMAN N.R., MATTSON M.P. (1999). The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp. Neurol.*, **155**: 1-10.
129. PEDERSEN W.A., CHAN S.L., MATTSON M.P. (2000). A mechanism for the neuroprotective effect of apolipoprotein E: isoform-specific modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J. Neurochem.*, **74**: 1426-33.

130. PERVAIZ S., BREW K. (1987). Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J.*, **1** (3): 209-14.
131. RABALLO R., RHEE J., LYN-COOK R., LECKMAN J.F., SCHWARTZ M.L., VACCARINO F.M. (2000). Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, **20** (13): 5012-23.
132. RALL S.C JR., WEISGRABER K.H., INNERARITY T.L., MAHLEY R.W. (1982). Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** (15): 4696-700.
133. RASSART E., BEDIRIAN A., DO CARMO S., GUINARD O., SIROIS J., TERRISSE L., MILNE R. (2000). Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1482** (1-2): 185-98. Review.
134. SALEHI Z., MASHAYEKHI F. (2006). The role of cerebrospinal fluid on neural cell survival in the developing chick cerebral cortex: an *in vivo* study. *Eur. J. Neurol.*, **13**: 760-764.
135. SÁNCHEZ D., GANFORNINA M.D., BASTIANI M.J. (2000). Lazarillo, a neuronal lipocalin in grasshoppers with a role in axon guidance. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1482** (1-2): 102-9
136. SÁNCHEZ D., GANFORNINA M.D., MARTÍNEZ S. (2002). Expression pattern of the lipocalin Apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.*, **110**: 225-229.
137. SANCHEZ D., LÓPEZ-ARIAS B., TORROJA L., CANAL I., WANG X., BASTIANI M.J., GANFORNINA M.D. (2006). Loss of glial lazarrillo, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, **16** (7): 680-686.
138. SAUER F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* **62**: 377-405.
139. SAWAMOTO K., WICTERLE H., GONZALEZ-PEREZ O., CHOLFIN J.A., YAMADA M., SPASSKY N., MURCIA N.S., GARCIA-VERDUGO J.M., MARIN O., RUBENSTEIN J.L.R., TESSIER-LAVIGNE M., OKANO H., ALVAREZ-BUYLIA A.A. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, **311**: 629-632

140. SCHEIR A.F., NEUHAUSS S.C, HARVEY M., MALICKI J., SOLNICA-KREZEL L., STAINIER D.Y, ZWARTKRUIS F., ABDELILAH S., DSTEMPLE D.L., RANGINI Z., *et al.* (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development*, **123**: 165-178.
141. SCHOENWOLF G.C., DESMOND M.E. (1984a). Descriptive studies of occlusion and reopening of the lumen of the spinal cord of the early chick embryo. *Anat. Rec.*, **209**: 251-263.
142. SCHOENWOLF G.C., DESMOND M.E. (1984b). Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement. *J. Exp. Zool.*, **230**: 405-407.
143. SCHOENWOLF G.C., DESMOND M.E. (1986). Timing and positioning of reopening of the occluded spinal neurocele in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, **246** (4): 459-466.
144. SEDLACEK J. (1975). Some basic chemical components of the cerebrospinal fluid in developing chick embryo. *Physiol. Bohemoslov.*, **24** (4): 305-313.
145. SHI R., BORGENS B. (1994). Embryonic neuroepithelial sodium transport, the resulting physiological potential and cranial development. *Dev. Biol.*, **165**: 105-116
146. SHIN I., KIM H.J., LEE J.E., MYUNG C.G. (2006). Aquaporin7 expression during perinatal development of mouse brain. *Neurosci. Lett.*, **4090**: 106-111.
147. SIVAPRASADARAO A., BOUDJELAL M., FINDLAY J.B.C. (1993). Lipocalin structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 619-622.
148. SMITH J.L., SCHOENWOLF G.C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends. Neurosci.*, **20** (11): 510-517. (Review).
149. SPAULDING H.L., SAIJO F., TURNAGE R.H., ALEXANDER J.S., AW T.Y., KALOGERIS T.J. (2006). Apolipoprotein A-IV attenuates oxidant-induced apoptosis in mitotic competent, undifferentiated cells by modulating intracellular glutathione redox balance. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290** (1): C95-C103.
150. SUCKOW M.A., DANNEMAN P., BRAYTON C. (2001). The Laboratory Mouse. *CRC Press*.

151. TOWBIN H., STAEHELIN T., GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology (N.Y)*, **24**: 145-9.
152. TROKOVIC R., JUUKOLA T., SAARIMAKI J., PELTOPURO P., THORSTEN N., VOGT-WEISENHORN D.M., TROKOVIC N., WURST W., PARTANEN J. (2005). Fgfr1-dependent boundary cells between developing mid- and hindbrain. *Dev. Biol.*, **278**: 428-439.
153. TROPEPE V., SIBILIA M., CIRUNA B.G., ROSSANT J, WAGNER E.F., VAN DER KOOY D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.*, **208** (1): 166-88.
154. UCHIDA K., TOYOKUNI S., NISHIKAWA K., KAWAKISHI S., ODA H., HIAI H., STADTMAN E.R. (1994). Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry*, **33**: 12487–12494.
155. VACCARINO FM, SCHWARTZ ML, RABALLO R, RHEE J, LYN-COOK R. (1999). Fibroblast growth factor signaling regulates growth and morphogenesis at multiple steps during brain development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **46**: 179-200.
156. VAN ALLEN M.I., KALOUSEK D.K., CHERNOFF G.F., JURILOFF D., HARRIS M., MCGILLIVRAY B.C., YONG S.L., LANGLOIS S., MACLEOD P.M., CHITAYAT D., ET AL. (1993). Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am. J. Med. Genet.*, **47** (5): 723-43.
157. VAN DIJK W., DO CARMO S., RASSART E., DALHLBACK B., SODETZ J. (2006). The plasma Lipocalins  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, apolipoprotein D, apolipoprotein M and complement C8 $\gamma$ . In Lipocalins. (AkerstromB, BorregaardN, FlowerD, SalierJ, eds). Georgetown, TX: Landes Bioscience, pp. 140-166.
158. VAN ESSEN D.C. (1997). A tension-based theory of morphogenesis and compact wiring in the central nervous system. *Nature*, **385**: 313-318.
159. VANHOLLEBEKE B., PAYS E. (2006). The function of apolipoproteínas L. *Cell. Mol. LifeSci.*, **63**: 1937-1944.
160. VANHOUTTE P.M. (2004). Endothelium-depent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol. Res.*, **49**: 503-508.

161. VESCOVI AL, GALLI R, GRITTI A. (2001). The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomed. Pharmacother.*, **55** (4): 201-5.
162. VOET D., VOET J.G. (1992). *Bioquímica*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona España.
163. VOET D., VOET J.G., PRATT C.W. (2009). *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular (2ª Edición)*. Editorial Médica Panamericana, S.A. Madrid-España. Sección 25-3, pp 951
164. WALSHE J., MASON I. (2000). Expression of FGFR1, FGFR2, and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. *Mech. Dev.*, **90**: 103-110.
165. WANG T-W, ZHANG H., PARENT J.M. (2005). Retonoic acid regulates postnatal neurogénesis en the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development*, **132**: 2721-2732.
166. WARREN J.S., JOHNSON K.J., WARD P.A. (1987). Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathol. Immunopathol. Res.* **6**: 301-315.
167. WEISS S., DUNNE C., HEWSON J., WOHL C., WHEATLEY M., PETERSON A.C., REYNOLDS B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.*, **16** (23): 7599-7609.
168. WILKE T.A., GUBBELS S., SCHWARTZ J., RICHMAN J.M. (1997). Expression of fibroblast growth factor receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3) in the developing head and face. *Dev. Dyn.*, **210**: 41-52.
169. WILLIAM J.L. (2003). *Embriología humana*. (3ª Ed.).Editorial: Elsevier Science. Mdrid-España.
170. WILLNOW T.E., HAMMES A., EATON S. (2007). Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development.*, **134** (18): 3239-49.
171. WOJNAR P., LECHNER M., REDL B. (2003). Antisense down-regulation of lipocalin-interacting membrane receptor expression inhibits cellular internalization of lipocalin-1 in human NT2 cells. *J Biol Chem.*, **278** (18): 16209-15.



172. WOLPERT L., JESSELL T., LAWRENCE P., MEYEROWITZ E., ROBERTSON E., SMITH J. (2010). *Principios del desarrollo*. (3ª ed.). Editorial Médica PANAMERICANA S.A. Madrid España.
173. YAÑEZ M.A., C-SORIGUER F., VILLAR J., PACHON J. (1975). Dislipemias, lipoidosis, lipodistrofias y obesidad. *Annales de la Universidad Hispalense*, publicaciones de la Universidad de Sevilla. Nº 25. Capítulo IV.
174. ZAPPATERRA M.D., LISGO S.N., LINDSAY S., GYGI S.P., WALSH C.A., BALLIF B.A. (2009). A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.*, 6 (9): 3537-3548.



*Universidad de Valladolid*

**UVa**

Facultad de Medicina. Dpto. Anatomía y Radiología. Avda. Ramón y Cajal 7, 47005. Valladolid