



ORIGINAL

La megalina es el receptor para la endocitosis mediada por caveolas de la albúmina y se requiere para la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico

Megalin is the receptor for caveola-mediated endocytosis of albumin and it's required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid

Bento-Abreu A, Velasco A, Tabernero A, Medina J M

INCYL, Universidad de Salamanca, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Estudiar el mecanismo de endocitosis de la albúmina en astrocitos de rata en cultivo primario.

Material y Métodos: Se utilizaron neonatos (1 día de vida) de ratas Wistar para obtener astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos se incubaron con albúmina al 2% o albúmina-FITC al 0,5%, durante 20 minutos, a 4°C para los estudios de unión y durante 20 minutos a 4°C, seguido de 10 minutos a 37°C, para los estudios de internalización. Para los experimentos de pérdida de función, los astrocitos se transfectaron con 50nM de siRNA específico para el silenciamiento de la proteína diana durante 72 h. El ácido oleico presente en el medio de cultivo de astrocitos incubados con albúmina al 2% durante una hora se cuantificó por HPLC.

Resultados: la megalina y la caveolina-1, pero no la clatrina, colocalizan con la albúmina en la membrana plasmática. El silenciamiento de la megalina y de la caveolina-1 reduce la capacidad de la albúmina para unirse a la membrana e internalizarse y reduce la capacidad de los astrocitos para sintetizar el factor neurotrófico ácido oleico. El silenciamiento de la clatrina no modifica la internalización de la albúmina ni la síntesis del ácido oleico.

Conclusiones: la albúmina se internaliza mediante endocitosis dependiente de caveolas vía megalina en los astrocitos y que este proceso se requiere para la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico.

Palabras-clave:

Astrocyte, ácido oleico, albúmina, caveolas, clatrina, endocitosis.

Abstract

Aim: Study of the endocytic pathway of albumin in rat astrocytes from primary culture.

Material and Methods: One day postnatal Wistar rats were used to obtain astrocytes from primary culture. Astrocytes were incubated with 2% albumin or 0.5% FITC-albumin during 20 minutes at 4°C for binding experiments or during 20 minutes at 4°C followed by 10 minutes at 37°C for internalization experiments. For loss-of-function experiments, astrocytes were transfected during 72h with 50 nM of siRNA specific for target protein, followed by the binding and internalization experiments. Oleic acid present in the culture medium of astrocytes incubated with 2% albumin during one hour was quantified by HPLC.

Results: We observed that megalin and caveolin-1, but not clathrin, co-localize with albumin in the membrane. Megalin and caveolin-1 silencing by siRNA reduces albumin binding and internalization, as well as oleic acid synthesis in astrocytes. Nonetheless, clathrin silencing do not modify albumin internalization or oleic acid synthesis in astrocytes

Conclusions: albumin is internalized in a caveola-dependent mechanism via megalin and that this event is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid.

Key-words:

Astrocyte, oleic acid, albumin, caveola, clathrin, endocytosis.

Correspondencia

A. Bento Abreu,
Instituto de Neurociencias de Castilla y León
Pintor Fernando Gallego 1. 37007 Salamanca, España
aabreu@usal.es



Introducción

La albúmina entra en el cerebro adulto en condiciones de hipoxia y tras daño en la barrera hematoencefálica [1] pues ejerce un efecto beneficioso neuroprotector en el cerebro tras un infarto cerebral agudo [2-4]. Además, la internalización de la albúmina en los astrocitos estimula la síntesis y liberación al espacio extracelular del ácido oleico, un factor neurotrófico que induce la diferenciación neuronal [5]. De esta forma, es tentador especular que la albúmina pueda tener también una función en la reparación neuronal en respuesta a tales lesiones, al inducir la síntesis del ácido oleico.

Se ha postulado que la presencia de albúmina en el cerebro se podría deber a la existencia de un receptor específico para la albúmina, puesto que albúminas modificadas químicamente o de distintas especies son incapaces de alcanzar el líquido cefalorraquídeo [6]. Sin embargo, la naturaleza de este receptor es desconocida. Se sabe que la megalina, un receptor multiligando miembro de la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad, es el receptor de la albúmina en el riñón, promoviendo su internalización mediante endocitosis dependiente de clatrina en las células del túbulo proximal [7]. La endocitosis de la albúmina mediada por la megalina puede ocurrir por endocitosis dependiente de clatrina [8] o por endocitosis dependiente de caveolas [9,10]. Además, en astrocitos, se ha descrito que la albúmina se internaliza por endocitosis mediada por receptor [11].

Hemos estudiado el mecanismo molecular de internalización de la albúmina en los astrocitos y descrito su mecanismo molecular de internalización que amplía el conocimiento sobre el efecto neuroprotector de la albúmina en respuesta al daño cerebral y puede dar lugar a nuevas posibilidades terapéuticas.

Material y Métodos

Se emplearon neonatos de ratas albinas Wistar de 1 día de vida postnatal, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca y se realizó un cultivo primario de astrocitos de ratas Wistar [12], manteniéndose en cultivo a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO₂.

En los experimentos de unión de albúmina al receptor, los astrocitos de 14 días *in vitro* (DIV) se cultivaron en DMEM sin FBS durante 12 horas antes del tratamiento. Para los experimentos de unión de albúmina, las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio de incubación de albúmina suplementado con glucosa 5 mM y con albúmina al 1-2% (p/v) o con albúmina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) al 0,5-1%, durante 20 minutos a 4°C. En los experimentos de internalización de albúmina, los astrocitos se incu-

baron como se ha descrito anteriormente (20 minutos a 4°C) y luego se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. Después de las incubaciones con albúmina, los astrocitos se lavaron abundantemente con PBS a 4°C.

Inmunocitoquímica

Para los ensayos de inmunofluorescencia, después de los tratamientos celulares, las células se fijaron con formaldehído al 4% durante 30 minutos, se permeabilizaron con metanol al 100% a -20°C durante 10 minutos y después se incubaron con anticuerpo policlonal de oveja contra megalina (1:1000; donado por el Dr Verroust, del Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, París, Francia), con anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 (1:500; Abcam, Cambridge, Reino Unido) o con anticuerpo monoclonal de ratón contra clatrina (1:500; BD Transduction Laboratories, USA), durante 16h a 4°C, seguido de una incubación con un anticuerpo secundario contra IgG de oveja, conejo o ratón conjugado con AlexaFluor594 (1:1000; Invitrogen, Barcelona), durante 1 hora a temperatura ambiente. El DNA nuclear se tiñó con DAPI (2,5 µg/mL en PBS; Invitrogen) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se montaron utilizando un agente preservador de la fluorescencia (Slowfade Gold Antifade kit; Invitrogen). Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal modelo LSM510 (Zeiss) o con un microscopio de fluorescencia invertido conectado a una video-cámara digital Leica DC 100, obteniéndose imágenes confocales o de fluorescencia. Para los análisis de microscopía confocal se utilizó el microscopio confocal y las imágenes confocales se analizaron empleando el programa informático de análisis de imagen LSM 5 Image Browser v 2.8 (Zeiss).

Westernn Blot

Después de los tratamientos celulares, las células se lavaron tres veces con PBS y se lisaron con RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF y 0.5 µg/ml antipaina, 0.5 µg/ml amastatina, 0.5 µg/ml pepstatina, 0.5 µg/ml leupeptina, 0.5 µg/ml bastatina y 0.5 µg/ml de inhibidor de tripsina). Los lisados se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se guardaron a -80°C. 30 µg del extracto proteico se aplicaron en geles de acrilamida (SDS-PAGE) de 5% o 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa [13]. Tras bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal de ratón contra BSA (Sigma, Madrid), con anticuerpo policlonal de oveja contra megalina, con anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 o con

anticuerpo monoclonal de ratón contra clatrina. A continuación, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario contra IgG de oveja, conejo o ratón conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.). La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia.

Inmunoprecipitación

Después de los tratamientos celulares, las células se lavaron con PBS y se lisaron con RIPA. Los lisados se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C y 500 µl del sobrenadante se incubó con 2 µg de anticuerpo monoclonal de ratón contra BSA, de anticuerpo policlonal de oveja contra megalina, con anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 o con anticuerpo monoclonal de ratón contra clatrina durante 3 horas a 4°C. Los inmunocomplejos se secuestraron con 50 µl de proteína-A Sepharosa CL-4B (Invitrogen) por centrifugación (1 minuto, 10000 x g, 4°C). Las proteínas se disolvieron en 30 µl de tampón de carga de SDS durante 5 minutos a 95°C y se aplicaron en geles SDS-PAGE de 5% o 10%.

Silenciamiento génico por siRNA

Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con una secuencia validada de siRNA sin gen diana (control, designada NT-siRNA) y con una secuencia específica para el silenciamiento de la megalina (designada Meg-siRNA), de la caveolina-1 (designada Cav-1-siRNA) y de la clatrina (designada Clat-siRNA), utilizando Lipofectamina 2000, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se transfectaron con 50 nM de siRNA de doble cadena previamente mezclados con 2,5 µL/mL de Lipofectamine2000. Los tratamientos celulares se realizaron 72h tras la transfección.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los ácidos grasos presentes en los medios de incubación se analizaron por HPLC [5].

Análisis estadístico

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

Resultados

La megalina, la caveolina-1 y la clatrina se expresan en astrocitos en cultivo primario (Figura 1). La albúmina colocaliza

con la megalina en la membrana de los astrocitos, dado que la imagen superimpuesta muestra color amarillo (Figura 2). El anticuerpo contra la megalina también precipitó la albúmina (Figura 2) y no se observó señal en el control negativo realizado inmunoprecipitando las proteínas con un anticuerpo contra GAPDH. Las proteínas extraídas de los astrocitos se usaron como control positivo para la albúmina.

La albúmina colocalizó con la caveolina-1 en la membrana de los astrocitos pero no con la clatrina. Los anticuerpos contra la BSA y contra la megalina también precipitaron la caveolina-1, pero no la clatrina (Figura 3). Las coimmunoprecipitaciones recíprocas confirmaron estos resultados, dado que los análisis de Western blot muestran la presencia de la albúmina en el inmunocomplejo obtenido tras la inmunoprecipi-

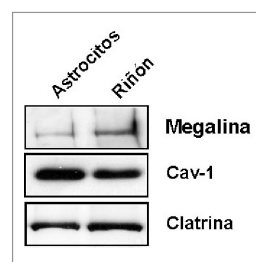


Fig. 1. Expresión de megalina, caveolina-1 y clatrina en astrocitos en cultivo primario.

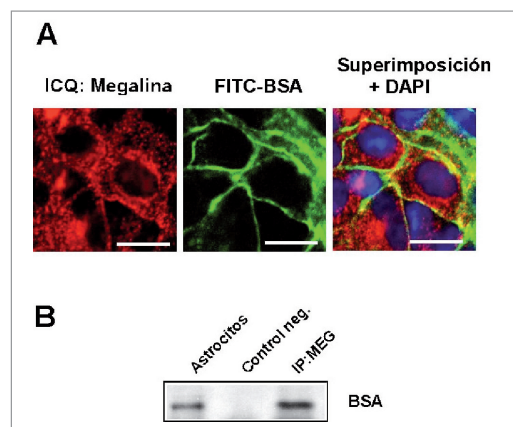


Fig. 2. Interacción de la albúmina con la megalina en astrocitos. A) Colocalización de FITC-BSA con megalina, analizada por inmunocitoquímica. Las imágenes confocales del mismo campo muestran la FITC-BSA (verde), megalina (rojo) y su colocalización (amarillo). El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en la imagen superimpuesta. Barra de calibrado: 10 µm. B) Western blot de BSA tras la inmunoprecipitación del extracto proteico con anticuerpos específicos contra megalina. Las células se incubaron a 4°C durante 20 minutos con BSA al 2% (p/v). Control positivo: Western blot de BSA en el extracto proteico de astrocitos antes de la inmunoprecipitación. Control negativo: Western blot de BSA tras la inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal contra GAPDH.

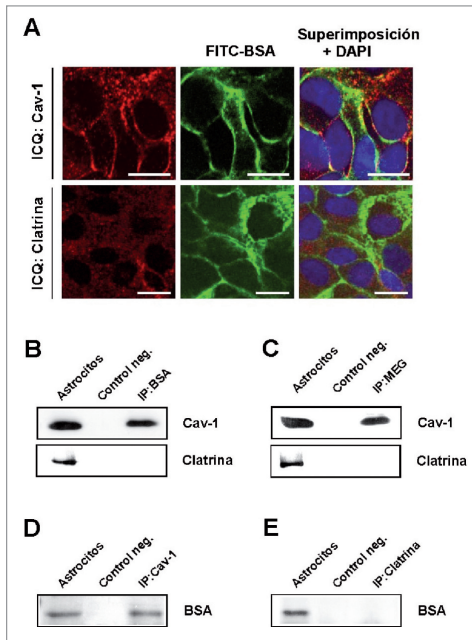


Fig. 3. Interacción de la albúmina y de la megalina con caveolina-1, pero no con clatrina, en la unión de la albúmina a los astrocitos. A) Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de la caveolina-1 o la clatrina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la colocalización de la FITC-BSA con la caveolina-1, en amarillo en las imágenes superimpuestas, pero no con la clatrina. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 15 μ m. B-F) Western blot de la BSA, la caveolina-1 o la clatrina tras la inmunoprecipitación del extracto proteico con anticuerpos específicos contra la BSA (B), la megalina (C), la caveolina-1 (D) o la clatrina (E). Control positivo: Western blot en el extracto proteico de astrocitos antes de la inmunoprecipitación. Control negativo: Western blot tras la inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal contra GAPDH.

tación de la caveolina-1, pero no tras la inmunoprecipitación de la clatrina (Figura 3). No se observó señal en el control negativo, realizado inmunoprecipitando las proteínas con un anticuerpo contra GAPDH. Las proteínas extraídas de los astrocitos se usaron como control positivo para la caveolina-1, la clatrina, la megalina y la BSA.

La inmunocitoquímica de megalina reveló una fuerte reducción en la expresión de la megalina en los astrocitos transfectados con siRNA específico para megalina (designado Meg-siRNA) con una reducción de 65% de la expresión de la megalina (Figura 4). El análisis de Western blot mostró una reducción de más del 50% en la unión y en la internalización de albúmina en los astrocitos cuya megalina fue silenciada, cuando se comparan con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Esta reducción fue coherente con la eficacia del silenciamiento de la megalina (Figura 4).

Para clarificar el tipo de endocitosis empleada en la internalización de la albúmina en astrocitos, se silenció la expresión de la caveolina-1 o de la clatrina mediante siRNA. Los resultados obtenidos muestran una reducción del 58% en la internalización de la albúmina en los astrocitos transfectados con Cav1-siRNA, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA, siendo esta reducción coherente con la eficacia del silenciamiento de la caveolina-1 (cerca del 80%) (Fig. 5). Sin embargo, en astrocitos cuya expresión de la clatrina se encontraba silenciada (reducción del 50%), la internalización de la albúmina no se modificó significativamente (ligero incremento de cerca del 8%) respecto a la situación control (NT-siRNA) (Figura 6).

Finalmente, el análisis por HPLC de los ácidos grasos reveló que tras el silenciamiento de la expresión de la megalina y de la caveolina-1 por siRNA, la síntesis y liberación del ácido oleico disminuyó más del 50% en comparación con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de la clatrina no modificó la síntesis y liberación del ácido oleico (Figura 7).

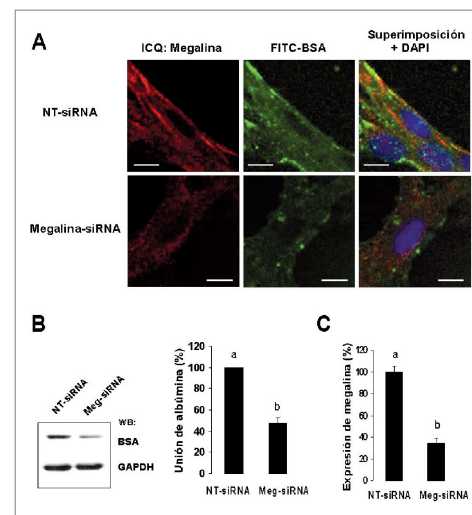


Fig. 4. El silenciamiento de la megalina disminuye la unión de la albúmina a los astrocitos. A) Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de megalina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran que la cantidad de FITC-BSA disminuye en los astrocitos transfectados con Meg-siRNA, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. Además, las imágenes superimpuestas muestran la colocalización de FITC-BSA con la megalina en astrocitos transfectados con NT-siRNA pero no en los transfectados con Meg-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 10 μ m. Western blot y cuantificación de BSA (B) y de megalina (C) en astrocitos transfectados con Meg-siRNA. ($p < 0,01$).

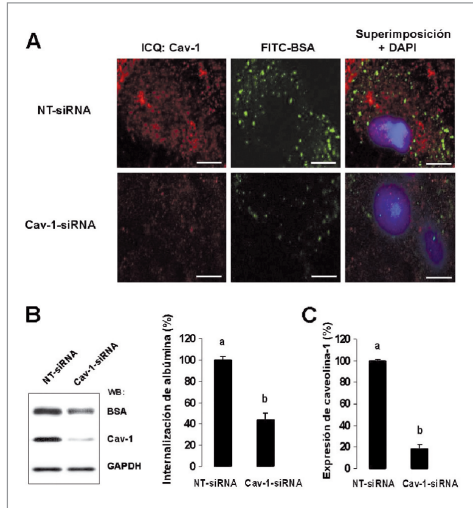


Fig. 5. El silenciamiento de la caveolína-1 disminuye la internalización de la albúmina en astrocitos. A) Las imágenes confocales muestran la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya caveolína-1 fue silenciada, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 10 μ m. Western blot y cuantificación de BSA (B) y de caveolína-1 (C) en astrocitos transfectados con Cav-1-siRNA. ($p < 0,01$).

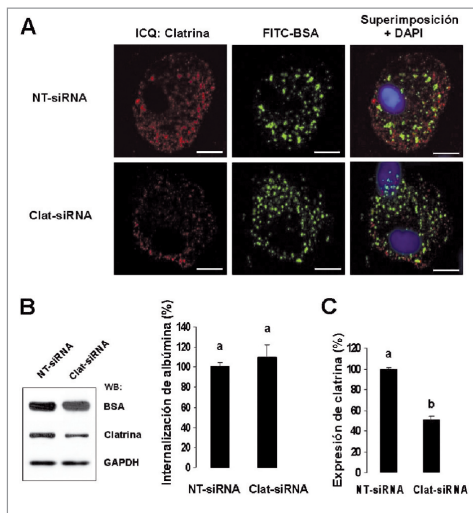


Fig. 6. El silenciamiento de la clatrina no modifica la internalización de la albúmina en astrocitos. A) Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de clatrina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la ausencia de diferencias en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya clatrina fue silenciada, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El DNA nuclear se tiñó con DAPI, en azul en las imágenes superimpuestas. Barra de calibrado: 10 μ m. Western blot y cuantificación de BSA (B) y de clatrina (C) en astrocitos transfectados con Clat-siRNA. ($p < 0,01$).

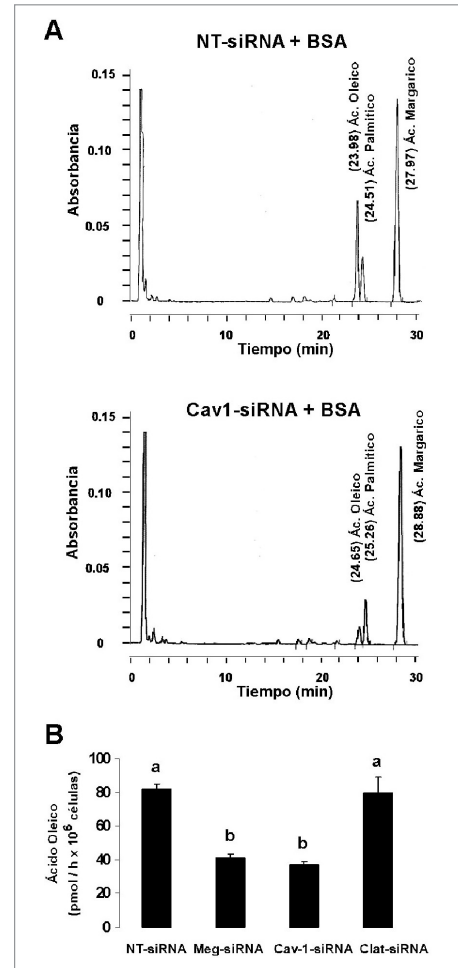


Fig. 7. El silenciamiento de la caveolína-1, pero no de la clatrina, disminuye la liberación del ácido oleico por los astrocitos. A) Perfiles cromatográficos representativos de astrocitos transfectados con NT-siRNA y Meg-siRNA. B) Cuantificación del ácido oleico. Los valores se normalizaron con ácido margárico y se expresan como pmol de ácido oleico liberado al medio de incubación por hora y millón de astrocitos, y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. ($p < 0,01$).

I Discusión

El descubrimiento de que la albúmina se reabsorbía en el túbulo proximal renal indicaba que el único mecanismo capaz de mediar este proceso era la endocitosis mediada por receptor, puesto que ni su tamaño ni el gradiente entre el túbulo y la sangre permitían la reabsorción pasiva de la albúmina por las uniones estrechas [14]. En este sentido, se identificó la megalina como el receptor de la albúmina en las células del túbulo proximal de rata [15]. La megalina es una glicoproteína de membrana, que tiene múltiples ligandos macromoleculares, incluyendo la albúmina [16]. La megalina está implica-



da en la internalización de la albúmina tanto por endocitosis mediada por clatrina como por caveolas [8, 10].

Por otro lado, varias líneas de investigación han sugerido que la internalización de la albúmina en los astrocitos era mediada por un receptor glicoproteico, dado que este proceso era sensible a la temperatura y se inhibía por PAO (un inhibidor de la endocitosis mediada por receptor), así como por el tratamiento breve con proteasas o con SBA (una lectina que une específicamente residuos de glicoproteínas) [11]. Se debe mencionar que la existencia de un receptor específico para la albúmina en el cerebro se ha postulado durante décadas [6]. Sin embargo, se desconocía todavía la naturaleza del receptor, así como el tipo de endocitosis empleada en los astrocitos.

En este trabajo, hemos descubierto que el receptor para la albúmina en astrocitos es la megalina. Así, los astrocitos en cultivo primario expresan la megalina, que colocaliza con la albúmina en la membrana plasmática. De hecho, nuestros resultados muestran que la megalina es necesaria para la unión de la albúmina a la membrana de los astrocitos y para su posterior internalización. Cuando la expresión de la megalina se silenció por siRNA, la capacidad de la albúmina para unirse a la membrana de los astrocitos se redujo significativamente y la internalización de la albúmina disminuyó notablemente en los astrocitos silenciados en megalina. Estos resultados indican claramente que la megalina es el receptor para la endocitosis de la albúmina en los astrocitos. De hecho, la existencia de una relación entre los tejidos donde se expresa la megalina y los tejidos donde ocurre la captación de albúmina por endocitosis mediada por receptor [8-10,17,18] parece indicar que la captación de albúmina es, efectivamente, mediada por la megalina y no por las glicoproteínas gp30 ó gp60, como había postulado Cessac-Guillemet et al [19].

La endocitosis de la albúmina mediada por la megalina puede ocurrir por endocitosis dependiente de clatrina [8] o por endocitosis dependiente de caveolas [10]. En los astrocitos, se desconocía el mecanismo de endocitosis que media la internalización de la albúmina. Nuestros resultados muestran que la endocitosis de la albúmina en los astrocitos está mediada por caveolas y no por vesículas recubiertas de clatrina. Así, pese a que los astrocitos expresan caveolina-1 y clatrina, la albúmina sólo interacciona con la proteína constituyente de las caveolas, la caveolina-1, en la membrana de los astrocitos. Del mismo modo, la megalina, en presencia de albúmina, interacciona con la caveolina-1, pero no con la clatrina, en la membrana de los astrocitos. Estos resultados indican que la caveolina-1 se requiere para la internalización de la albúmina y su receptor en los astrocitos. De hecho, cuando la expresión de la caveolina-1 se silencia, la internalización de la albúmina en los astrocitos se reduce significativamente. Sin embargo,

los resultados muestran que la clatrina no participa en la internalización de la albúmina en los astrocitos, puesto que su silenciamiento no modifica significativamente este proceso.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que la internalización de la albúmina estimula, en los astrocitos, la síntesis y liberación al espacio extracelular del factor neurotrófico ácido oleico [5]. En este trabajo hemos estudiado la participación de la megalina, de la caveolina-1 y de la clatrina en la síntesis del ácido oleico promovida por la albúmina. Los resultados indican que la megalina y la caveolina-1, pero no la clatrina, se requieren para el efecto de la albúmina en la síntesis y liberación del ácido oleico. Tras el análisis por HPLC, se verificó que cuando la expresión de la megalina y de la caveolina-1 se encontraban silenciadas por siRNA, la síntesis y liberación del ácido oleico promovida por la albúmina se encontraba fuertemente reducida. Sin embargo, el silenciamiento de la clatrina no modificó significativamente la síntesis y liberación del ácido oleico promovida por la albúmina. Este estudio funcional corrobora los resultados presentados en este trabajo, implicando a las caveolas en la endocitosis de la albúmina mediada por megalina en los astrocitos. Este evento puede ser un paso clave en el desarrollo cerebral, pues estimula la síntesis del ácido oleico, que, a su vez, promueve la diferenciación neuronal. De este modo, estos resultados indican otra posible función de la megalina durante el desarrollo del SNC, la participación en la endocitosis de albúmina mediada por caveolas para sintetizar el factor neurotrófico ácido oleico.

Además de tener un papel en el desarrollo cerebral, la albúmina tiene un papel neuroprotector en respuesta al daño cerebral. La albúmina posee un conjunto de propiedades que explican su papel neuroprotector, como el efecto anti-edema, la capacidad antioxidante, el efecto hemodiluyente y la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria y eritrocitaria. De hecho, la albúmina se utiliza para el tratamiento del infarto cerebral agudo, encontrándose en la fase III de ensayos clínicos [2,20].

Del mismo modo, el ácido oleico, además de su efecto neurotrófico, puede tener un efecto neuroprotector. La albúmina produce, en modelos de infarto, un aumento en la síntesis y liberación al plasma sanguíneo de ácidos grasos libres, principalmente movilizando los ácidos n-3 poliinsaturados. De hecho, uno de estos ácidos grasos, el ácido docosahexaónico (22:6 n-3,DHA), es capaz de incrementar la neuroprotección de la albúmina, al ser administrado unido a esta proteína, tras el proceso isquémico [21]. Así mismo, es tentador especular que la albúmina induce la síntesis del ácido oleico en los astrocitos que rodean la lesión, actuando éste como agente neuroprotector, a semejanza del DHA.



De esta forma, la descripción del mecanismo molecular de internalización de la albúmina en astrocitos amplía el conocimiento sobre el efecto neuroprotector de la albúmina en respuesta al daño cerebral y da lugar a nuevas posibilidades terapéuticas. **I**

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia FEDER SAF2003-06027 (José María Medina), FEDER SAF2004-00962 (Arantxa Tabertero) y Junta de Castilla y León SA005A06 (Arantxa Tabertero). André Bento-Abreu fue receptor de una Beca Larramendi 2008, de FUNDACIÓN MAPFRE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plateel M, Teissier E, Cecchelli R. Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* 1997; 68: 874-7.
2. Palesch YY, Hill MD, Ryckborst KJ, Tamariz D, Ginsberg MD. The ALIAS Pilot Trial: a dose-escalation and safety study of albumin therapy for acute ischemic stroke-II: neurologic outcome and efficacy analysis. *Stroke* 2006; 37:2107-14.
3. Belayev L, Liu Y, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke* 2001; 32: 553-60.
4. Belayev L, Saul I, Busto R, Danielyan K, Vigdorchik A, Khoutorova L, et al. Albumin treatment reduces neurological deficit and protects blood-brain barrier integrity after acute intracortical hematoma in the rat. *Stroke* 2005; 36: 326-31.
5. Tabertero A, Lavado EM, Granda B, Velasco A, Medina JM. Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* 2001; 79: 606-16.
6. Habgood M, Sedgwick JE, Dziegielewska KM, Saunders NR. A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. *J Physiol* 1992; 456:181-92.
7. Christensen EI, Verroust PJ. Megalin and cubilin, role in proximal tubule function and during development. *Pediatr Nephrol* 2002; 17: 993-9.
8. Christensen EI, Birn H, Verroust P, Moestrup SK. Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *Int Rev Cytol* 1998; 180:237-84.
9. Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem* 2001; 276:48619-22.
10. Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 2005; 25:10884-93.
11. Tabertero A, Velasco A, Granda B, Lavado EM, Medina JM. Transcytosis of albumin in astrocytes activates the sterol regulatory element-binding protein-1, which promotes the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Biol Chem* 2002; 277:4240-6.
12. Tabertero A, Bolaños JP, Medina JM. Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem J* 1993; 294: 635-8.
13. Tabertero A, Jiménez C, Velasco A, Giaume C, Medina JM. The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation. *J Neurochem* 2001; 78:890-8.
14. Tojo A, Endou H. Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol* 1992; 263: 601-6.
15. Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 1996; 271: 900-7.
16. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:603-12.
17. Schnitzer JE, Oh P. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J Biol Chem* 1994; 269: 6072-82.
18. Singh RD, Puri V, Valiyaveetil JT, Marks DL, Bittman R, Pagano R. E. Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol Biol Cell* 2003; 14:3254-65.
19. Cessac-Guillemet AL, Mounier F, Borot C, Bakala H, Perichon M, Schaeveerbecke M, et al. Characterization and distribution of albumin binding protein in normal rat kidney. *Am J Physiol* 1996; 271:101-7.
20. Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD. The ALIAS (ALbumin In Acute Stroke) Phase III randomized multicentre clinical trial: design and progress report. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:1323-6.
21. Belayev L, Marcheselli VL, Khoutorova L, Rodriguez de Turco EB, Busto R, Ginsberg D, et al. Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke* 2005; 36:118-23.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.