

FORMACIÓN
2007

FORMACIÓN

**ESTUDIO DEL RECEPTOR DE LA ALBÚMINA
EN ASTROCITOS Y SU IMPORTANCIA
EN LA RESPUESTA AL DAÑO CEREBRAL**

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

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.com

Autor

André Fábio Bento Abreu
INCYL, Universidad de Salamanca, España.

Colaboradores

Ana Velasco,
Arantxa Tabernero
José M. Medina

Autor correspondiente

José M. Medina,
Instituto de Neurociencias de Castilla y León

Índice

1.	Resumen	4
2.	Introducción	4
3.	Material y Métodos	4
4.	Resultados	6
5.	Discusión	11
6.	Bibliografía	12

1. RESUMEN

Previamente, hemos mostrado que la internalización de la albúmina en los astrocitos promueve la síntesis del ácido oleico, un factor neurotrófico que induce la diferenciación neuronal. Aunque se conozca el mecanismo por el cual la albúmina induce la síntesis del ácido oleico, la naturaleza del receptor, bien como el tipo de endocitosis empleada en este proceso se desconoce. En este trabajo, hemos observado que la megalina y la caveolina-1, pero no la clatrina, colocalizan con la albúmina en la membrana plasmática. Además, el silenciamiento de la megalina y de la caveolina-1 por siRNA reduce la capacidad de la albúmina para unirse a la membrana e internalizarse, bien como reduce la capacidad de los astrocitos para sintetizar el factor neurotrófico ácido oleico. Sin embargo, el silenciamiento de la clatrina no modifica la internalización de la albúmina ni la síntesis del ácido oleico. En conjunto, los resultados indican que la megalina es el receptor para la endocitosis dependiente de caveolas de la albúmina en los astrocitos y que este proceso se requiere para la síntesis del factor neurotrófico ácido oleico. 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.

Abreviaturas: BSA, albúmina sérica bovina; DAPI, 4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro; DIV, días in vitro; DMEM, medio de Eagle modificado por Dulbecco's; FCS, suero fetal bovino; FITC, isotiocianato de fluoresceína; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PBS, tampón fosfato salino; RT-PCR, retrotranscripción - reacción en cadena de la polimerasa; siRNA, RNA de interferencia de cadena corta.

Descriptor: Astrocito, SNC, ácido oleico, albúmina, siRNA, caveolas, clatrina, endocitosis.

2. INTRODUCCIÓN

La relevancia clínica de la albúmina en el cerebro ha sido demostrada por un gran número de estudios publicados. Se ha descrito que la albúmina entra en el cerebro adulto en condiciones de hipoxia y tras daño en la barrera hematoencefálica (Plateel et al. 1997). De acuerdo con esto, recientes publicaciones han demostrado que la albúmina ejerce un efecto beneficioso neuroprotector en el cerebro tras un infarto cerebral agudo (Belayev et al. 2001; Belayev et al. 2005a; Palesch et al. 2006).

Además, recientemente se ha descrito que 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 (Taberner et al. 2001a). De esta forma, es tentador especular que la albúmina pueda también tener un papel importante en la reparación neuronal en respuesta a tales insultos, 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 (Habgood et al. 1992). Sin embargo, la naturaleza de este receptor era todavía 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 tubo proximal (Christensen and Verroust 2002). Además, la endocitosis de la albúmina mediada por la megalina puede ocurrir por endocitosis dependiente de clatrina (Christensen et al. 1998) o por endocitosis dependiente de caveolas (Carro et al. 2005).

En este trabajo hemos estudiado el mecanismo molecular de internalización de la albúmina en astrocitos. Los resultados indican que la megalina es el receptor para la internalización, mediada por caveolas, de la albúmina en los astrocitos. Además, tanto la megalina como las caveolas se requieren para la síntesis y liberación del factor neurotrófico ácido oleico por los astrocitos, un proceso que depende de la internalización de la albúmina en estas células. 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.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Material

El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), la poli-L-lisina, los inhibidores de proteasas, la albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos, la albúmina sérica bovina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) y el anticuerpo monoclonal de ratón contra BSA se adquirieron en Sigma. El suero fetal bovino (FBS), el medio de montaje para observaciones al microscopio *SlowFade Gold antifade reagent*, el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), los anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor594 contra inmunoglobulina de ratón, de oveja o de conejo, la proteína A inmovilizada en Sefarosa CL-4B (*Protein A Sepharose CL-4B*), el reactivo para la extracción del RNA (Trizol Reagent), así como los hexanucleótidos empleados como cebadores (*random hexamer primers*), los desoxirribonucleótidos (dNTPs), el ditiotreitól (DTT) y la enzima transcriptasa inversa (SuperScriptII Reverse Transcriptase), utilizados en la RT, y el reactivo Lipofectamina 2000 y el medio Opti-MEM, utilizados para las transfecciones de siRNA, fueron suministrados por Invitrogen (Barcelona, España). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la PCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, Reino Unido). La polimerasa de DNA Taq, utilizada en la PCR, fue adquirida en

Biotools. El inhibidor de RNasas y los RNAs de interferencia de cadena corta (*small interfering RNA*, siRNA) fueron adquiridos en Ambion (Cambridgeshire, Reino Unido o Austin, Texas, U.S.A.). Las membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro provinieron de la casa Bio-Rad (Reino Unido). Las películas de autorradiografía para la determinación de la quimioluminiscencia fueron películas médicas de Rayos-X de la marca Fujifilm (Madrid, España). El anticuerpo policlonal de oveja contra megalina fue donado por el Dr. P.J. Verroust (*Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale*, Paris, Francia). El anticuerpo monoclonal de ratón contra la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el anticuerpo policlonal de conejo contra la caveolina-1 han sido adquiridos en Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena pesada de la clatrina procedió de BD Transduction Laboratories (Becton Dickinson). Los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón, conejo u oveja, conjugados con peroxidasa y el sustrato quimioluminiscente luminol provinieron de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, U.S.A.). Otros productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, Spain) o en Merck (Barcelona, Spain).

Animales de experimentación

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.

Cultivo primario de astrocitos

Los cultivos primarios de astrocitos de ratas Wistar se realizaron según descrito (Tabernero et al. 1993), manteniéndose en cultivo a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂.

Tratamientos celulares

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. Después, 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 albumina 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 incubaron 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 albumina, los astrocitos se lavaron abundantemente con PBS a 4°C.

RT-PCR

El RNA total fue extraído con Trizol, precipitado con isopropanol y purificado con etanol al 75%, según las instrucciones del fabricante. 1mg de RNA total fue transcrito a

cDNA empleando hexanucleótidos como cebadores, desoxirribonucleótidos (dNTPs), inhibidor de RNasas y la enzima SuperScriptII Reverse Transcriptase, en un volumen final de 50 µl, según las instrucciones del fabricante. Para la amplificación del cDNA del gen de interés por PCR, se utilizó la polimerasa de DNA Taq. La mezcla de reacción consistió en 2 µL de cDNA molde, 0,4 mM de una pareja de cebadores específicos, 0,2 mM de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs), 1 U de la polimerasa de DNA Taq, 5 µL del tampón de la polimerasa y 2 mM de MgCl₂, en un volumen final de 50 µL. Los cebadores utilizados para la amplificación de la megalina de rata fueron: 5'gggtgtgtgacgaggataagg y 5' agttgcaattgcgctcatcg, que generan un producto de 401pb; los cebadores utilizados para la amplificación de la β-actina de rata fueron: 5' gagcaccctgtgctgctcaccgagg and 5'gtggtgtgaagctgtagccacgct, que generan un producto de 300pb. El programa de PCR consistió en 5 minutos de desnaturalización, seguidos de 35 ciclos (25 para la β-actina) de desnaturalización (45 segundos a 94°C), anillamiento (30 segundos a 55°C) y extensión (90 segundos a 72°C) y por una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1% (p/v) en presencia de bromuro de etidio al 0,005% (v/v). Se tomaron fotografías de los productos de PCR con un transiluminador de luz ultravioleta.

Inmunocitoquímica

Para los ensayos de inmunofluorescencia, después de los tratamientos celulares, las células se fijaron con formaldeído 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), con anticuerpo policlonal de conejo contra caveolina-1 (1:500) o con anticuerpo monoclonal de ratón contra clatrina (1:500), 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), durante 1 hora a temperatura ambiente. El DNA nuclear se tiñó con DAPI (2,5 mg/mL en PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se montaron utilizando un agente preservador de la fluorescencia (*Slowfade Gold Antifade kit*). 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).

Western 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 mg/ml antipaina, 0.5 mg/ml amastatina, 0.5 mg/ml pepstatina, 0.5 mg/ml leupeptina, 0.5 mg/ml bastatina y 0.5 mg/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 mg del extracto proteico se aplicaron en geles de acrilamida (SDS-PAGE) de 5% o 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Tabernero et al. 2001b). 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, 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. 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 ml del sobrenadante se incubó con 2 mg 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 ml de proteína-A Sepharosa CL-4B por centrifugación (1 minuto, 10000 x g, 4°C). Las proteínas se eluiron con 30 ml 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

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 Mega-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 complexados 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, siguiendo el método previamente descrito (Tabernero et al. 2001a), con algunas modificaciones. Brevemente, los astrocitos se lavaron con PBS y se incubaron con DMEM en presencia de BSA al 2% (p/v). Una hora después, se recogió el medio de incubación y

se añadió ácido margárico 31 nM (C17:0; ácido heptadecanoico), utilizado simultáneamente como control interno de la extracción y como estándar interno para la cuantificación de los ácidos grasos. En seguida se procedió a la extracción de los lípidos siguiendo el método de Bligh y Dyer (Bligh and Dyer 1959). El método de separación e identificación de ácidos grasos mediante HPLC está basado en el descrito por Puttmann (Puttmann et al. 1993). Los ácidos grasos se analizaron por HPLC como esteres de bromofenacil derivatizados, con un gradiente de elución (desde 85%:15% (v/v) acetonitrilo:agua desionizada a 100% acetonitrilo) a un flujo de 1,5 mL/min, durante 30 minutos, utilizando una columna de sílica en fase reversa C18 refrigerada a 0-4°C. El eluyente se hizo pasar a través de un detector UV "diode array", fijado a una longitud de onda de 254 nm. Las señales se canalizaron hasta integrarse en un computador. Los picos de los ácidos grasos se han identificado por los tiempos de retención respecto al estándar interno, el ácido margárico. Las concentraciones de los ácidos grasos han sido calculadas con base en la área del pico del ácido graso de interés respecto al área del pico del ácido margárico.

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 $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

La megalina es un receptor multiligando, implicado en la internalización de la albúmina por endocitosis mediada por receptor en varios tipos celulares, como las células del túbulo proximal renal, del endotelio pulmonar, del endotelio del plexo coroideo o del epitelio mamario (Christensen et al. 1998; Schubert et al. 2001; Monks and Neville 2004; Carro et al. 2005) (para una revisión ver (Christensen and Birn 2002)). Sin embargo, la endocitosis de la albúmina mediada por el receptor megalina puede ocurrir mediante un mecanismo dependiente de clatrina (Christensen et al. 1998) o a través de un mecanismo independiente de clatrina, la endocitosis por caveolas (Schubert et al. 2001; Carro et al. 2005). Además, en astrocitos, se ha descrito que la albúmina se internaliza por endocitosis mediada por receptor (Tabernero et al. 2002).

4.1. La megalina, la caveolina-1 y la clatrina se expresan en astrocitos en cultivo primario

Para elucidar el receptor por el que la albúmina es internalizada en astrocitos, así como el tipo de endocitosis empleada para la internalización de la albúmina, se inves-

tigó la posible expresión de megalina y de las proteínas constituyentes de las vesículas endocíticas, caveolina-1 y clatrina, en astrocitos de 14 días *in vitro* (14 DIV).

Inicialmente, se analizaron los niveles de expresión del mRNA de la megalina mediante análisis de RT-PCR del RNA total, extraído de astrocitos cultivados 14 DIV, usando cebadores específicos para la megalina. La expresión de la b-actina se analizó como control de carga. Los resultados muestran que la megalina se expresa en los astrocitos en cultivo primario (Figura 1A). A continuación, se analizaron los niveles de expresión proteica de la megalina, de la caveolina-1 y de la clatrina mediante inmunocitoquímica y *Western blot* en astrocitos cultivados 14 DIV. Los resultados muestran que la megalina, la caveolina-1 y la clatrina se expresan en astrocitos en cultivo primario (Figura 1 B y C). El riñón, un tejido donde la expresión de la megalina es elevada, se utilizó como control positivo.

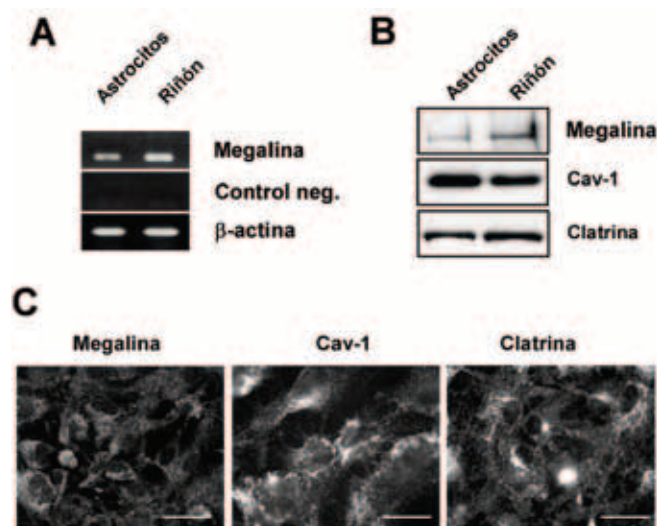


Figura 1. Expresión de megalina, caveolina-1 y clatrina en astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos de rata se cultivaron como se describe en "Materiales y Métodos". **A** El RNA total se extrajo de astrocitos 14 DIV y el mRNA de la megalina se analizó por RT-PCR. Los niveles de mRNA de b-actina se utilizaron como control de carga. Se llevaron a cabo PCRs del RNA total como controles negativos. El análisis de Western blot (**B**) y la inmunocitoquímica (**C**) revelaron la expresión de megalina, caveolina-1 y clatrina en astrocitos de 14 DIV. En A y B, la corteza renal se utilizó como control positivo. En C, Barra de calibrado: 20 mm.

4.2. La albúmina interacciona con la megalina en la membrana de los astrocitos

Con objeto de conocer si la albúmina interacciona con la megalina en astrocitos, se realizaron experimentos de colocalización entre la albúmina y la megalina. Para ello, los astrocitos se incubaron en presencia de FITC-BSA, permitiendo que la albúmina se uniera a su receptor y, seguidamente, se realizó una inmunocitoquímica contra la megalina. La distribución de los dos fluoróforos se analizó por microscopía confocal (Figura 2 A; albúmina en verde y megalina en rojo). Los resultados sugieren que la albúmina colocaliza con la megalina en la membrana de los astrocitos, dado que la imagen superimpuesta muestra color amarillo (Figura 2 A).

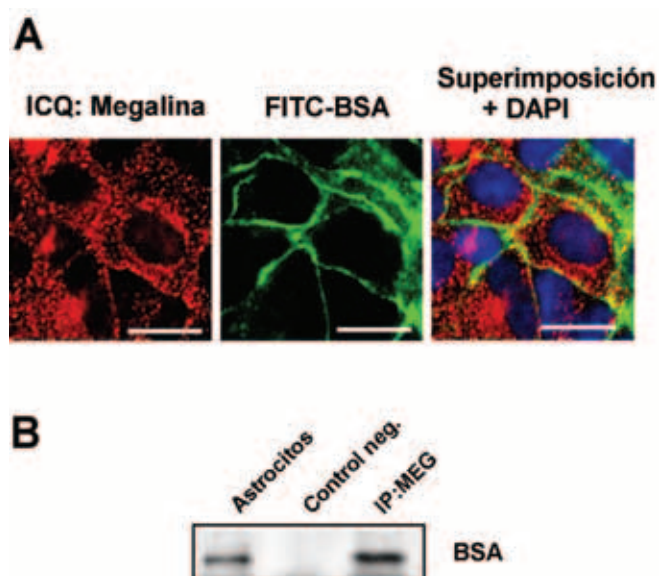


Figura 2. Interacción de la albúmina con la megalina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se incubaron durante 12 horas en DMEM sin suero. Las células fueron seguidamente incubadas a 4°C durante 20 minutos con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o con BSA al 2% (p/v), para los experimentos de inmunoprecipitación (B), como se describe en "Material y Métodos". **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 mm. **B** Western blot de BSA. Las células se incubaron a 4°C durante 20 minutos con BSA al 2% (p/v), como se describe en "Material y Métodos". Tras varios lavados, las proteínas se extrajeron e inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra megalina. El análisis de Western blot de BSA se realizó en estos inmunocomplejos. 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.

Para confirmar la posible interacción de la albúmina con la megalina, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación. Después de incubar los astrocitos con albúmina, las proteínas extraídas de los astrocitos se inmunoprecipitaron con anticuerpo policlonal contra la megalina. Seguidamente, se analizó la presencia de la albúmina en los inmunocomplejos por *Western blot*. Los resultados muestran que el anticuerpo contra la megalina también precipitó la albúmina (Figura 2 B). 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.

4.3. La albúmina y la megalina interaccionan con la caveolina-1, pero no con la clatrina, en la unión de la albúmina a la membrana de los astrocitos

Con objeto de conocer si la albúmina interaccionaba con la caveolina-1 o la clatrina en astrocitos, se realizaron experimentos de colocalización entre estas proteínas y la albúmina. Para ello, se incubaron los astrocitos en presencia de FITC-BSA, posibilitando que la albúmina se uniera a la membrana y, seguidamente, se realizó una inmunocitoquímica contra caveolina-1 y clatrina. Los resultados muestran que la albúmina colocaliza con la caveolina-1 en la membrana de los astrocitos, pero no con la clatrina (Figura 3 A).

toquímica contra las proteínas de interés. La distribución de los dos fluoróforos se analizó por microscopía confocal (Figura 3 A; albúmina en verde y caveolina-1 o clatrina en rojo). Los resultados muestran que la albúmina colocaliza con la caveolina-1 en la membrana de los astrocitos, a juzgar por el color amarillo observado en las imágenes superimpuestas, pero no con la clatrina (Figura 3 A).

Para corroborar los resultados obtenidos en los experimentos de inmunocitoquímica y, además, para conocer si la albúmina y la megalina interactúan con la caveolina-1 o con la clatrina durante la unión de la albúmina a la membrana de los astrocitos en cultivo primario, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación. Las proteínas extraídas de los astrocitos se inmunoprecipitaron con un

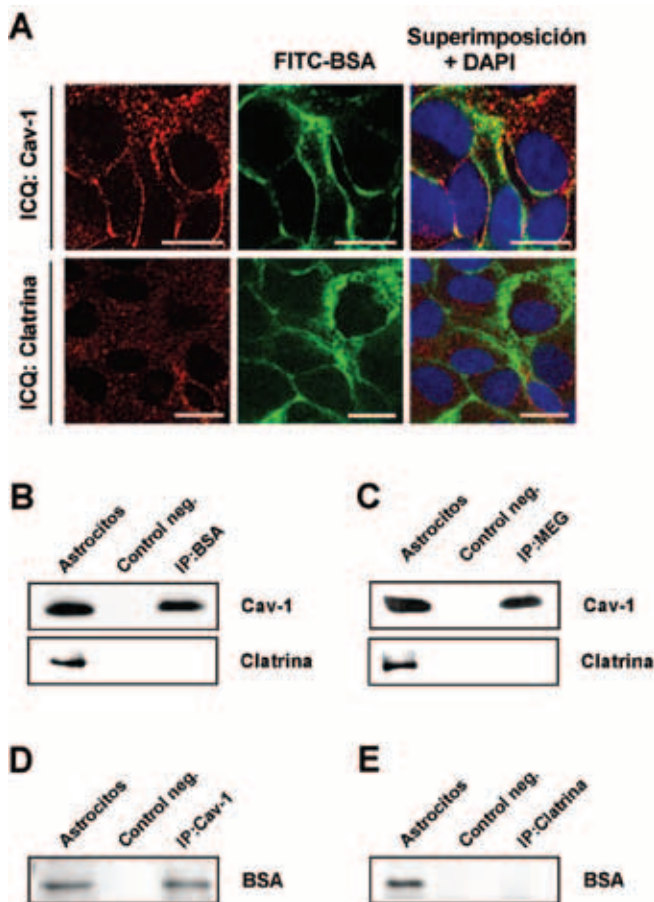


Figura 3. Interacción de la albúmina y de la megalina con caveolina-1, pero no con clatrina, en la unión de la albúmina a los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se incubaron durante 12 horas en DMEM sin suero. Después, las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (A) o con BSA al 2% (p/v) (B-F). **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. En los experimentos de coimmunoprecipitación (B-F), tras varios lavados, las proteínas se extrajeron e inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra la BSA (**B**), la megalina (**C**), la caveolina-1 (**D**) o la clatrina (**E**). Los análisis de Western blot de la BSA, la caveolina-1 o la clatrina se realizaron en estos inmunocomplejos. 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.

anticuerpo monoclonal contra la BSA o con anticuerpo policlonal contra la megalina. Seguidamente, se analizó la presencia de la caveolina-1 o la clatrina en los inmunocomplejos por Western blot. Los resultados muestran que los anticuerpos contra la BSA y contra la megalina también precipitaron la caveolina-1, pero no la clatrina (Figura 3 B y C). 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 inmunoprecipitación de la caveolina-1, pero no tras la inmunoprecipitación de la clatrina (Figura 3 D y E). 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.

4.4. El silenciamiento de megalina disminuye la unión e internalización de albúmina en astrocitos

Para determinar si la megalina funciona como receptor para la albúmina en los astrocitos, la expresión de la megalina se silenció por siRNA. Se utilizó como control una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana (designada NT-siRNA). 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) (Figura 4 A, ICQ: Megalina). La cuantificación de estos resultados reveló una reducción de 65% de la expresión de la megalina (Figura 4 C).

A continuación, se quiso determinar la unión e internalización de la albúmina en estas circunstancias. Para los experimentos de unión de albúmina, tras la transfección con siRNA, los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C, en presencia de FITC-BSA al 0,5% (p/v) o de BSA al 2% (p/v). La figura 4 A muestra la reducción en la unión de la FITC-BSA en los astrocitos transfectados con Meg-siRNA, cuando se comparan con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El análisis de Western blot muestra una reducción de más del 50% en la unión de albúmina en los astrocitos cuya megalina fue silenciada (Figura 4 B). Esta reducción es coherente con la eficacia del silenciamiento de la megalina (Figura 4 C).

Para analizar la internalización de la albúmina, los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C en presencia de FITC-BSA al 0,5% (p/v) o de BSA al 2% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos, para permitir la internalización de la albúmina. La figura 5 A muestra la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya megalina fue silenciada, cuando se comparan con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. El análisis de Western blot muestra que la internalización de la albúmina disminuyó cerca del 50% en los astrocitos tras el silenciamiento de la megalina (Figura 5 B), siendo esta reducción coherente con la eficacia del silenciamiento de la megalina (cerca del 65%; Figura 4 C).

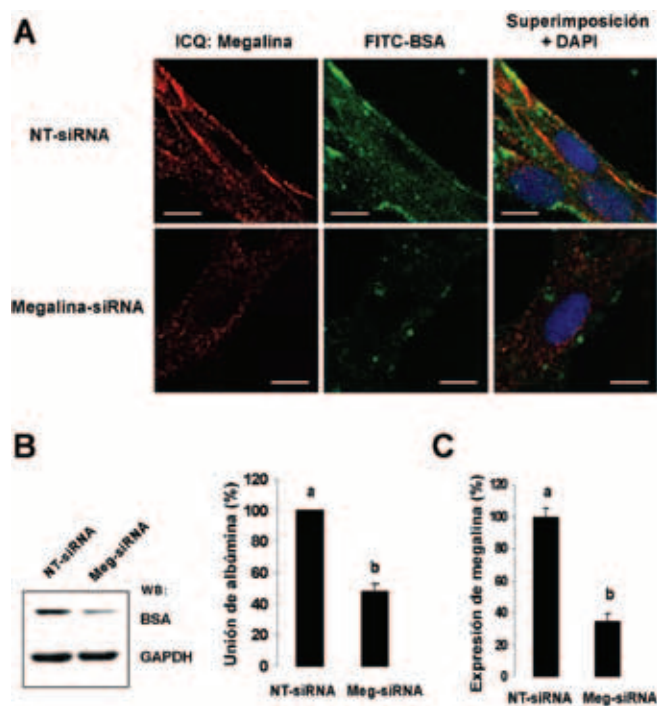


Figura 4. El silenciamiento de la megalina disminuye la unión de la albúmina a los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Meg-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v) para el análisis de Western blot (B). **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 mm. Western blot y cuantificación de BSA (**B**) y de megalina (**C**) en astrocitos transfectados con Meg-siRNA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (One-way ANOVA seguido del test Tukey HSD).

4.6. El silenciamiento de la caveolina-1, pero no de la clatrina, disminuye la internalización de la albúmina en los astrocitos

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. Se utilizó como control una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana (designada NT-siRNA). En estas condiciones se estudió el proceso de internalización de la albúmina. Para ello, los astrocitos se incubaron durante 20 minutos a 4°C, en presencia de FITC-BSA al 0,5% (p/v) o de BSA al 2% (p/v) y, a continuación, se transfirieron a 37°C durante 10 minutos, para permitir la internalización de la albúmina. Los resultados obtenidos muestran una reducción de la internalización de FITC-BSA en los astrocitos transfectados con Cav1-siRNA,

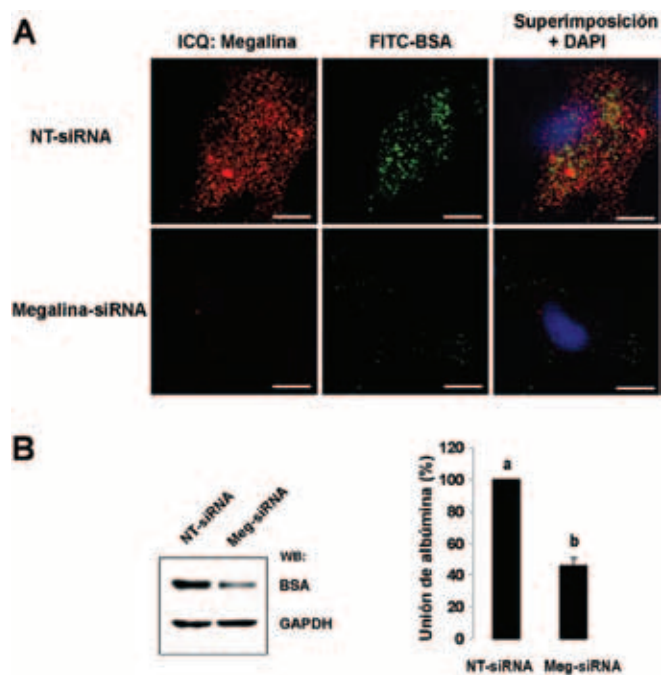


Figura 5. El silenciamiento de la megalina disminuye la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA o con Meg-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v), para el análisis de Western blot (B). A continuación, las células se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de megalina (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya megalina 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 mm. **B** Western blot y cuantificación de BSA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (One-way ANOVA seguido del test Tukey HSD).

cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA (Figura 6 A). Del mismo modo se verificó, después del análisis de Western blot, una disminución en la internalización de la albúmina del 58% en los astrocitos con la expresión de la caveolina-1 silenciada, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA (Figura 6 B), siendo esta reducción coherente con la eficacia del silenciamiento de la caveolina-1 (cerca del 80%) (Figura 6 C).

Sin embargo, el silenciamiento de la clatrina no modificó la internalización de la albúmina en estos astrocitos.

Como se observa en la figura 7 A, los niveles de FITC-BSA son idénticos en la situación control (NT-siRNA) y en los astrocitos transfectados con Clat-siRNA. La cuantificación del análisis de Western blot reveló un ligero incremento (cerca del 8%), no significativo, de la internalización de albúmina en los astrocitos cuya clatrina fue silenciada, respecto a la situación control (NT-siRNA)

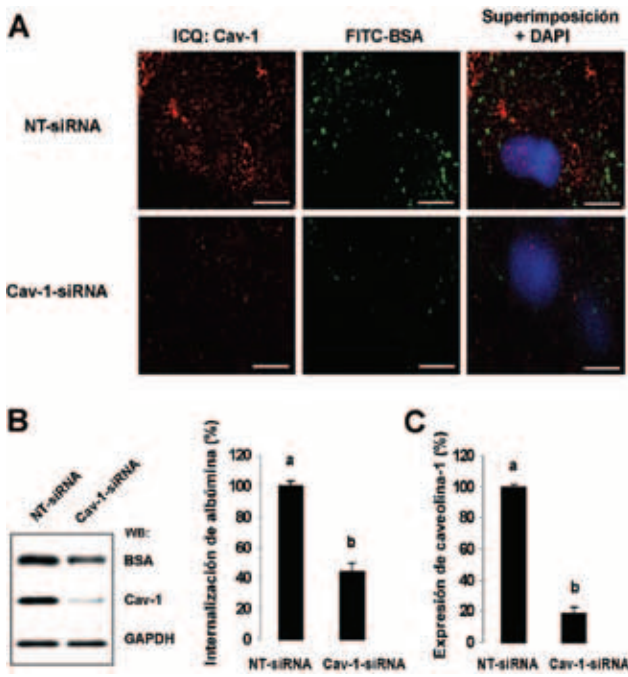


Figura 6. El silenciamiento de la caveolina-1 disminuye la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA y con Cav-1-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v), para los experimentos de inmunocitoquímica (A), o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v), para el análisis de Western blot (B). A continuación, las células se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **A** Doble inmunofluorescencia para la inmunocitoquímica de caveolina-1 (rojo) y FITC-BSA (verde). Las imágenes confocales muestran la reducción en la internalización de FITC-BSA en los astrocitos cuya caveolina-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 mm. Western blot y cuantificación de BSA (B) y de caveolina-1 (C) en astrocitos transfectados con Cav-1-siRNA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias ± SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey HSD).

(Figura 7 B). Se debe mencionar que la reducción en la expresión de la clatrina los astrocitos transfectados con Clat-siRNA, respecto a la situación control (NT-siRNA) fue de cerca del 50% (Figura 7 C).

4.7. El silenciamiento de la caveolina-1, pero no de la clatrina, disminuye la liberación del ácido oleico por los astrocitos

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la captación y transcitosis de la albúmina en los astrocitos induce la síntesis y liberación del ácido oleico, que actúa como factor neurotrófico induciendo la diferenciación neuronal (Taberner et al. 2001a; Taberner et al. 2002). Para estudiar la participación de la megalina, de la caveolina-1 y de la clatrina en la síntesis del ácido oleico promovida por la albúmina, los astrocitos se transfectaron con NT-siRNA, megalina-siRNA, caveolina-1-siRNA o clatrina-siRNA y posteriormente se

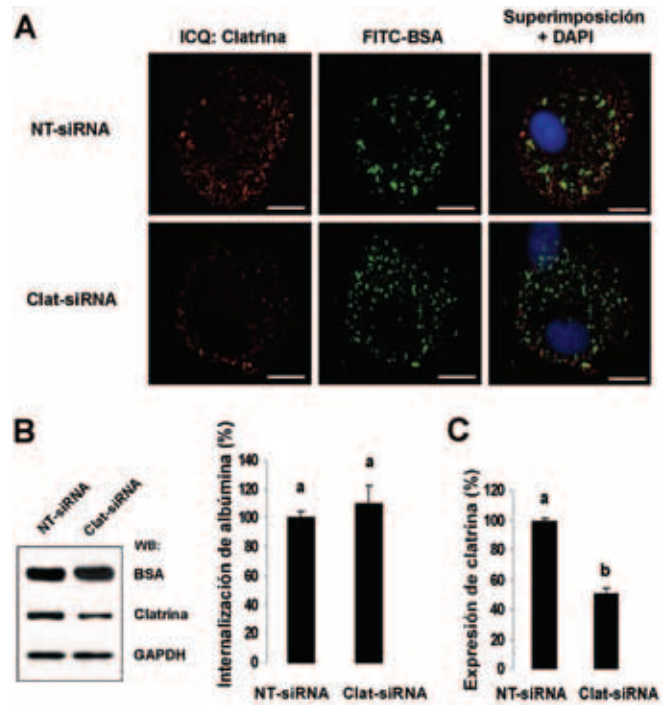


Figura 7. El silenciamiento de la clatrina no modifica la internalización de la albúmina en astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA y Clat-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con FITC-BSA al 0,5% (p/v) (A) o en ausencia o en presencia de BSA al 2% (p/v) (B). A continuación, las células se transfirieron a 37°C durante 10 minutos. **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 mm. Western blot y cuantificación de BSA (B) y de clatrina (C) en astrocitos transfectados con Clat-siRNA. Los valores se normalizaron contra GAPDH y son medias ± SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey HSD).

incubaron con albúmina al 2% durante 1 hora. El medio de incubación se recojió y la presencia de ácido oleico se analizó por HPLC. Con base en los tiempos de resolución y los estándares internos añadidos, los ácidos oleico, palmítico y margárico se identificaron (Figura 8 A). Los resultados indican que el pico del ácido oleico se reduce significativamente en los astrocitos transfectados con megalina-siRNA y con caveolina-1-siRNA, pero no con clatrina-siRNA, cuando se compara con los astrocitos transfectados con NT-siRNA. La figura 8B muestra la cuantificación del área del pico de ácido oleico respecto a la cantidad, conocida, de ácido margárico. Así, cuando la expresión de la megalina y de la caveolina-1 se silenció 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.

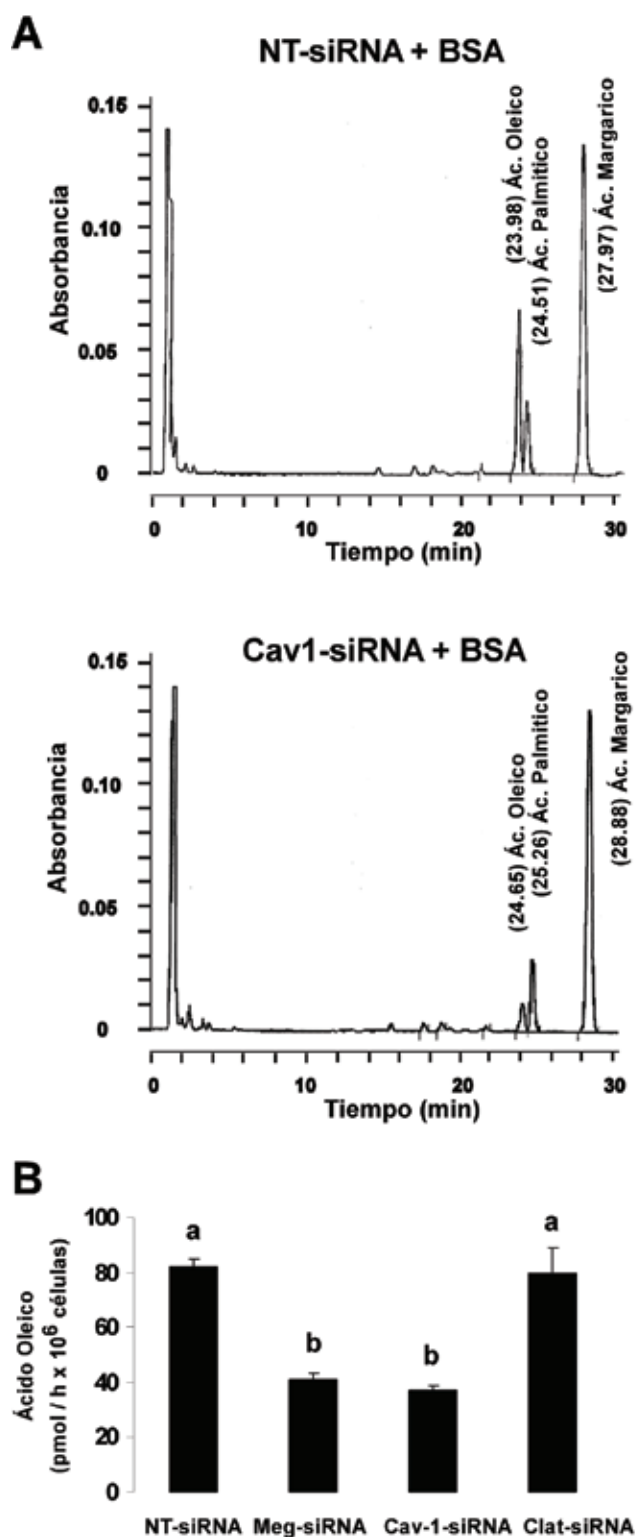


Figura 8. El silenciamiento de la caveolina-1, pero no de la clatrina, disminuye la liberación del ácido oleico por los astrocitos. Los astrocitos de 14 DIV se transfectaron con NT-siRNA, Meg-siRNA, Cav-1-siRNA y Clat-siRNA. Después de 48 horas, los astrocitos se cultivaron en DMEM sin suero durante 12 horas. Las células fueron incubadas durante 1 hora a 37°C en presencia de BSA al 2% (p/v). **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. Letras distintas indican diferencias significativas; $p < 0,01$ cuando se compara con el control (*One-way ANOVA* seguido del test Tukey *HSD*).

5. 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 (Tojo and Endou 1992). En este sentido, se identificó la megalina como el receptor de la albúmina en las células del túbulo proximal de rata (Cui et al. 1996). La megalina es una glicoproteína de membrana, que tiene múltiples ligandos macromoleculares, incluyendo la albúmina (Mayor and Pagano 2007). La megalina está implicada en la internalización de la albúmina tanto por endocitosis mediada por clatrina como por caveolas (Christensen et al. 1998; Carro et al. 2005).

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) (Tabernero et al. 2002). Se debe mencionar que la existencia de un receptor específico para la albúmina en el cerebro se ha postulado durante décadas (Habgood et al. 1992). 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 (Figura 1), que colocaliza con la albúmina en la membrana plasmática (Figura 2). 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. Así, 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 (Figura 4). Además, la internalización de la albúmina disminuyó notablemente en los astrocitos silenciados en megalina (Figura 5). 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 (Schnitzer and Oh 1994; Christensen et al. 1998; Schubert et al. 2001; Singh et al. 2003; Carro et al. 2005) 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 (Cessac-Guillemet et al. 1996). De hecho, se ha sugerido que gp30 y gp60 son productos de degradación de la cubilina, una proteína que une albúmina y que se coexpresa con la megalina en algunos tejidos, puesto que anticuerpos contra cubilina también reconocen proteínas con 30 y 60kDa (Birn et al. 2000).

La endocitosis de la albúmina mediada por la megalina puede ocurrir por endocitosis dependiente de clatrina (Christensen et al. 1998) o por endocitosis dependiente de caveolas (Carro et al. 2005). En los astrocitos, se desconoce el mecanismo de endocitosis que media la internalización de la albúmina. En este trabajo hemos demostrado 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 (Figura 1 B y C), la albúmina sólo interactúa con la proteína constituyente de las caveolas, la caveolina-1, en la membrana de los astrocitos (Figura 3 A, B, D y E). Del mismo modo, la megalina, en presencia de albúmina, interactúa con la caveolina-1, pero no con la clatrina, en la membrana de los astrocitos (Figura 3 C). 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 (Figura 6). 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 (Figura 7).

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 (Tabernero et al. 2001a Rodríguez-Rodríguez, 2004). 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 (Figura 8). Así, 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. Así, 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 pla-

quetaria y eritrocitaria. De hecho, la albúmina se utiliza para el tratamiento del infarto cerebral agudo, encontrándose en la fase III de ensayos clínicos (Ginsberg et al. 2006; Palesch et al. 2006).

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 movilizándolo los ácidos n-3 poliinsaturados. De hecho, uno de estos ácidos grasos, el ácido docosahexaenoico (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 (Belayev et al. 2005b). Así mismo, es tentador especular que la albúmina induce la síntesis del ácido oleico en los astrocitos que rodean la lesión, actuando este como agente neuroprotector, a semejanza del DHA.

Finalmente, el hecho de que la albúmina se internalice en los astrocitos por caveolas, puede dar lugar a nuevas posibilidades terapéuticas. Se encuentra descrito que el colesterol y los glicoesfingolípidos exógenos juegan un papel importante en la regulación de la endocitosis por caveolas. De hecho, la incubación de fibroblastos humanos con colesterol y glicoesfingolípidos estimula la endocitosis de albúmina por caveolas (Sharma et al. 2004). De esta forma, sería tentador especular que la utilización de colesterol o glicoesfingolípidos conjuntamente con la albúmina podría mejorar la eficacia del tratamiento del infarto cerebral agudo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Belayev L., Liu Y., Zhao W., Busto R. and Ginsberg M. D. (2001) Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **32**, 553-560.
- Belayev L., Saul I., Busto R., Danielyan K., Vigdorichik A., Khoutorova L. and Ginsberg M. D. (2005a) Albumin treatment reduces neurological deficit and protects blood-brain barrier integrity after acute intracortical hematoma in the rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **36**, 326-331.
- Belayev L., Marcheselli V. L., Khoutorova L., Rodriguez de Turco E. B., Busto R., Ginsberg M. D. and Bazan N. G. (2005b) Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **36**, 118-123.
- Birn H., Fyfe J. C., Jacobsen C., Mounier F., Verroust P. J., Orskov H., Willnow T. E., Moestrup S. K. and Christensen E. I. (2000) Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1353-1361.
- Bligh E. G. and Dyer W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- Carro E., Spuch C., Trejo J. L., Antequera D. and Torres-Aleman I. (2005) Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* **25**, 10884-10893.
- Cessac-Guillemet A. L., Mounier F., Borot C., Bakala H., Perichon M., Schaefferbeke M. and Schaefferbeke J. (1996) Characterization and distribution of albumin binding protein in normal rat kidney. *The American journal of physiology* **271**, F101-107.

- Christensen E. I. and Verroust P. J. (2002) Megalin and cubilin, role in proximal tubule function and during development. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **17**, 993-999.
- Christensen E. I. and Birn H. (2002) Megalin and cubilin: multi-functional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 256-266.
- Christensen E. I., Birn H., Verroust P. and Moestrup S. K. (1998) Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *International review of cytology* **180**, 237-284.
- Cui S., Verroust P. J., Moestrup S. K. and Christensen E. I. (1996) Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *The American journal of physiology* **271**, F900-907.
- Ginsberg M. D., Palesch Y. Y. and Hill M. D. (2006) The ALIAS (ALbumin In Acute Stroke) Phase III randomized multicentre clinical trial: design and progress report. *Biochemical Society transactions* **34**, 1323-1326.
- Habgood M. D., Sedgwick J. E., Dziegielewska K. M. and Saunders N. R. (1992) A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. *The Journal of physiology* **456**, 181-192.
- Mayor S. and Pagano R. E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 603-612.
- Monks J. and Neville M. C. (2004) Albumin transcytosis across the epithelium of the lactating mouse mammary gland. *The Journal of physiology* **560**, 267-280.
- Palesch Y. Y., Hill M. D., Ryckborst K. J., Tamariz D. and Ginsberg M. D. (2006) The ALIAS Pilot Trial: a dose-escalation and safety study of albumin therapy for acute ischemic stroke-II: neurologic outcome and efficacy analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **37**, 2107-2114.
- Plateel M., Teissier E. and Cecchelli R. (1997) Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J. Neurochem.* **68**, 874-877.
- Puttmann M., Krug H., von Ochsenstein E. and Kattermann R. (1993) Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. *Clinical chemistry* **39**, 825-832.
- Schnitzer J. E. and Oh P. (1994) Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *The Journal of biological chemistry* **269**, 6072-6082.
- Schubert W., Frank P. G., Razani B., Park D. S., Chow C. W. and Lisanti M. P. (2001) Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48619-48622.
- Sharma D. K., Brown J. C., Choudhury A., Peterson T. E., Holicky E., Marks D. L., Simari R., Parton R. G. and Pagano R. E. (2004) Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Molecular biology of the cell* **15**, 3114-3122.
- Singh R. D., Puri V., Valiyaveetil J. T., Marks D. L., Bittman R. and Pagano R. E. (2003) Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Molecular biology of the cell* **14**, 3254-3265.
- Tabernero A., Bolaños J. P. and Medina J. M. (1993) Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem. J.* **294**, 635-638.
- Tabernero A., Lavado E. M., Granda B., Velasco A. and Medina J. M. (2001a) Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* **79**, 606-616.
- Tabernero A., Jimenez C., Velasco A., Giaume C. and Medina J. M. (2001b) The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation. *J. Neurochem.* **78**, 890-898.
- Tabernero A., Velasco A., Granda B., Lavado E. M. and Medina J. M. (2002) Transcytosis of albumin in astrocytes activates the sterol regulatory element-binding protein-1, which promotes the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *The Journal of biological chemistry* **277**, 4240-4246.
- Tojo A. and Endou H. (1992) Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *The American journal of physiology* **263**, F601-606.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia FEDER SAF2003-06027 (José María Medina), FEDER SAF2004-00962 (Arantxa Tabernero) y Junta de Castilla y León SA005A06 (Arantxa Tabernero). André Bento-Abreu fue receptor de una Beca Larramendi 2008, de la Fundación Mapfre. Agradecemos al Prof. P. Verroust el anticuerpo contra la meglina.