

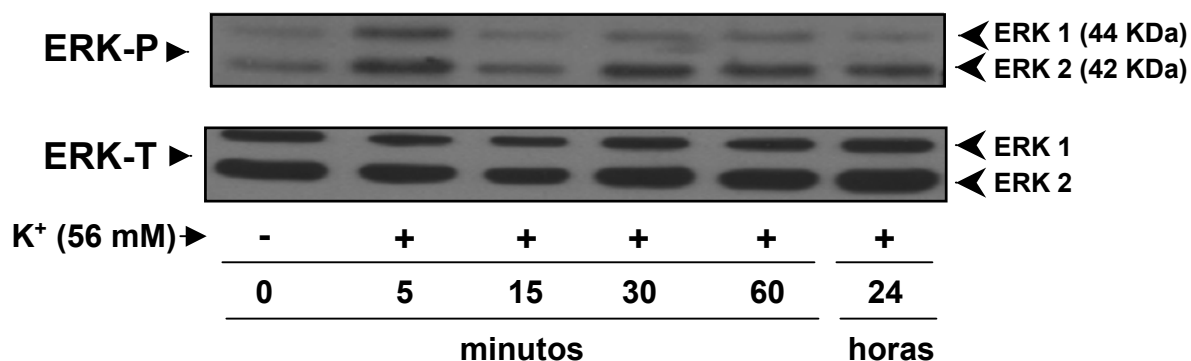
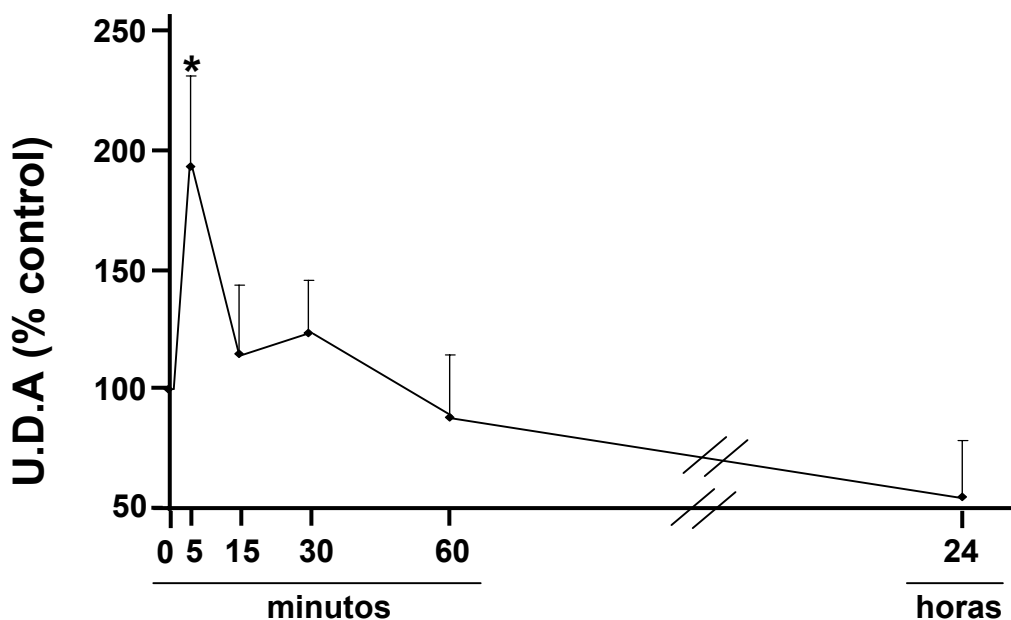
A**B**

Figura 1. Curva tiempo-respuesta de la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por K⁺. Células cerebrocorticales mantenidas en cultivo durante 10-11 días, fueron tratadas durante 5, 15, 30, 60 minutos y 24 horas con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, p<0,05.

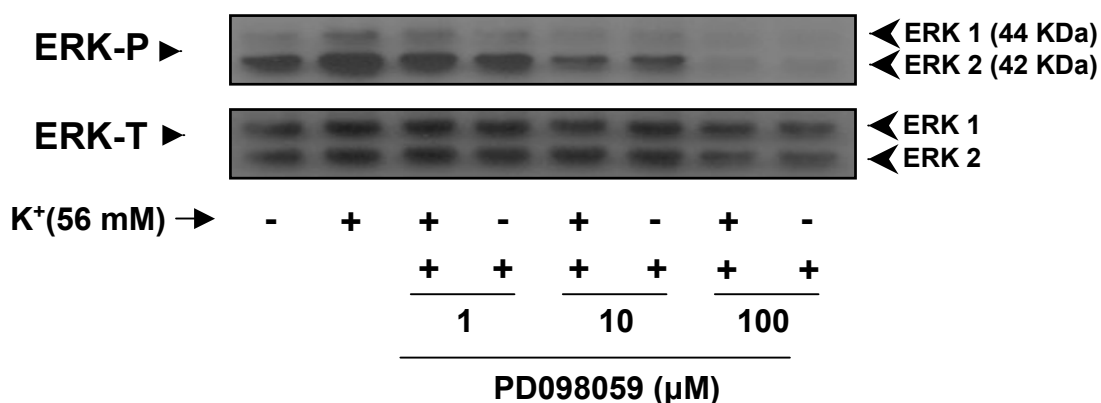
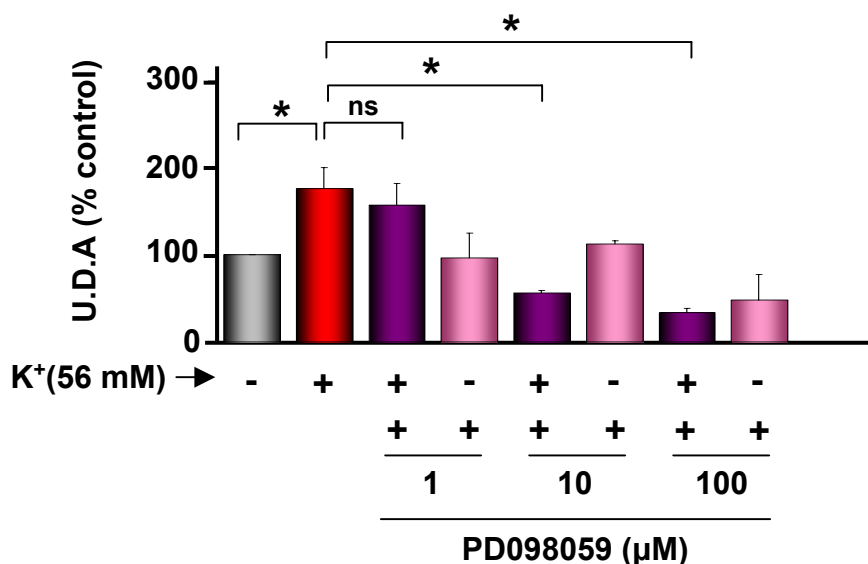
A**B**

Figura 2. Efecto del bloqueo de la vía MAPK (ERK 1/2) con el inhibidor PD098059 sobre la activación de la vía MAPK (ERK1/2) inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con PD098059 (1, 10 y 100 μM) y posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

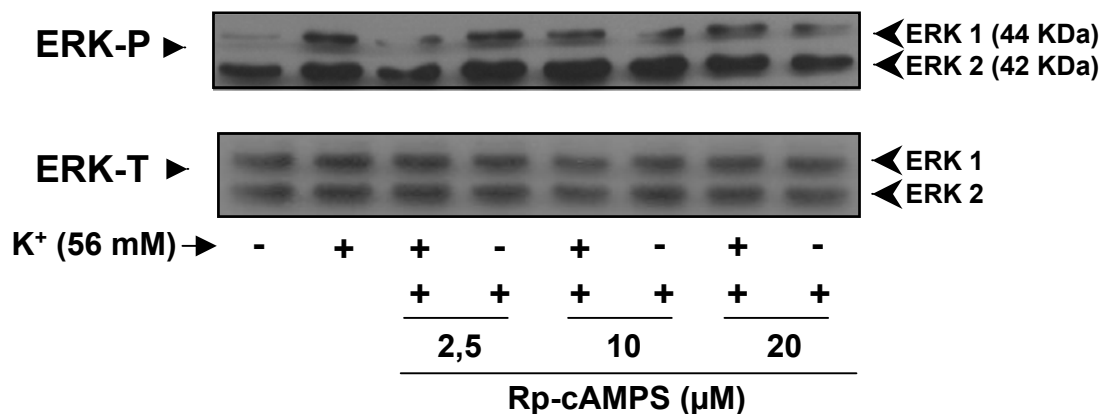
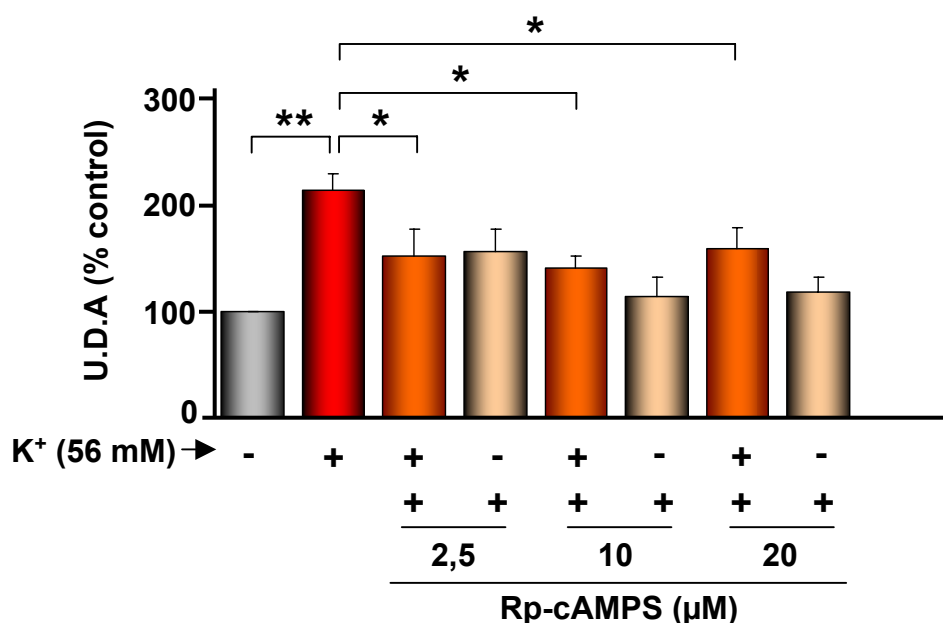
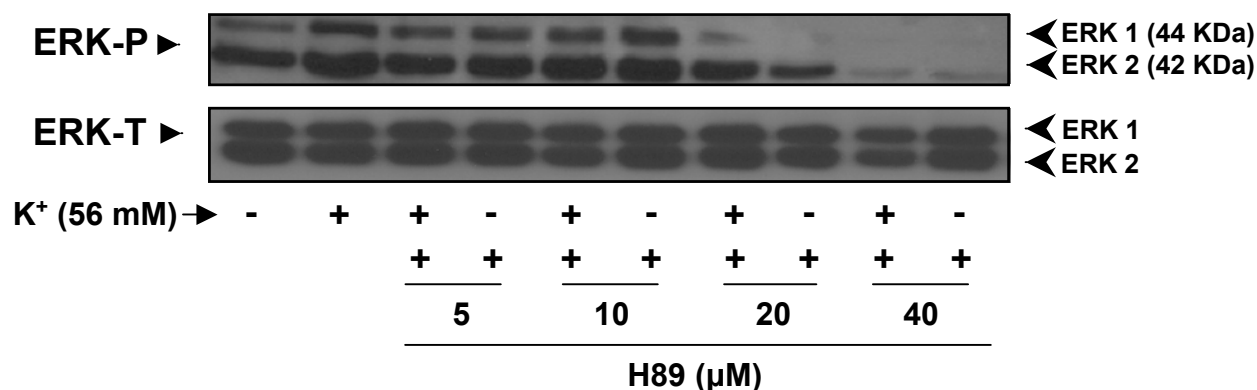
A**B**

Figura 3. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor Rp-cAMPS sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (2,5, 10 y 20 μM) y posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, **, p<0,01.

A



B

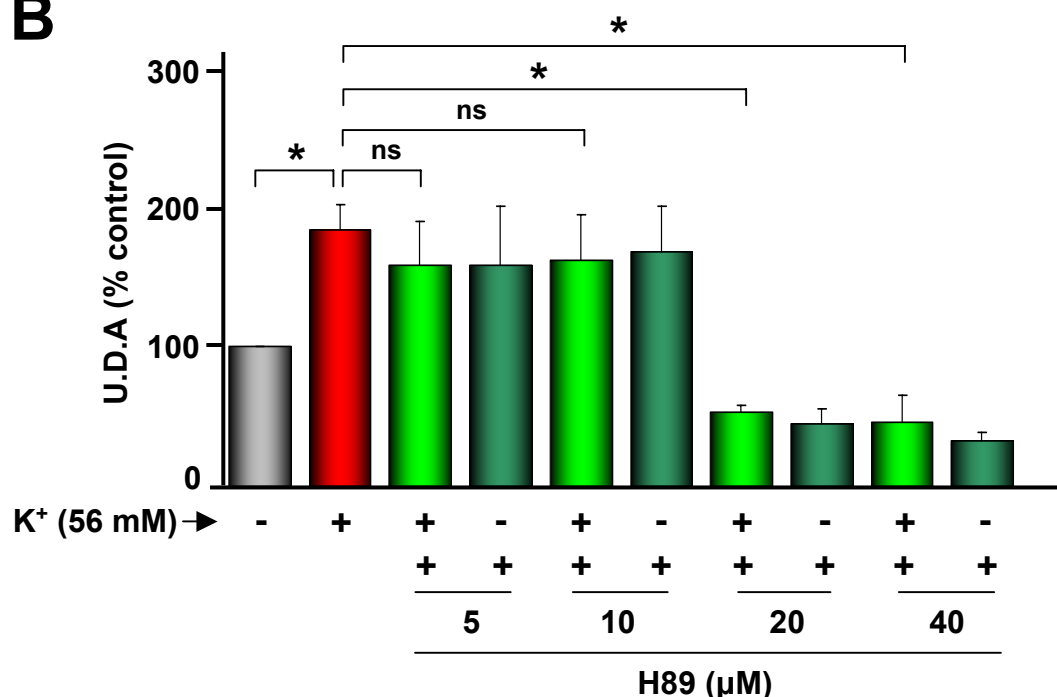


Figura 4. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor H89 sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con H89 (5, 10, 20 y 40 μM) y posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

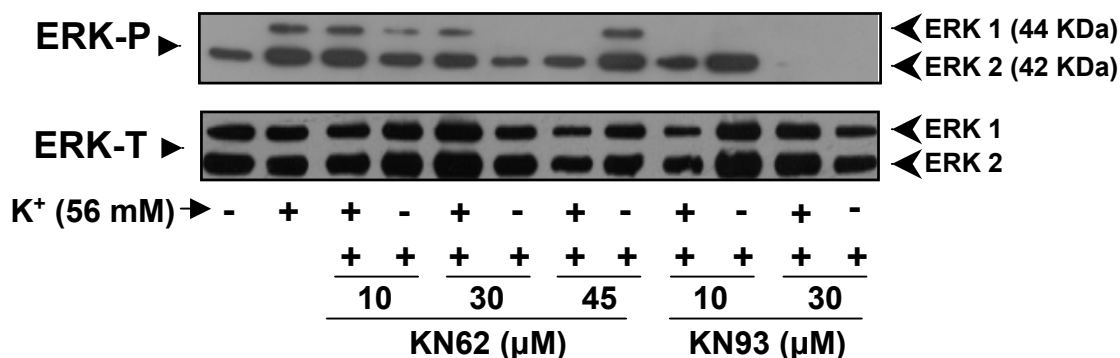
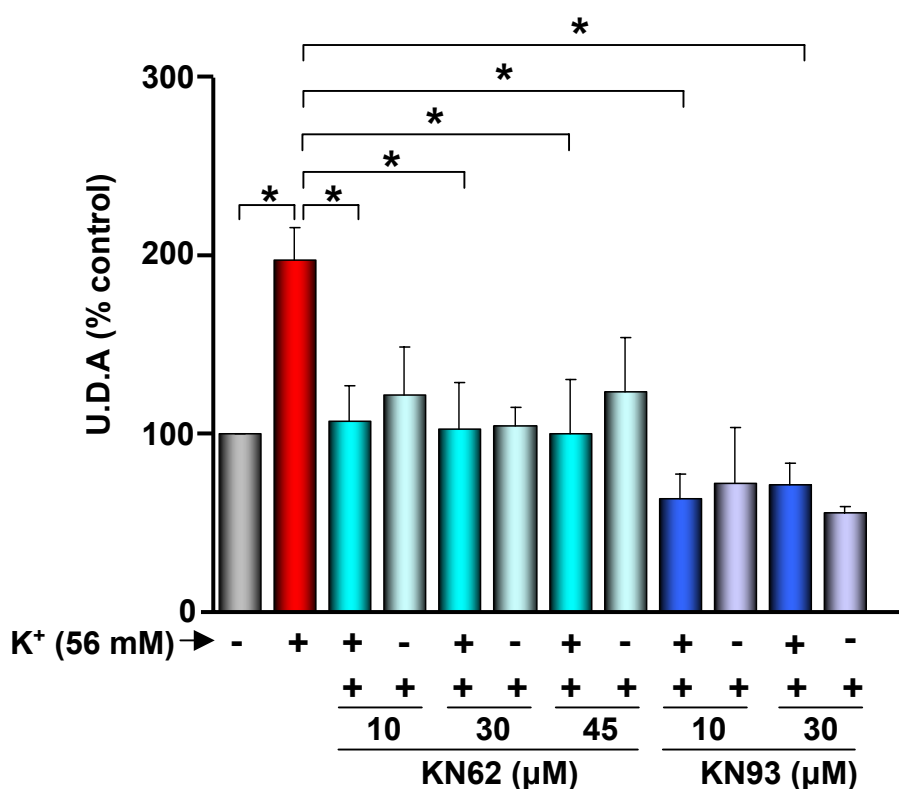
A**B**

Figura 5. Efecto del bloqueo de la vía CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93 sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con KN62 (10, 30 y 45 μM) o KN93 (10 y 30 μM) y posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p < 0,05.

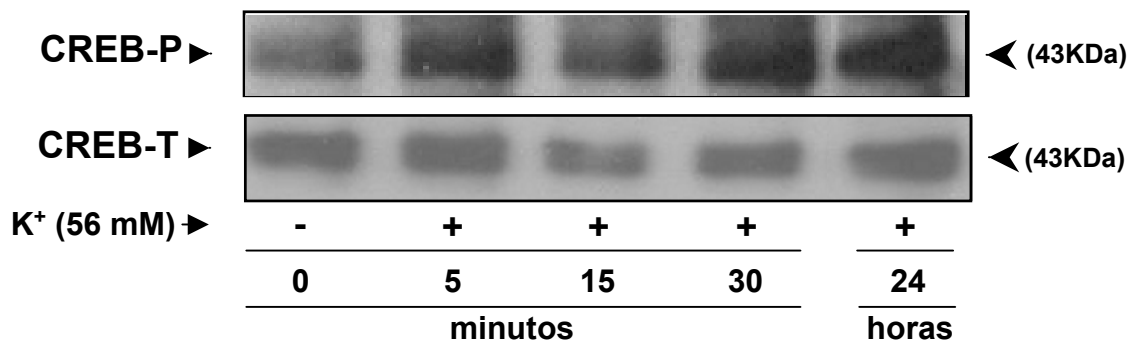
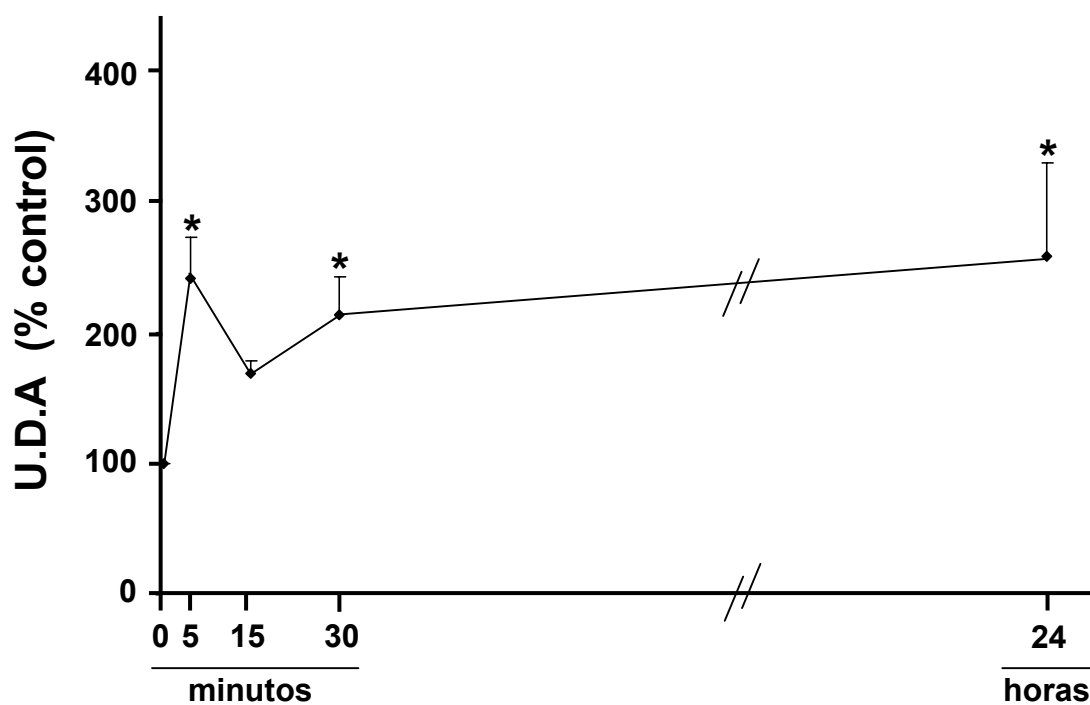
A**B**

Figura 6. Curva tiempo-respuesta de la activación de CREB por K⁺. Células cerebrocorticales mantenidas en cultivo durante 10-11 días fueron tratadas durante 5, 15, 30 minutos y 24 horas con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05.

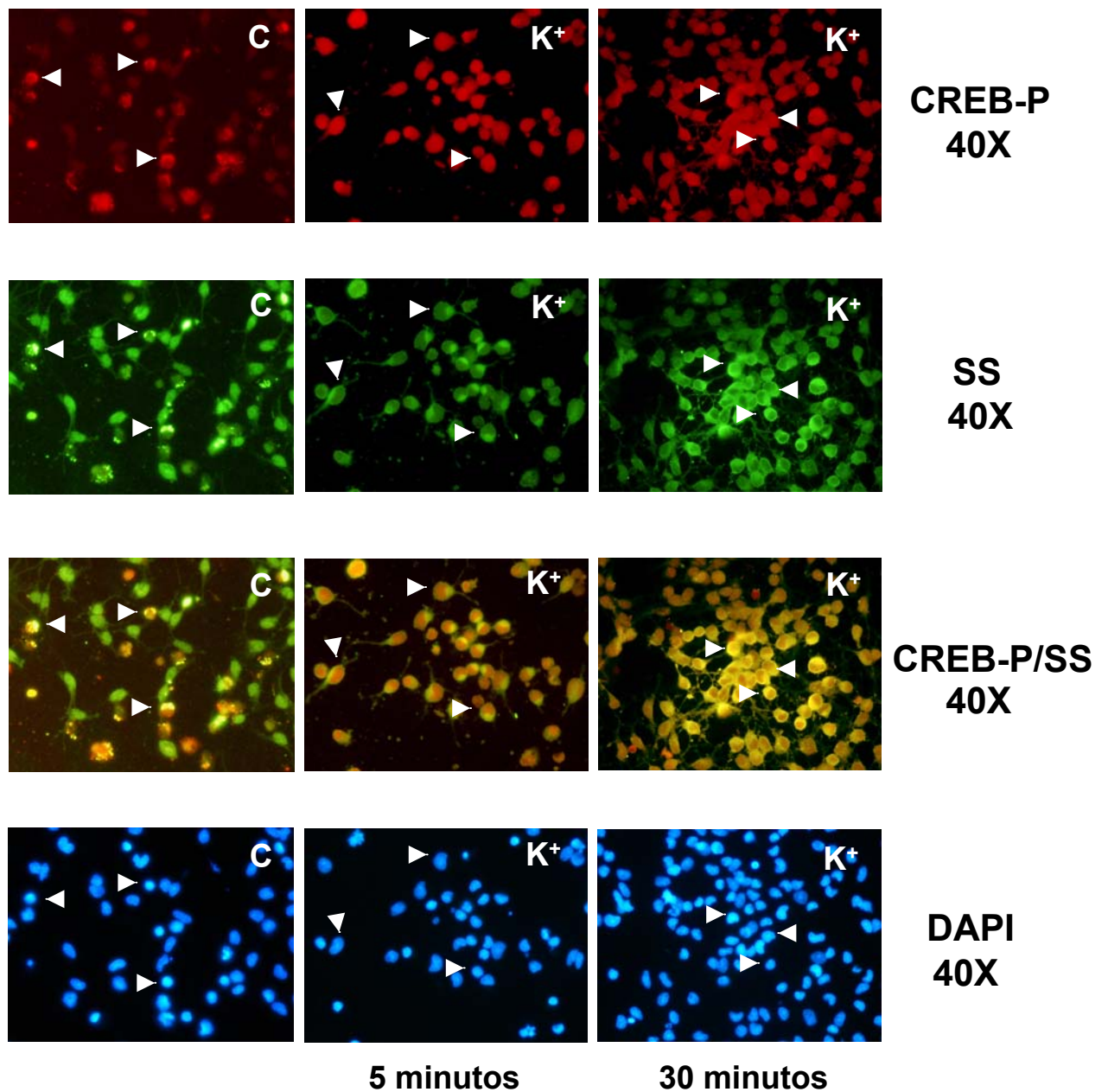


Figura 7. Efecto de K^+ sobre la activación temprana (5 minutos) y tardía (30 minutos) del factor transcripcional CREB en las células somatostatinérgicas. Las células cerebrocorticales se mantuvieron en cultivo durante 10-11 días y fueron tratadas durante 5 y 30 minutos con K^+ (56 mM). La figura muestra una doble inmunofluorescencia de células cerebrocorticales. Se utilizó un anticuerpo anti-CREB-P para la detección de la forma fosforilada (núcleos rojos) y un anticuerpo anti-SS para identificar las células somatostatinérgicas (células teñidas en verde). Las cabezas de flecha señalan núcleos positivos para CREB, citoplasmas positivos para SS y células positivas para CREB y SS (naranja, superposición de rojo y verde). Las fotografías de la parte inferior de la figura corresponden a la tinción de los núcleos con DAPI (azul).

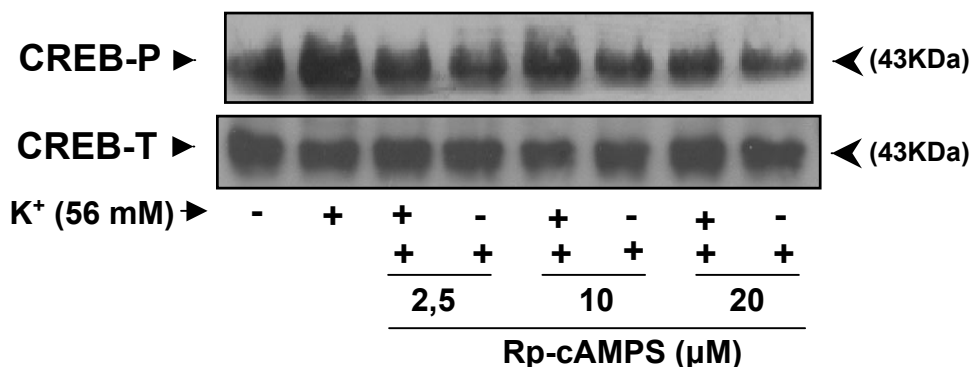
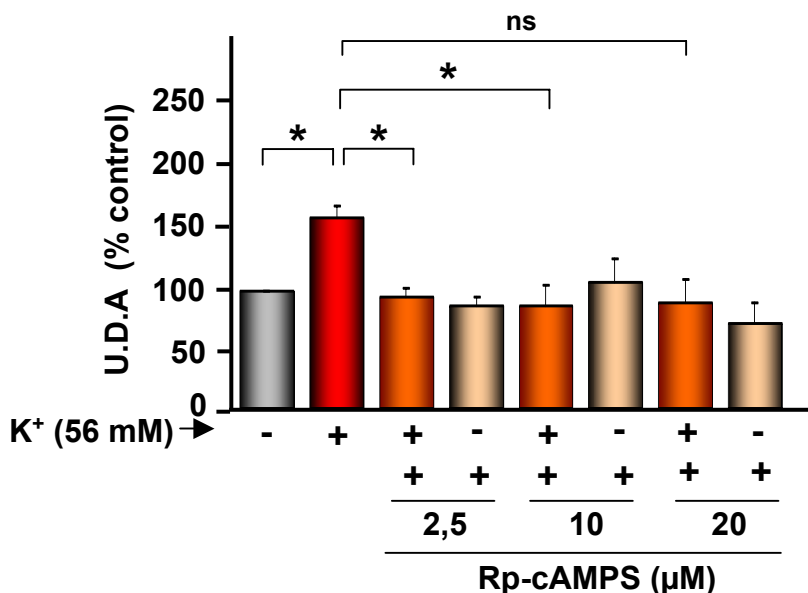
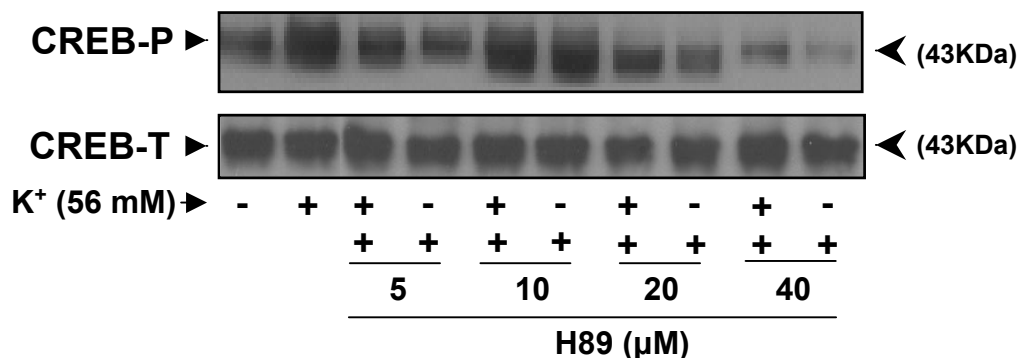
A**B**

Figura 8. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor Rp-cAMPS sobre la activación temprana (5 minutos) de CREB inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (2,5, 10 y 20 μM) y posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

A



B

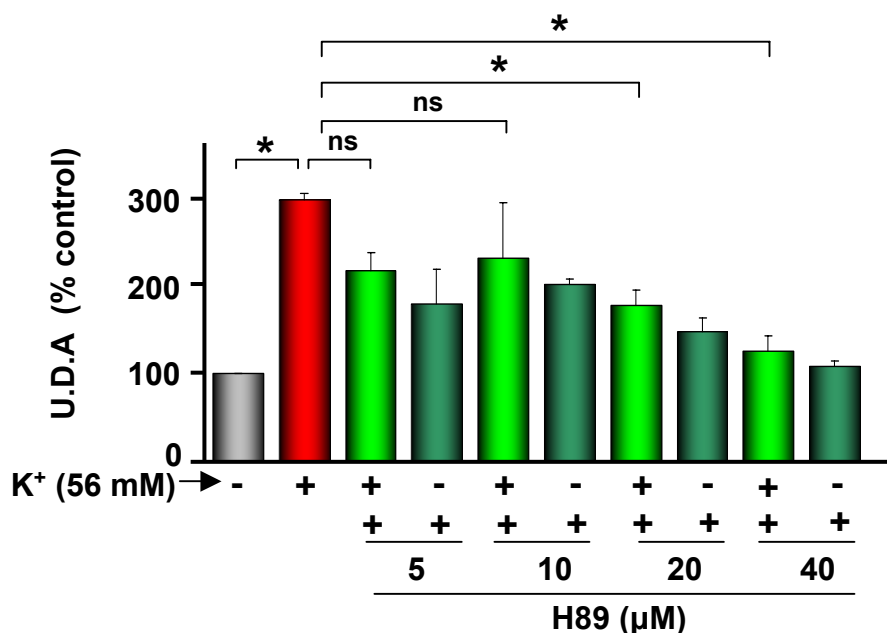


Figura 9. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor H89 sobre la activación temprana (5 minutos) de CREB inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con H89 (5, 10, 20 y 40 μM) y posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

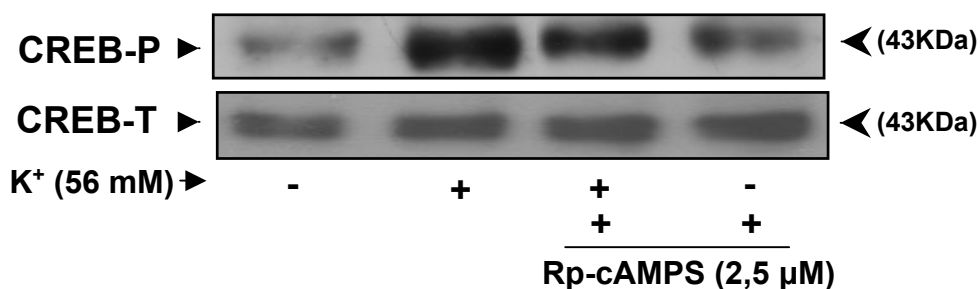
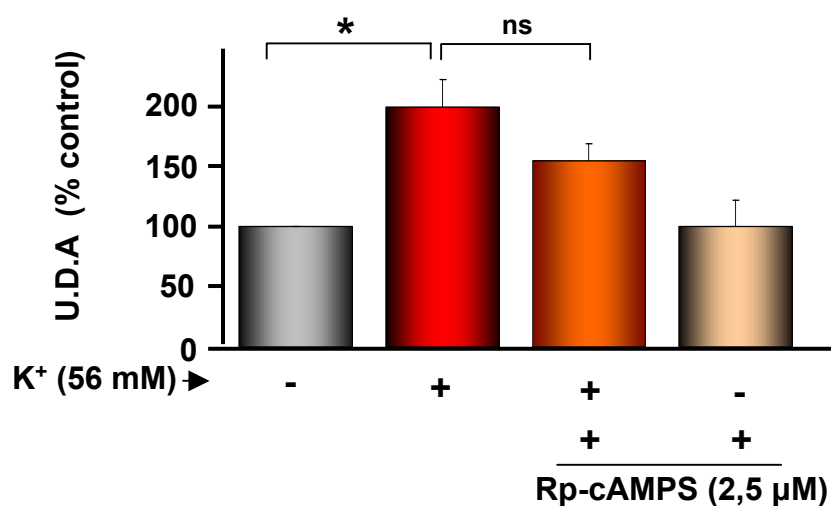
A**B**

Figura 10. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor Rp-cAMPS sobre la activación tardía (30 minutos) de CREB inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (2,5 μM) y posteriormente se trataron durante 30 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p < 0,05, ns, no significativo.

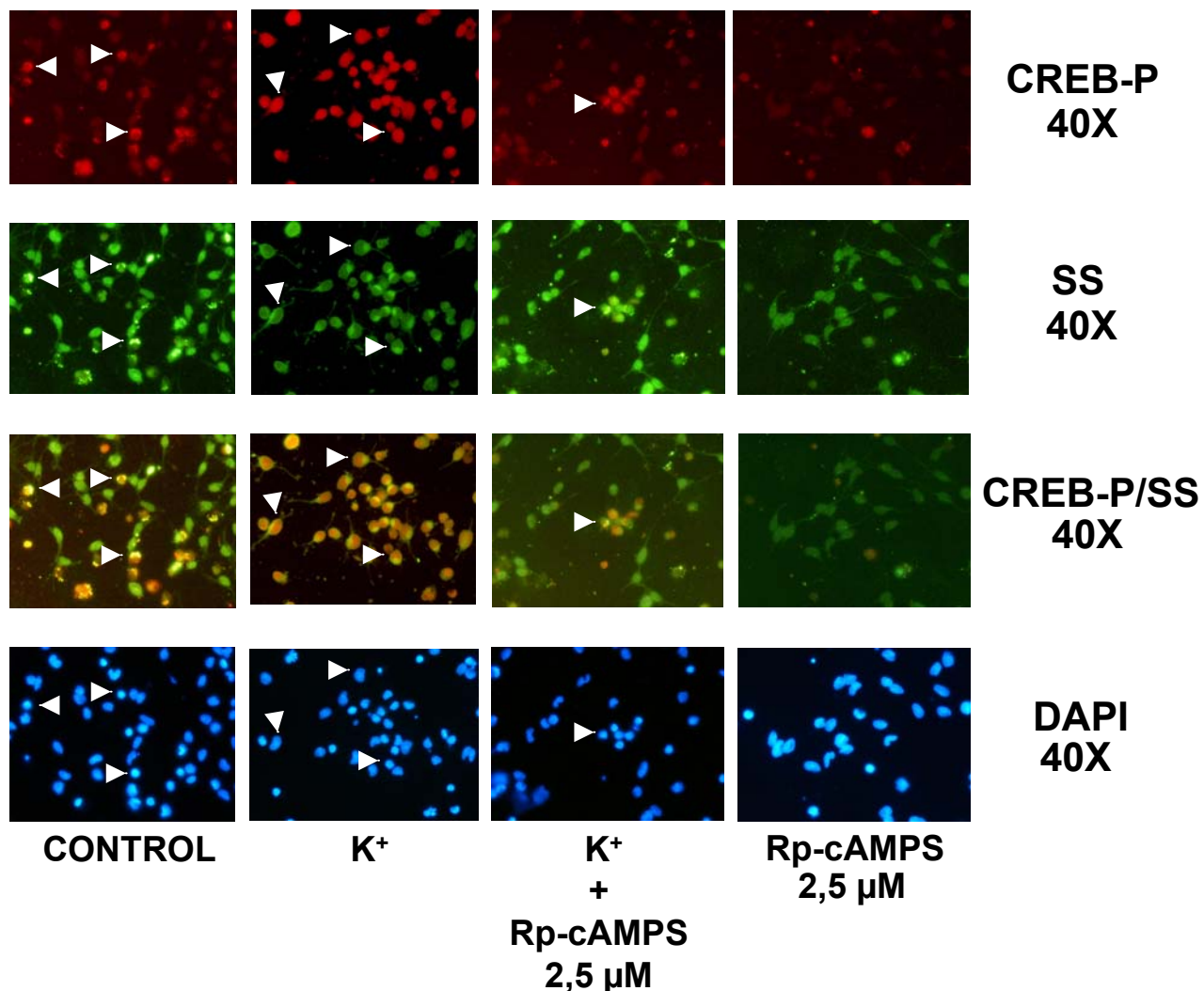
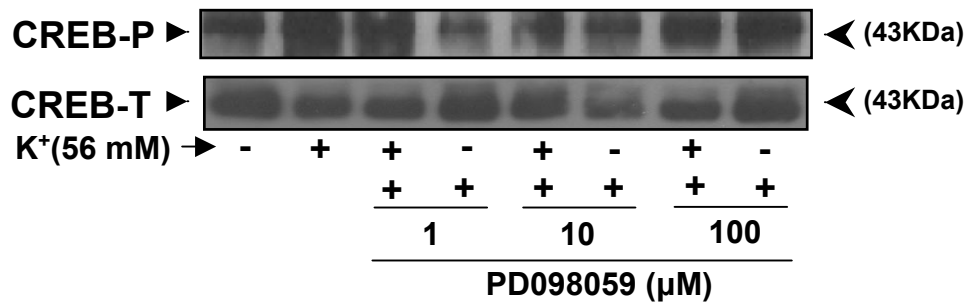


Figura 11. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor Rp-cAMPS sobre la activación temprana (5 minutos) del factor transcripcional CREB en las células somatostatinérgicas. Las células cerebrocorticales se mantuvieron en cultivo durante 10-11 días y fueron tratadas durante 45 minutos con Rp-cAMPS (2,5 μM). Posteriormente se incubaron en presencia de K⁺ (56 mM) durante 5 minutos. La figura muestra una doble inmunofluorescencia de células cerebrocorticales. Se utilizó un anticuerpo anti-CREB-P para la detección de las formas fosforiladas (núcleos rojos) y un anticuerpo anti-SS para identificar las células somatostatinérgicas (células teñidas en verde). Las cabezas de flecha señalan núcleos positivos para CREB, citoplasmas positivos para SS y células positivas para CREB y SS (naranja, superposición de rojo y verde). Las fotografías de la parte inferior de la figura corresponden a la tinción de los núcleos con DAPI (azul).

A



B

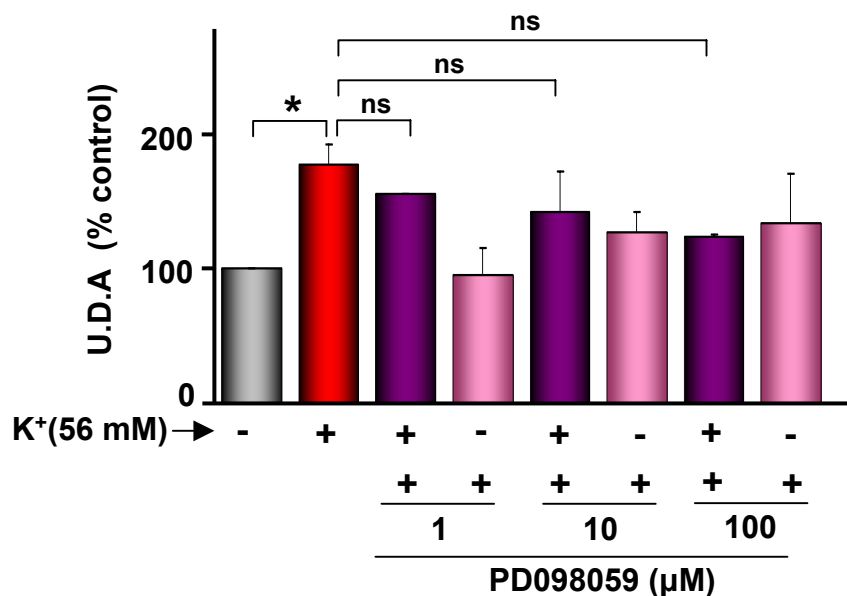


Figura 12. Efecto del bloqueo de la vía MAPK (ERK1/2) con el inhibidor PD098059 sobre la activación temprana (5 minutos) de CREB inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con PD098059 (1, 10 y 100 μ M) y posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

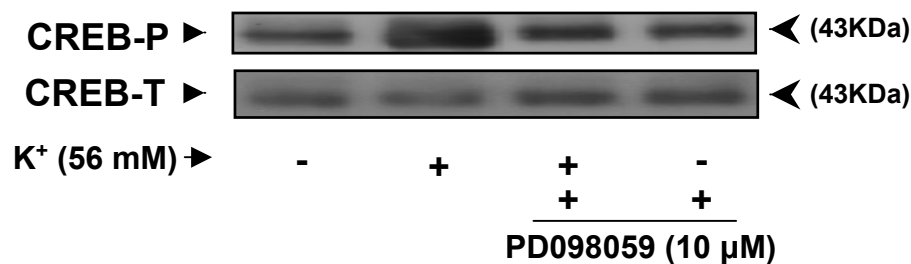
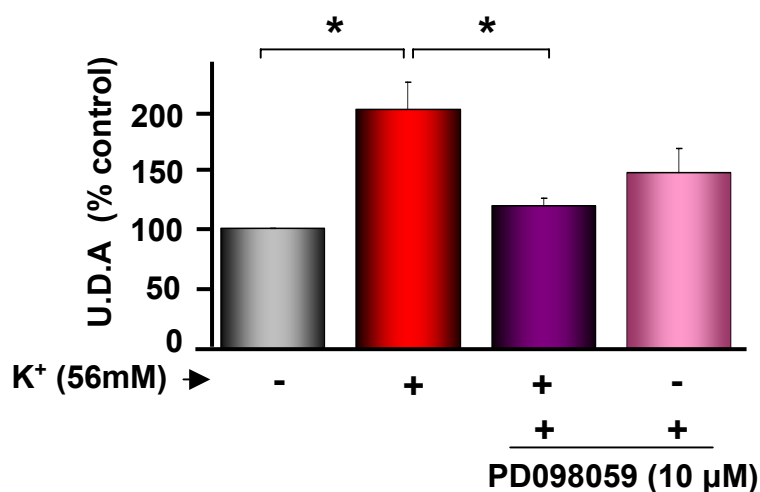
A**B**

Figura 13. Efecto del bloqueo de la vía MAPK (ERK1/2) con el inhibidor PD098059 sobre la activación tardía (30 minutos) de CREB inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con PD098059 (10 μM) y posteriormente se trataron durante 30 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05.

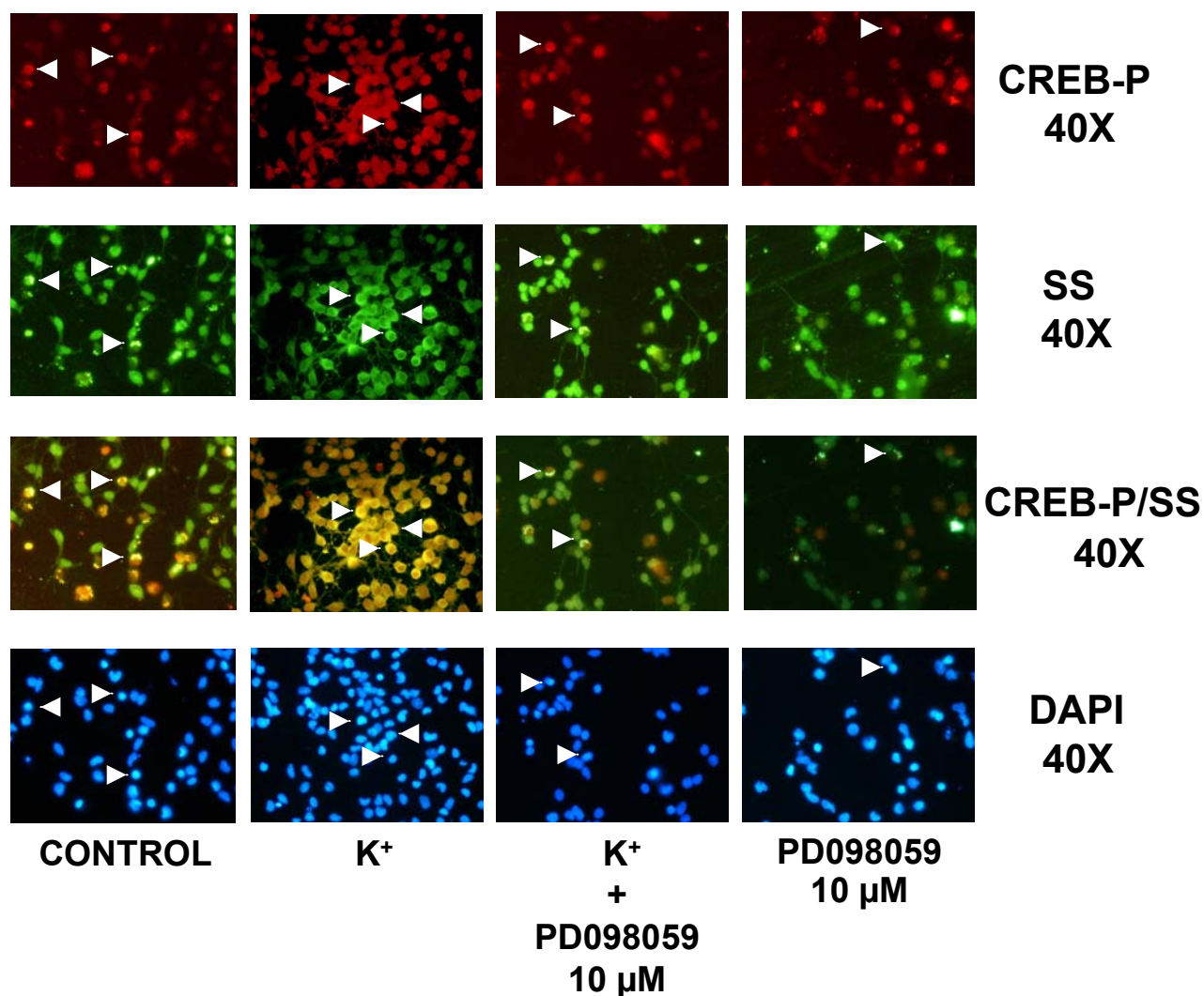


Figura 14. Efecto del bloqueo de la vía MAPK (ERK1/2) con el inhibidor PD098059 sobre la activación tardía (30 minutos) del factor transcripcional CREB en las células somatostatinérgicas. Las células cerebrocorticales se mantuvieron en cultivo durante 10-11 días y se trataron durante 45 minutos con PD098059 (10 μM). Posteriormente se incubaron en presencia de K⁺ (56 mM) durante 30 minutos. El panel muestra una doble inmunofluorescencia de células cerebrocorticales. Se utilizó un anticuerpo anti-CREB-P para la detección de las formas fosforiladas (núcleos rojos) y un anticuerpo anti-SS para identificar las células somatostatinérgicas (células teñidas en verde). Las cabezas de flecha señalan núcleos positivos para CREB, citoplasmas positivos para SS y células positivas para CREB y SS (naranja, superposición de rojo y verde). Las fotografías de la parte inferior de la figura corresponden a la tinción de los núcleos con DAPI (azul).

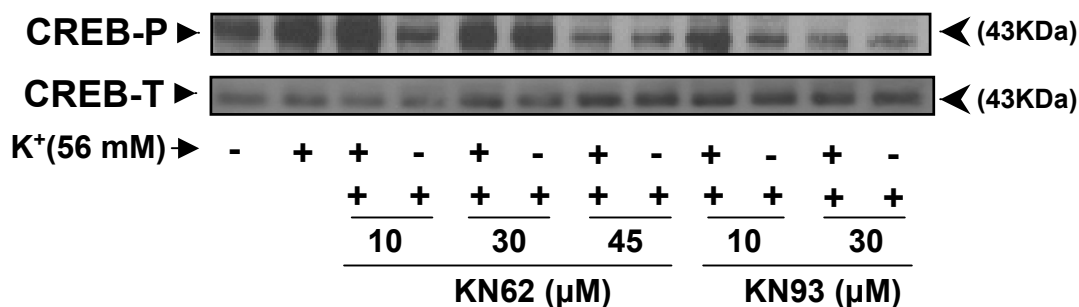
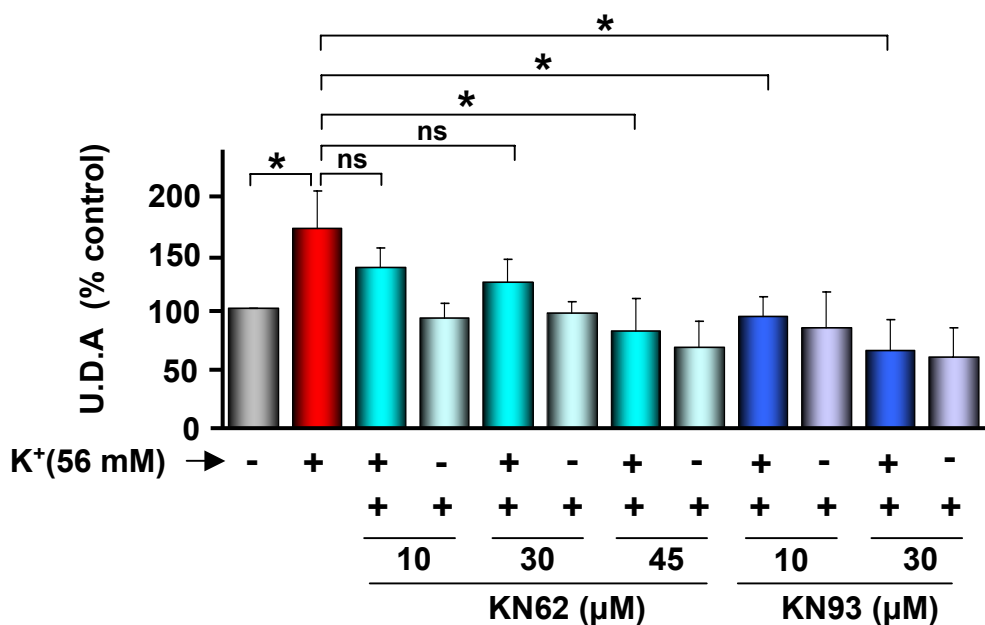
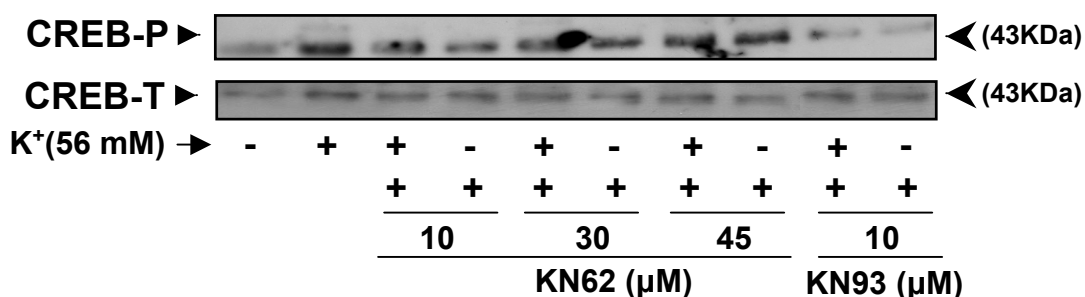
A**B**

Figura 15. Efecto del bloqueo de la vía CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93 sobre la activación temprana (5 minutos) de CREB inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con KN62 (10, 30 y 45 μM) o KN93 (10 y 30 μM), posteriormente se trataron durante 5 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

A



B

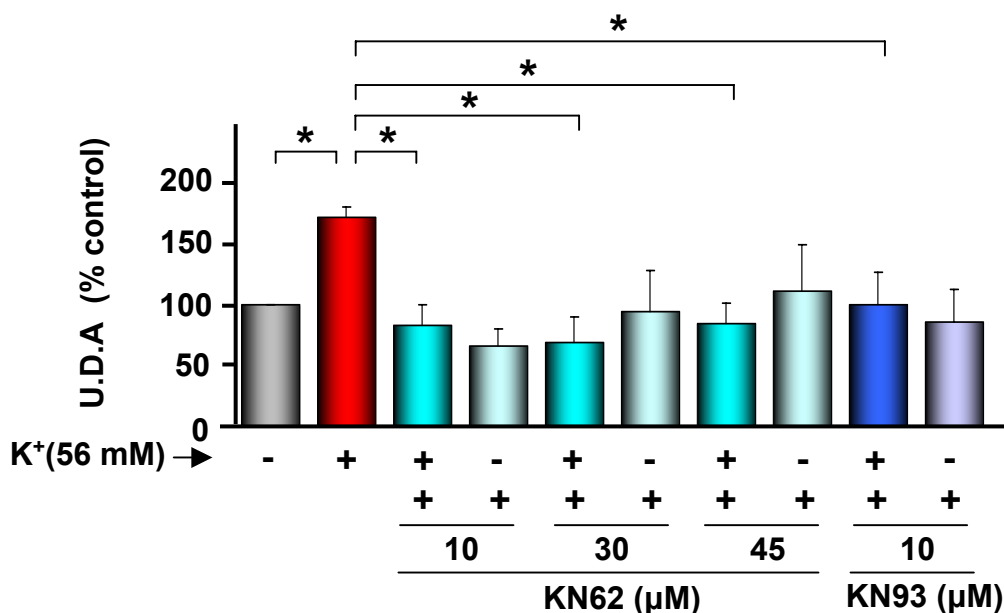


Figura 16. Efecto del bloqueo de la vía CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93 sobre la activación tardía (30 minutos) de CREB inducida por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con KN62 (10, 30 y 45 μM) ó KN93 [10 y 30 μM], posteriormente se trataron durante 30 minutos con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05.

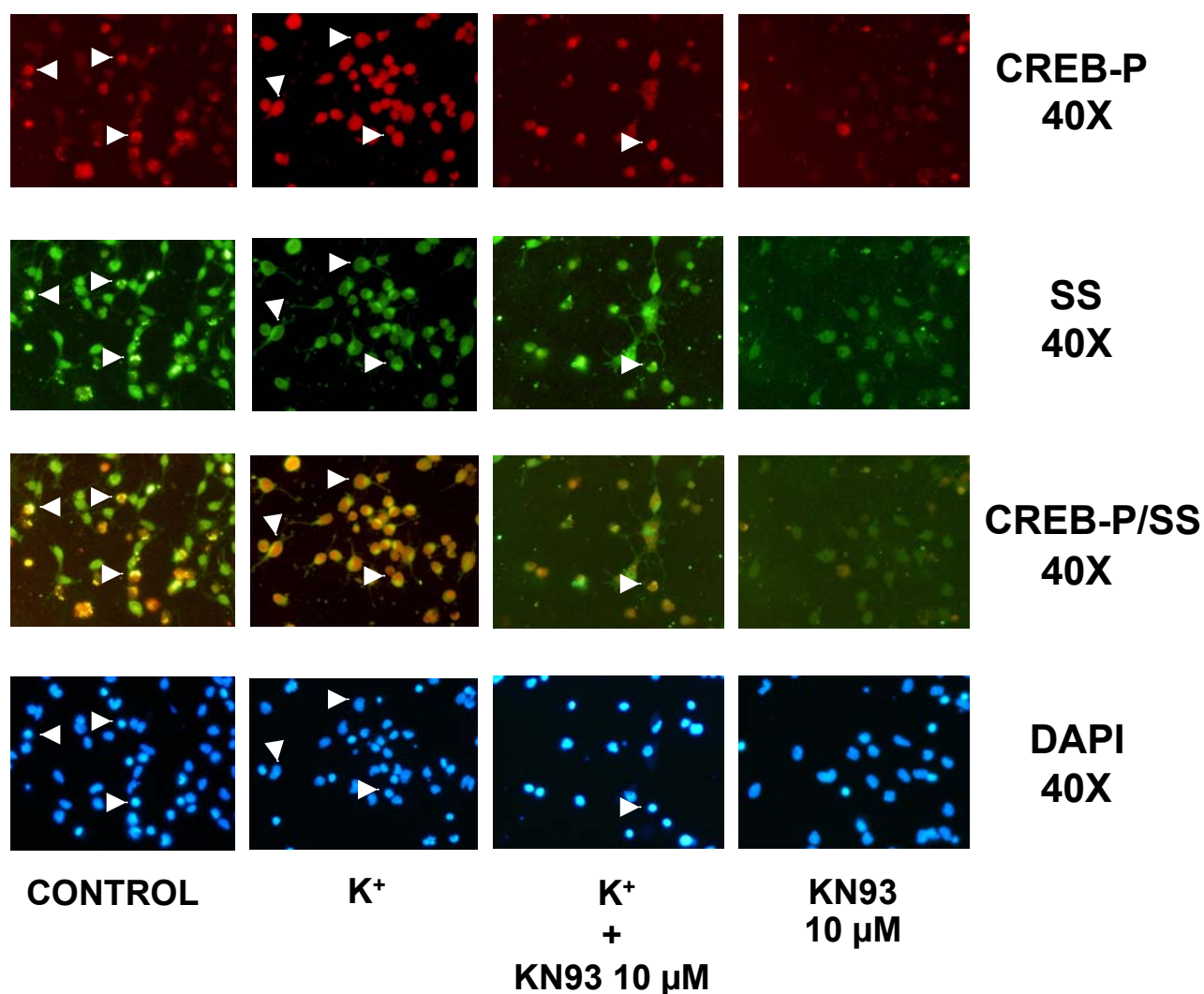


Figura 17. Efecto del bloqueo de la vía CaMKs con el inhibidor KN93 sobre la activación temprana (5 minutos) del factor transcripcional CREB en las células somatostatinérgicas. Las células cerebrocorticales se mantuvieron en cultivo durante 10-11 días y fueron tratadas durante 45 minutos con KN93 (10 μM). Posteriormente se incubaron en presencia de K⁺ (56 mM) durante 5 minutos. La figura muestra una doble inmunofluorescencia de células cerebrocorticales. Se utilizó un anticuerpo anti-CREB-P para la detección de las formas fosforiladas (núcleos rojos) y un anticuerpo anti-SS para identificar las células somatostatinérgicas (células teñidas en verde). Las cabezas de flecha señalan núcleos positivos para CREB, citoplasmas positivos para SS y células positivas para CREB y SS (naranja, superposición de rojo y verde). Las fotografías de la parte inferior de la figura corresponden a la tinción de los núcleos con DAPI (azul).

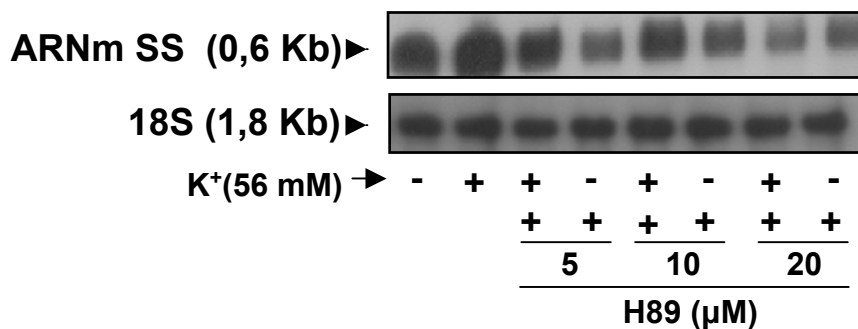
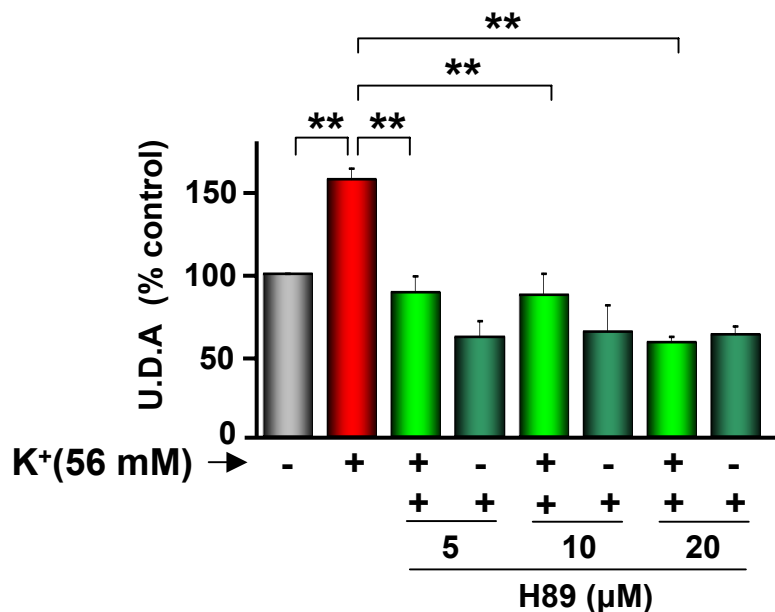
A**B**

Figura 19. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor H89 sobre la inducción del ARNm de SS por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con H89 (5, 10 y 20 μM) y posteriormente se trataron durante 24 horas con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Northern blot, donde se empleó una ribosonda de SS marcada con d-UTP-P^{32α}. Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de una sonda de ARNr 18S marcada con d-CTP-P^{32α}.

B: Cuantificación densitométrica del ARNm de SS, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), **, p<0,01.

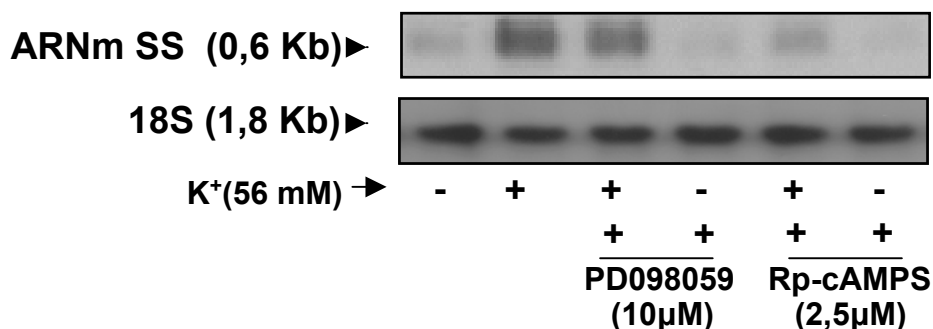
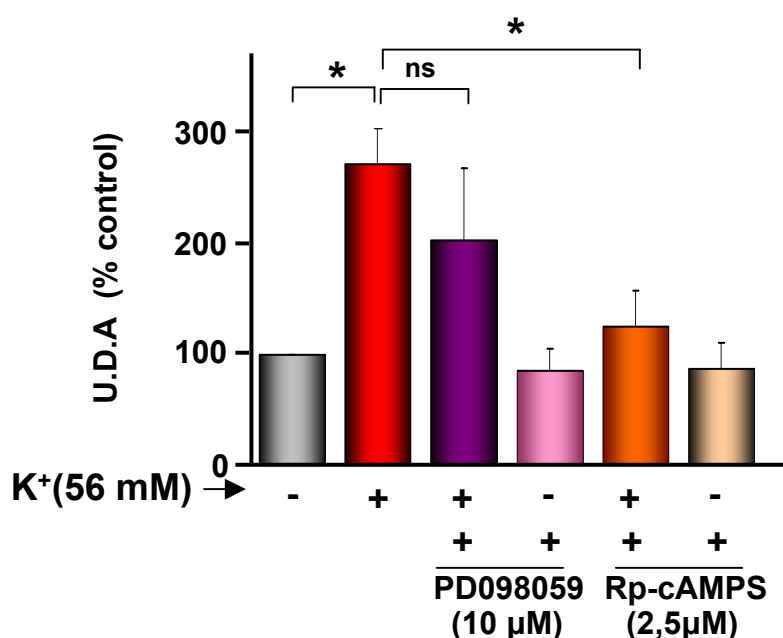
A**B**

Figura 20. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, con el inhibidor Rp-cAMPS, y MAPK (ERK1/2), con el inhibidor PD098059, sobre la inducción del ARNm de SS por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con PD098059 (10 μM) o Rp-cAMPS (2,5 μM) y posteriormente se trataron durante 24 horas con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Northern blot, donde se empleó una ribosonda de SS marcada con d-UTP-P^{32α}. Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de una sonda de ARNr 18S marcada con d-CTP-P^{32α}.

B: Cuantificación densitométrica del ARNm de SS, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p < 0,05, ns, no significativo.

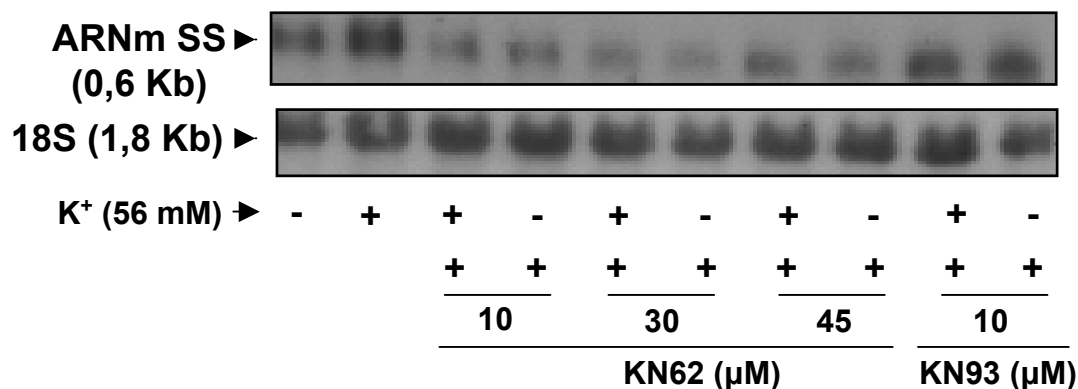
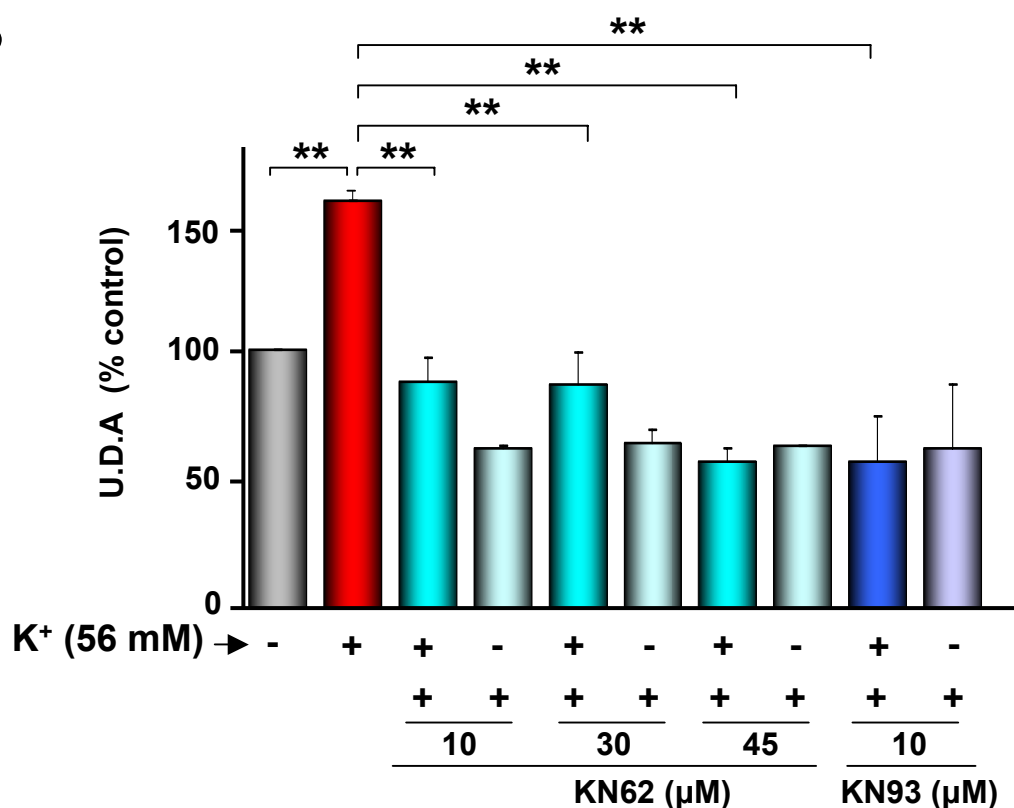
A**B**

Figura 21. Efecto del bloqueo de las vías CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93 sobre la inducción del ARNm de SS por K⁺. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con KN62 (10, 30 y 45 μM) o KN93 (10 μM) y posteriormente se trataron durante 24 horas con K⁺ (56 mM).

A: Autorradiografía representativa de un Northern blot, donde se empleó una ribosonda de SS marcada con d-UTP-P^{32α}. Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de una sonda de ARNr 18S marcada con d-CTP-P^{32α}.

B: Cuantificación densitométrica del ARNm de SS, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), **, p<0,01.

A

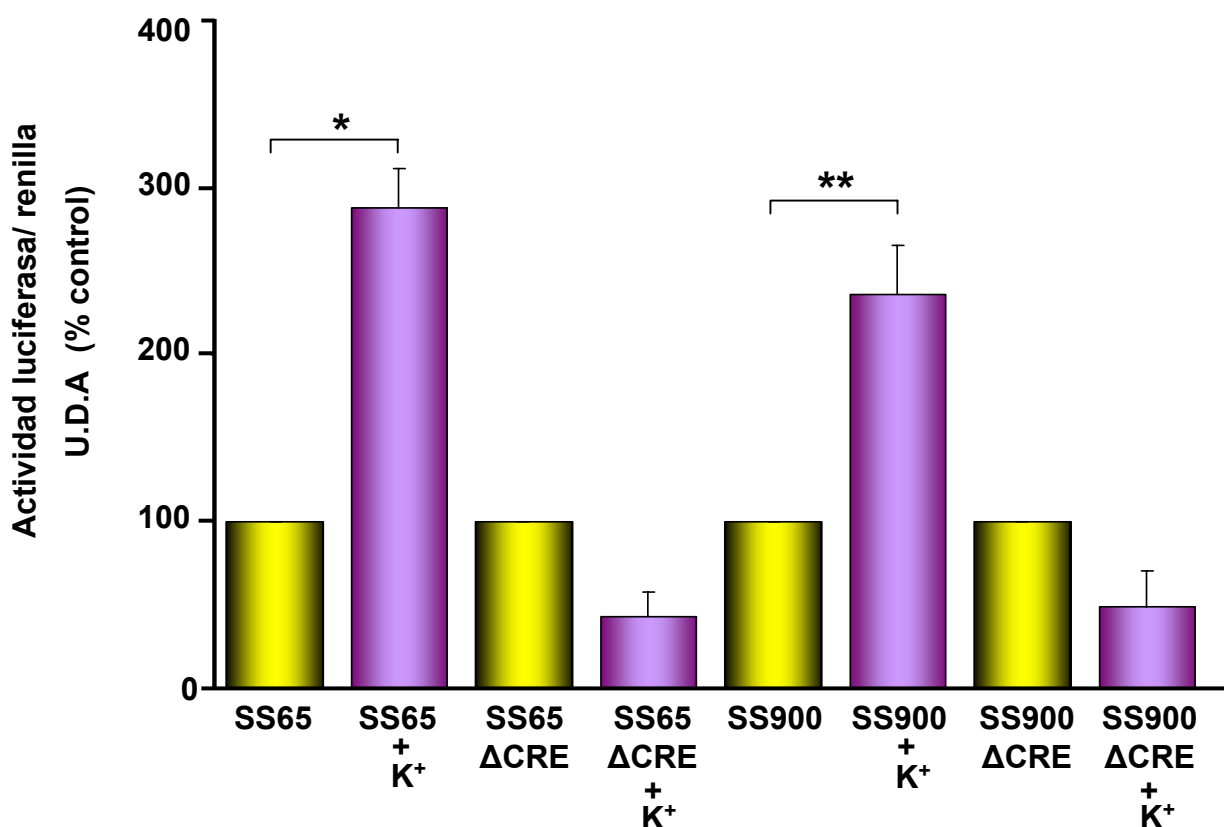


Figura 23. Efecto del K⁺ sobre la expresión del gen de luciferasa unido a las diferentes construcciones del promotor del gen de SS. Las células cerebrocorticales, previamente incubadas durante 24 horas en medio DMEM-N1 sin FGFb, se transfectaron con las diferentes construcciones del promotor de SS unido al gen de luciferasa [SS65, SS65ΔCRE, SS900 y SS900ΔCRE]. Posteriormente, las células se incubaron en presencia o no de K⁺ (56 mM) durante 24 horas. Como control de transfección un grupo de células se transfectó con el promotor pRSV-Luc (datos no mostrados). Los resultados representan el porcentaje de la actividad luciferasa/actividad renilla con respecto a sus respectivos grupos controles (no tratados con K⁺). Los valores representan la media densitométrica de 6 experimentos ± E.S. (n=6), *, p<0,05, **, p<0,01.

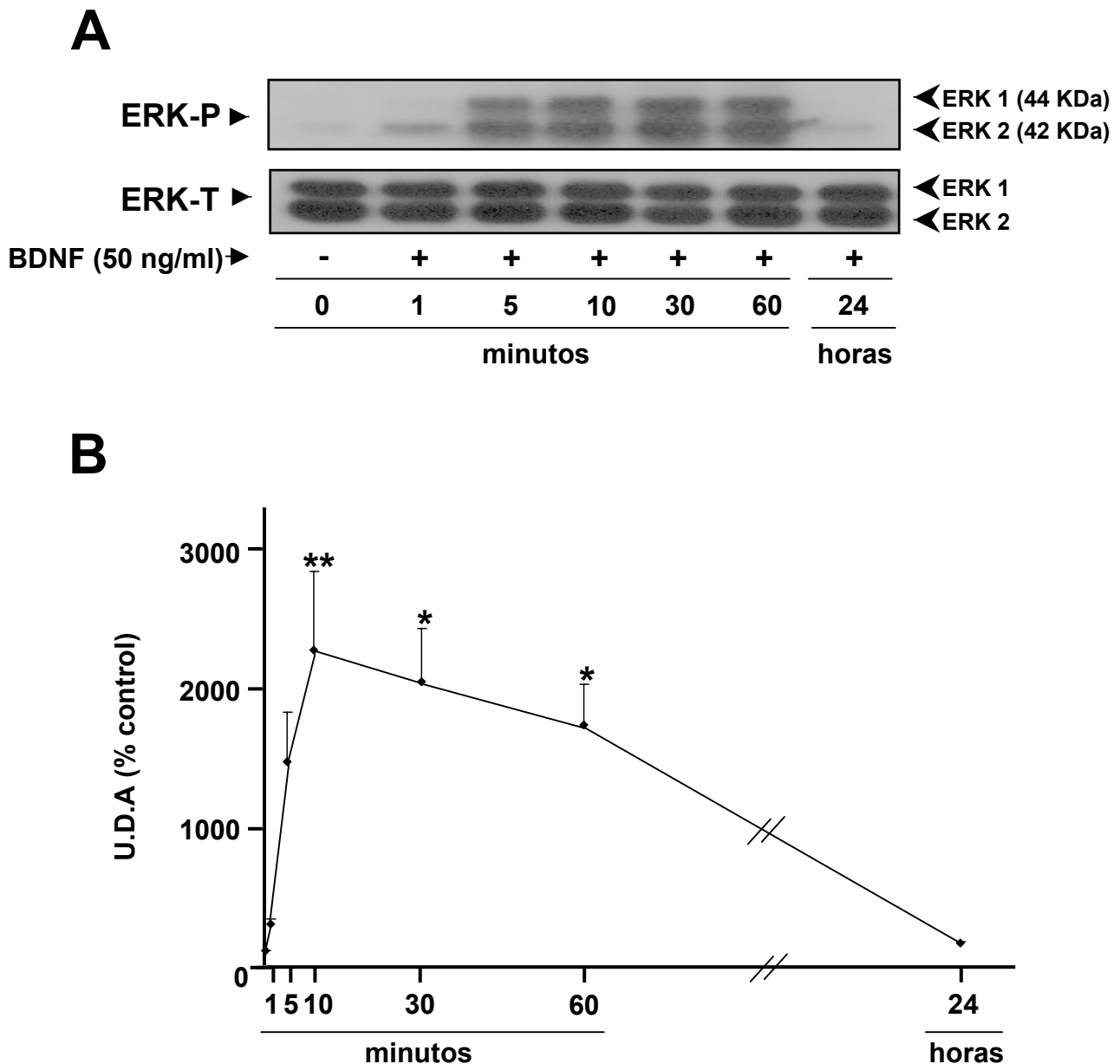


Figura 24. Curva tiempo-respuesta de la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por BDNF. Células cerebrocorticales fueron mantenidas en cultivo durante 3-4 días y posteriormente, tratadas durante 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 24 horas con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

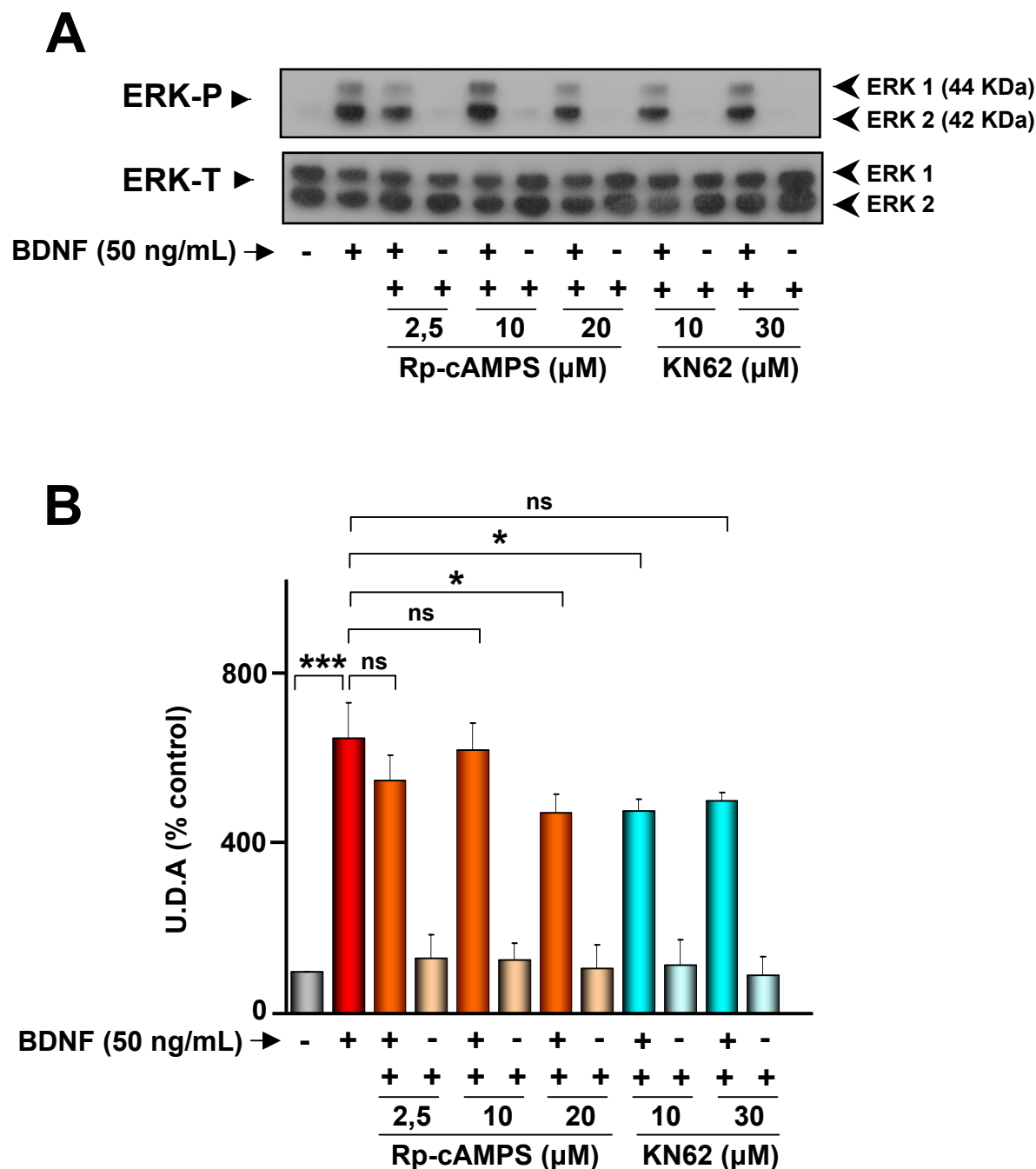


Figura 26. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, con el inhibidor Rp-cAMPS, y CaMKs, con el inhibidor KN62, sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (2,5, 10 y 20 μ M) o KN62 (10 y 30 μ M) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$, ns, no significativo.

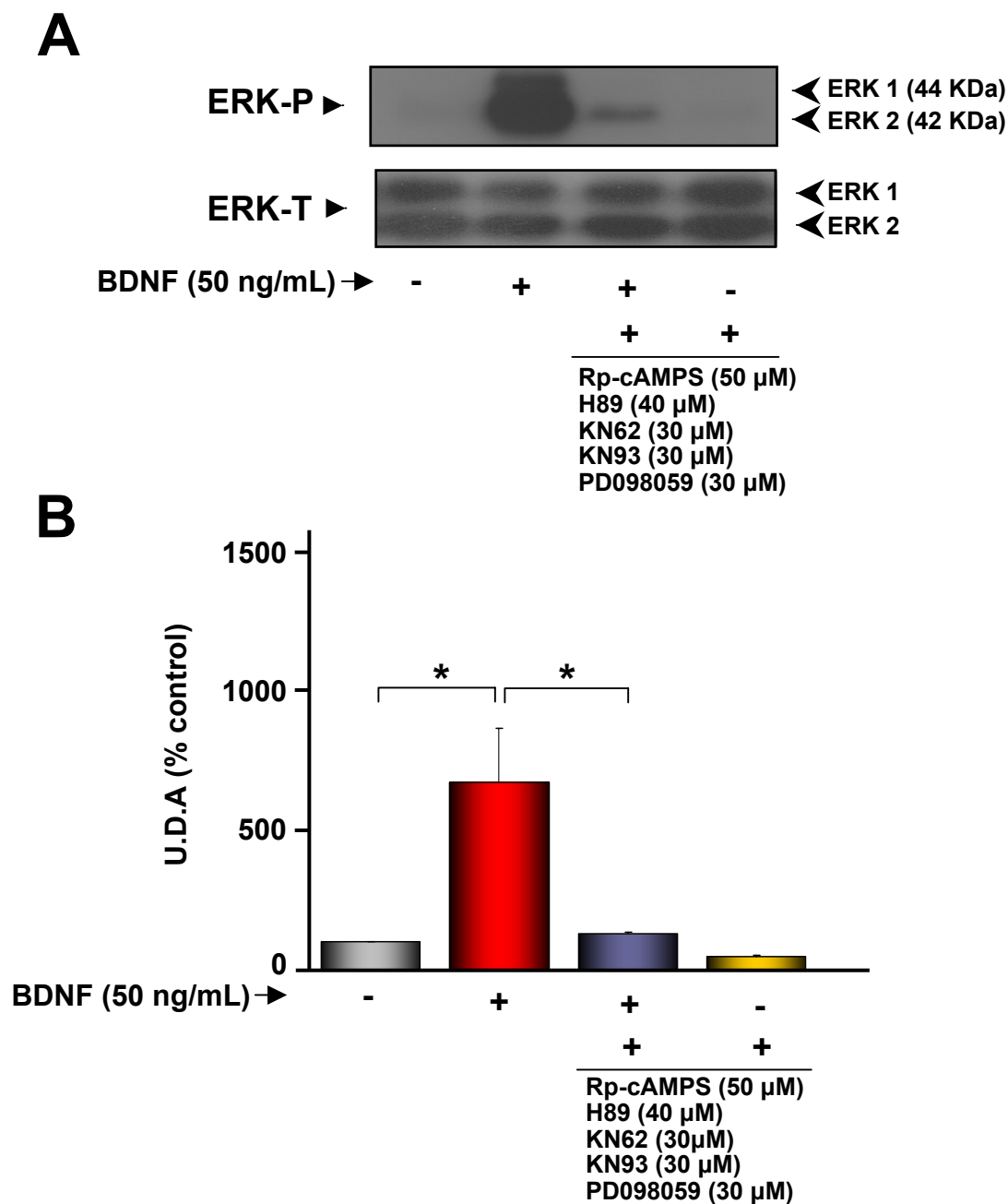


Figura 27. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, con los inhibidores Rp-cAMPS y H89, CaMKs, con los inhibidores KN62 y KN93, y MAPK (ERK 1/2), con el inhibidor PD098059, sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (50 μM), H89 (40 μM), KN62 (30 μM), KN93 (30 μM), PD098059 (30 μM) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=2), *, p<0,05.

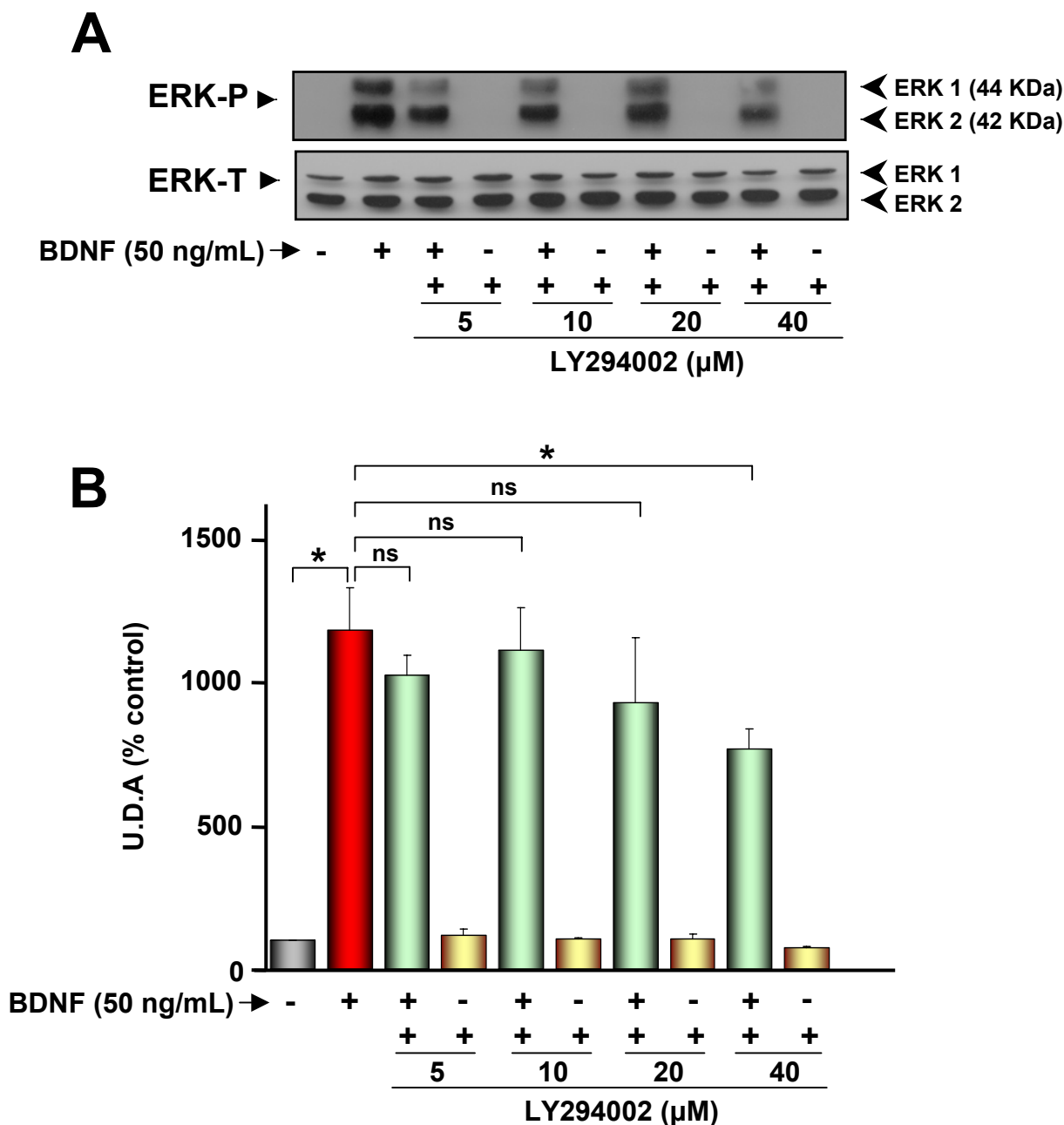


Figura 28. Efecto del bloqueo de la vía PI3K/Akt con el inhibidor LY294002 sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con LY294002 (5, 10, 20 y 40 μM) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=2), *, p<0,05, ns, no significativo.

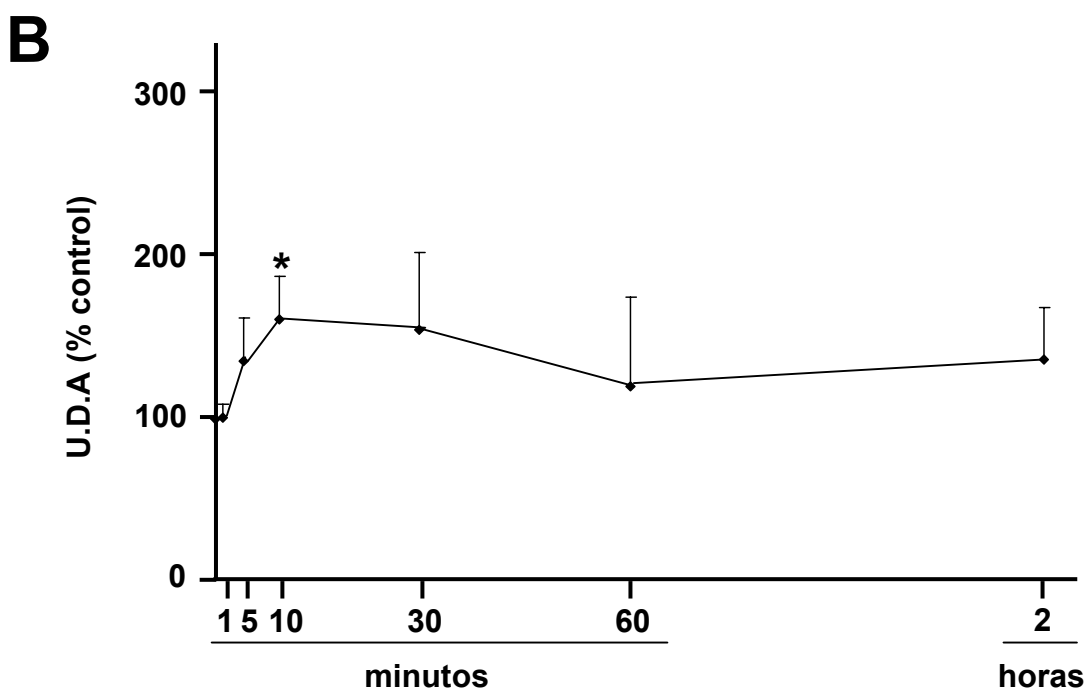
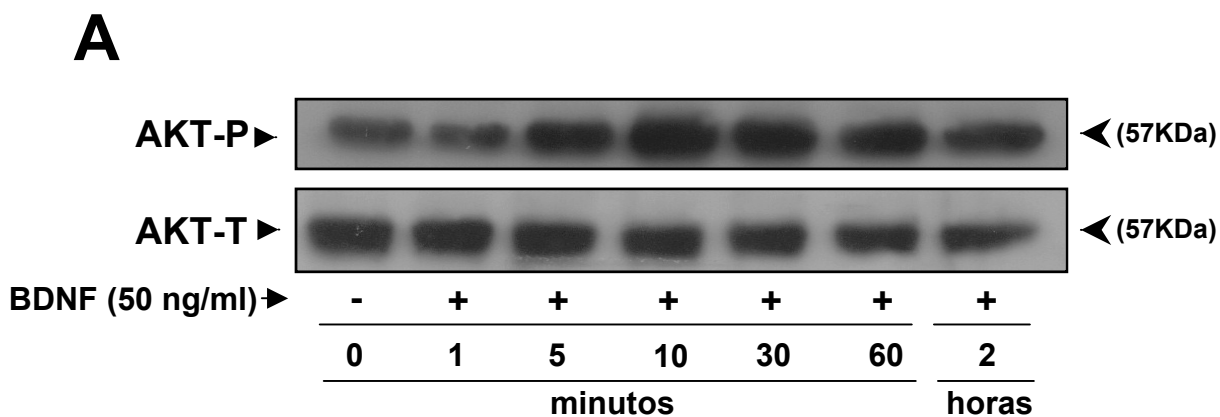


Figura 29. Curva tiempo-respuesta de la activación de la vía PI3K/Akt por BDNF. Células cerebrocorticales fueron mantenidas en cultivo durante 3-4 días y posteriormente, tratadas durante 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 2 horas con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de Akt (Ser⁴⁷³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-Akt que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de Akt, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, $p < 0,05$.

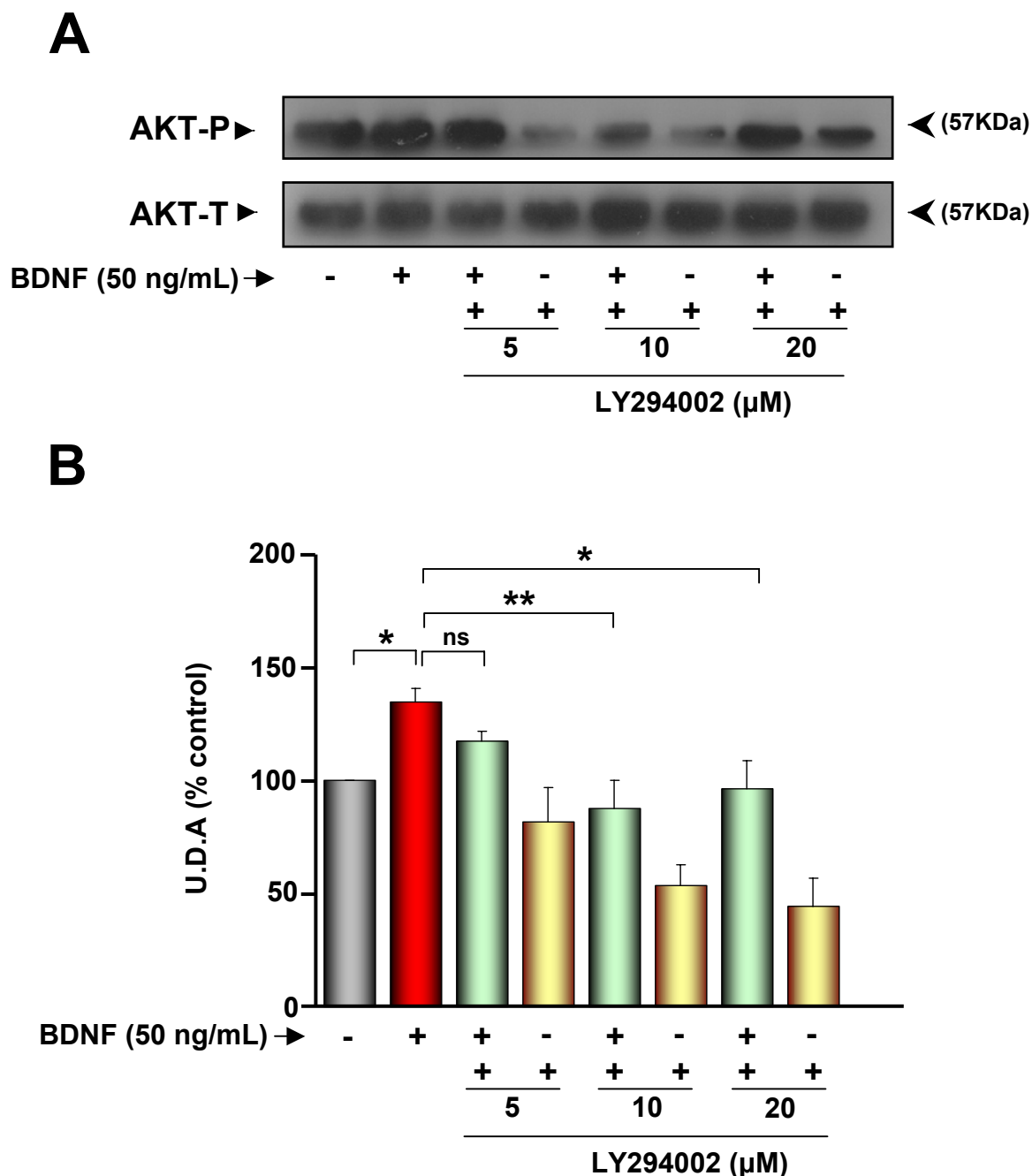


Figura 30. Efecto del bloqueo de la vía PI3K/Akt con el inhibidor LY294002 sobre la activación de PI3K/Akt por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con LY294002 (5, 10 y 20 μM) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de Akt (Ser⁴⁷³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-Akt que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de Akt, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de cuatro experimentos ± E.S. (n=4), *, p<0,05, **, p<0,01, ns, no significativo.

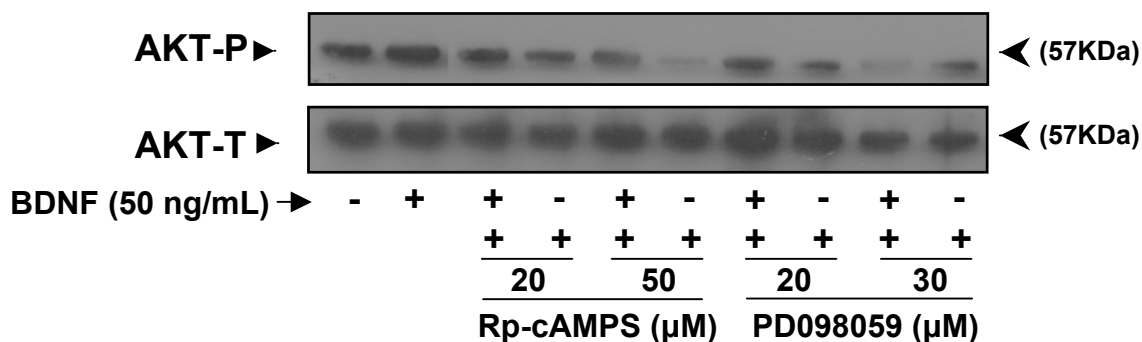
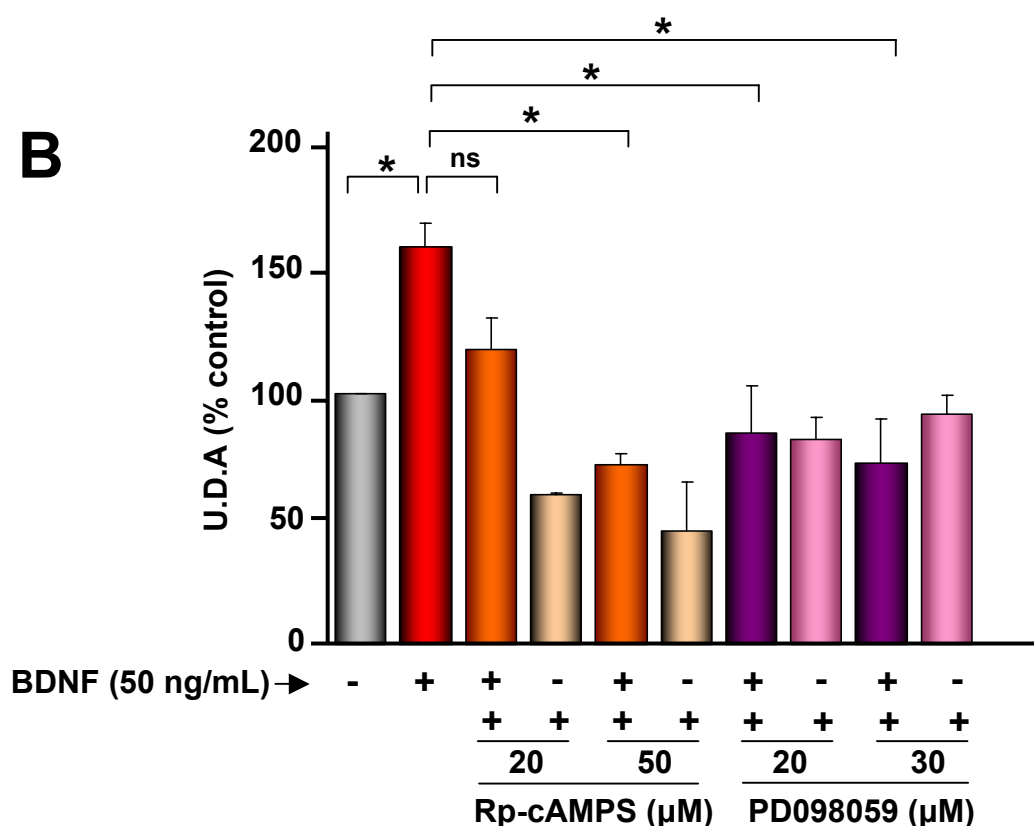
A**B**

Figura 31. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, con el inhibidor Rp-cAMPS, y MAPK (ERK 1/2), con el inhibidor PD098059, sobre la activación de PI3K/Akt por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (20 y 50 μ M) o PD098059 (10 y 30 μ M) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de Akt (Ser⁴⁷³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-Akt que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de Akt, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, p < 0,05, ns, no significativo.

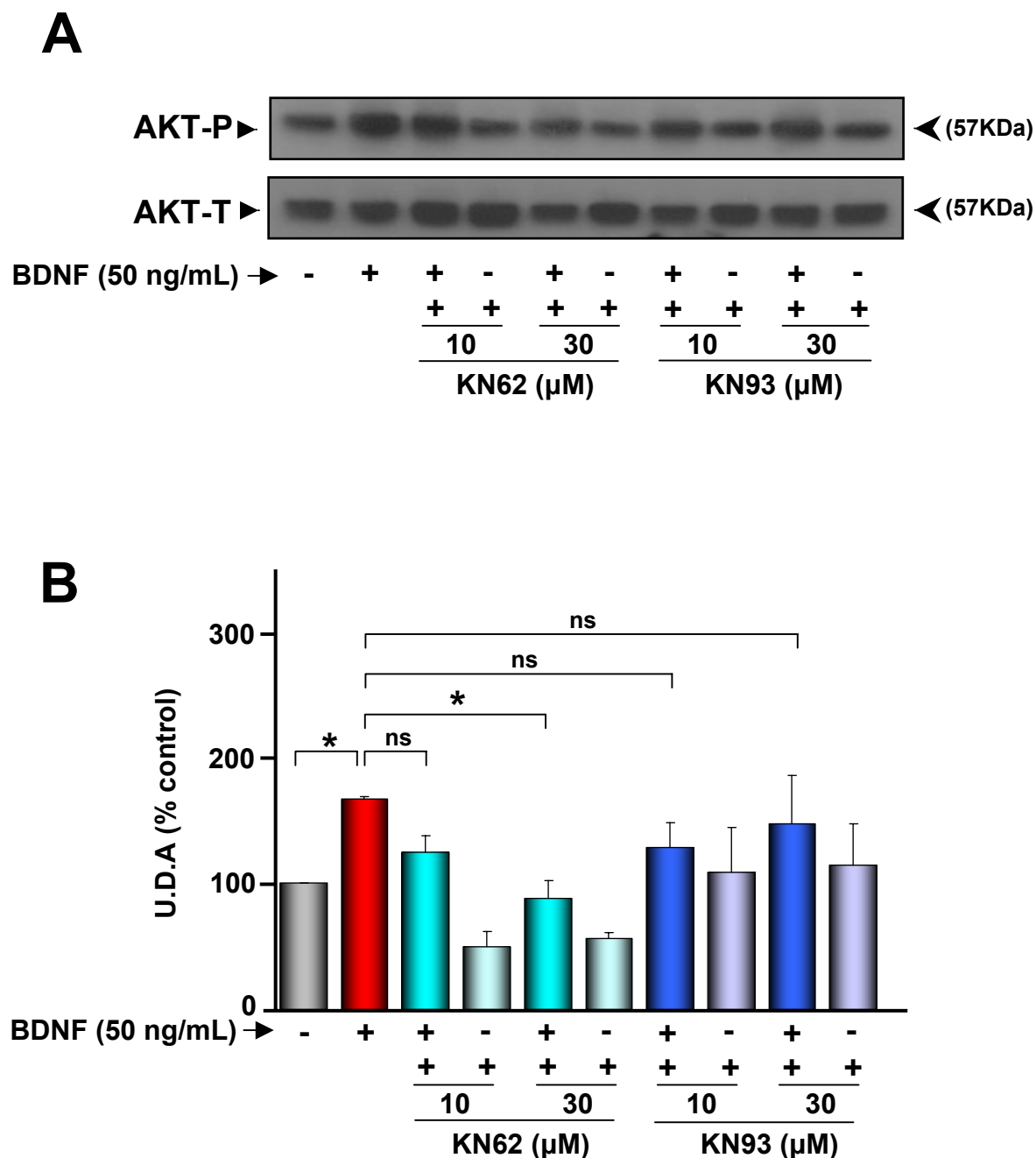


Figura 32. Efecto del bloqueo de la vía CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93 sobre la activación de PI3K/Akt por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con KN62 (10 y 30 μM) o KN93 (10 y 30 μM) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de Akt (Ser⁴⁷³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-Akt que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada de esta quinasa.

B: Cuantificación densitométrica de Akt, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

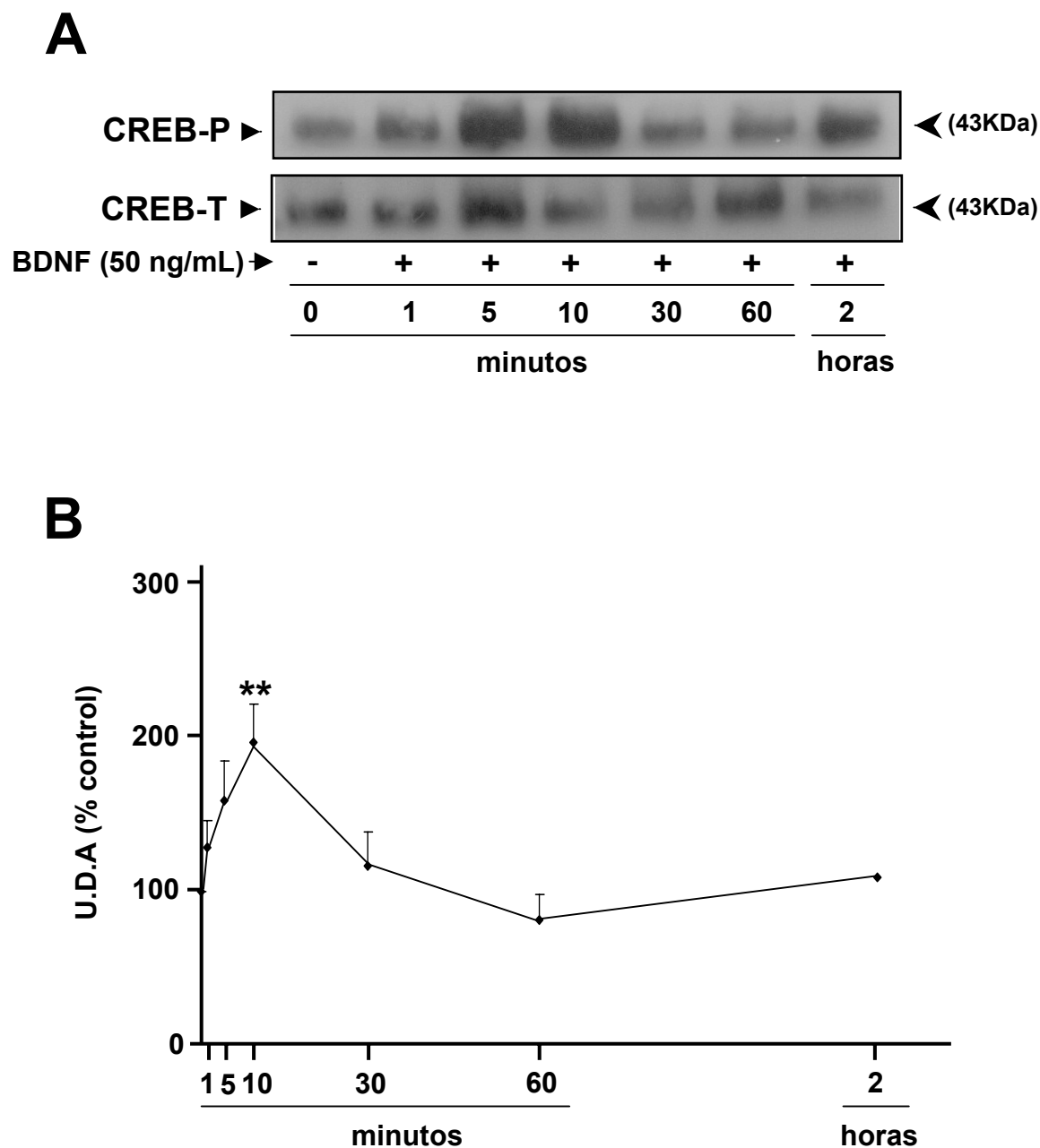


Figura 33. Curva tiempo-respuesta de la activación de CREB por BDNF. Células cerebrocorticales se mantuvieron en cultivo durante 3-4 días y posteriormente, fueron tratadas durante 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 2 horas con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), **, p<0,01.

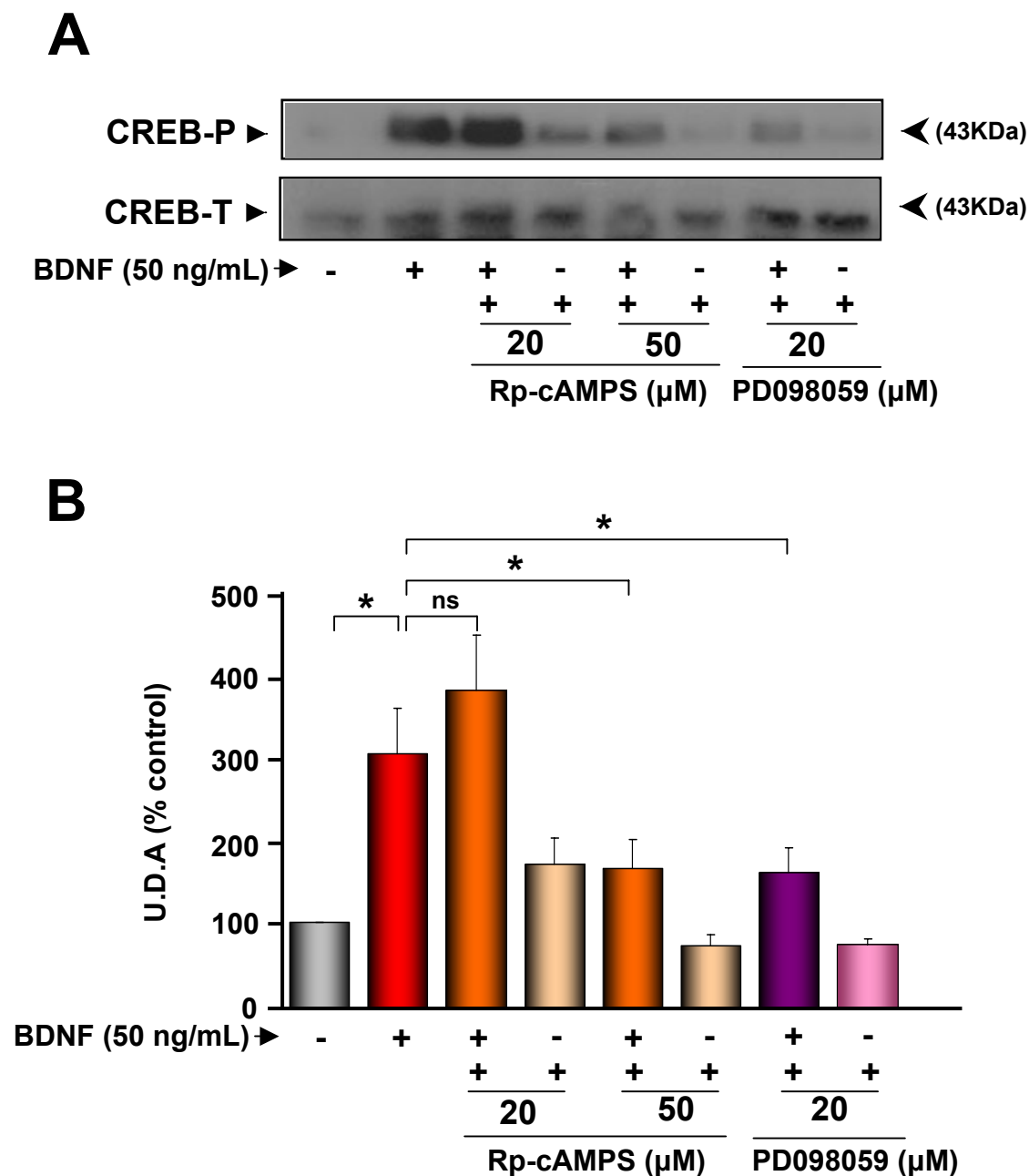


Figura 34. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, con el inhibidor Rp-cAMPS, y MAPK (ERK1/2), con el inhibidor PD098059, sobre la activación de CREB inducida por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (20 y 50 μM) o PD098059 (20 μM) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ns, no significativo.

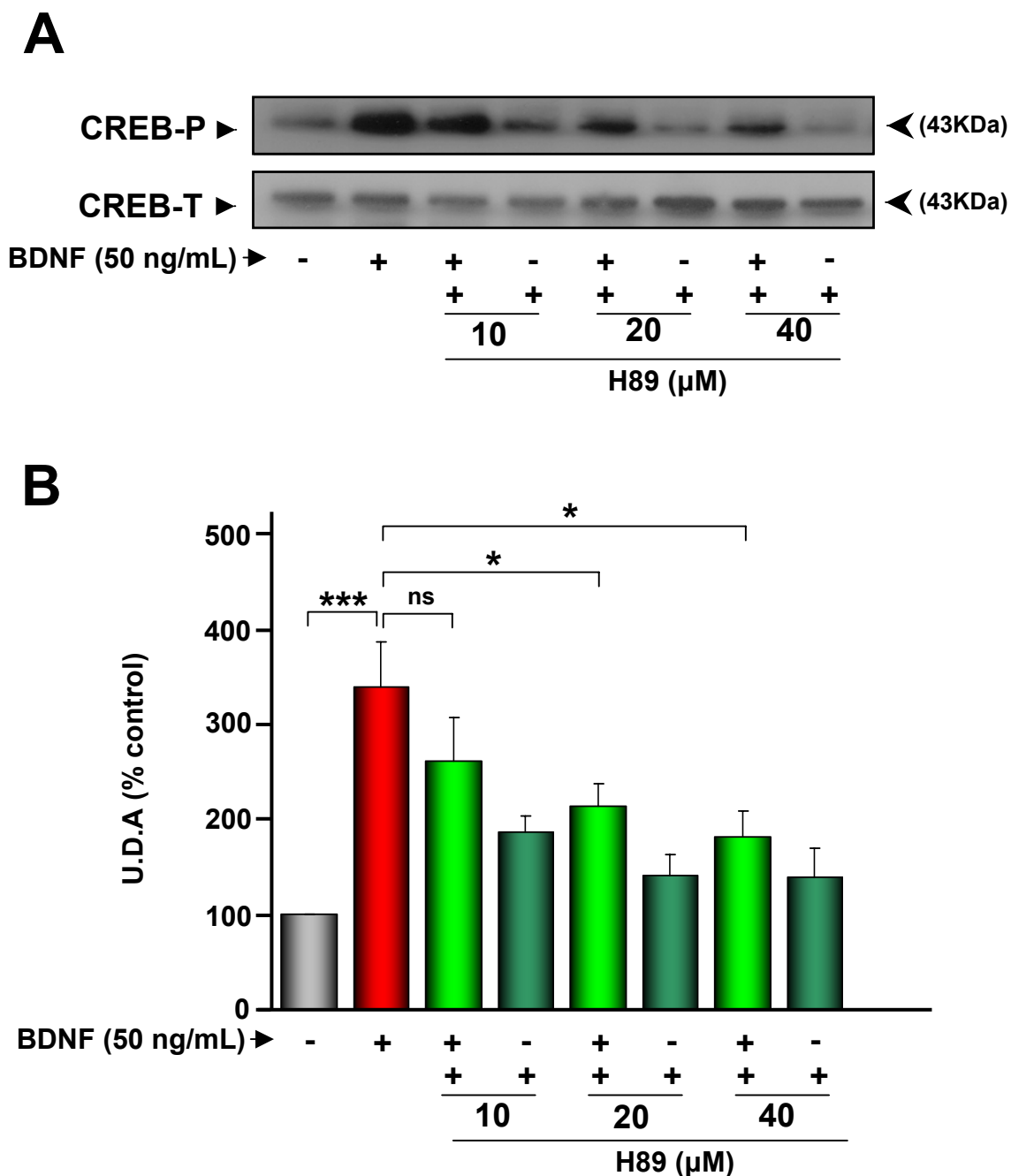


Figura 35. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor H89 sobre la activación de CREB inducida por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con H89 (10, 20 y 30 μM) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), *, p<0,05, ***, p<0,001, ns, no significativo.

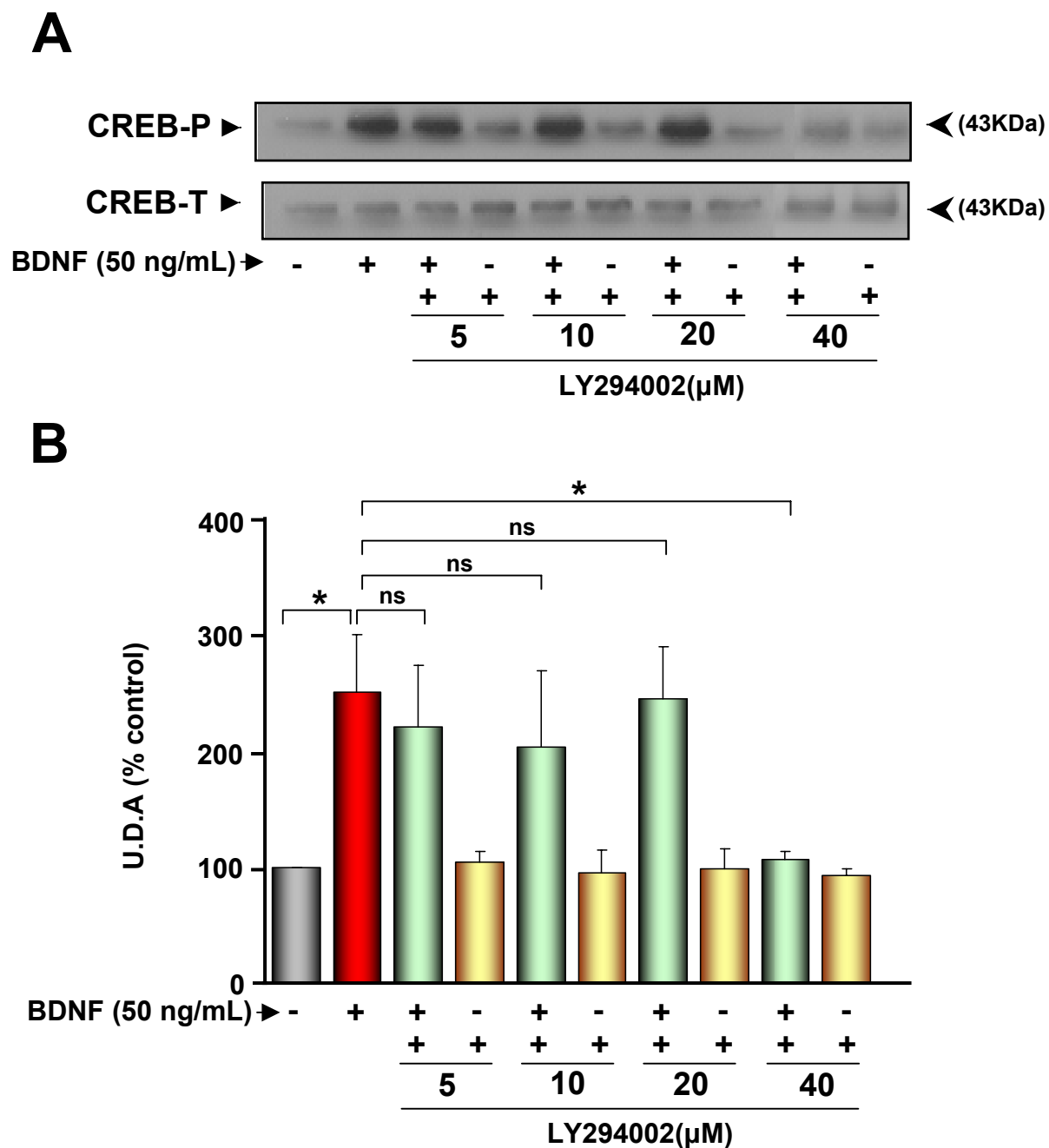


Figura 37. Efecto del bloqueo de la vía PI3K/Akt con el inhibidor LY294002 sobre la activación de CREB inducida por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con LY294002 (5, 10, 20 y 40 μ M) y posteriormente se trataron durante 10 minutos con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal anti-CREB que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada.

B: Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, $p < 0,05$, ns, no significativo.

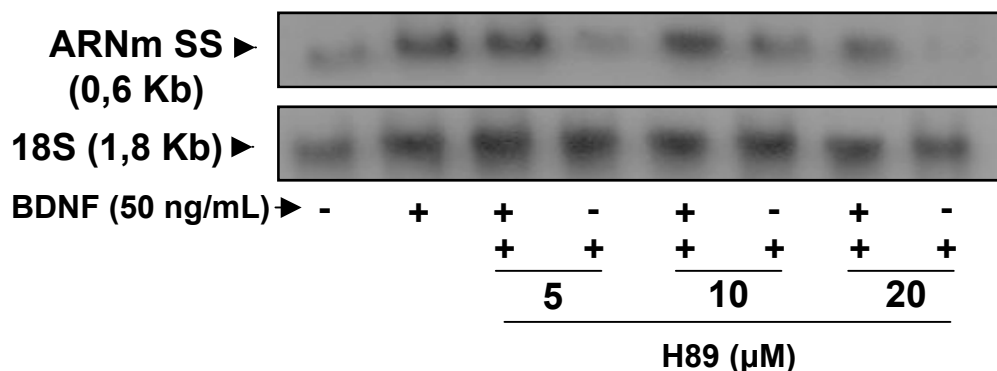
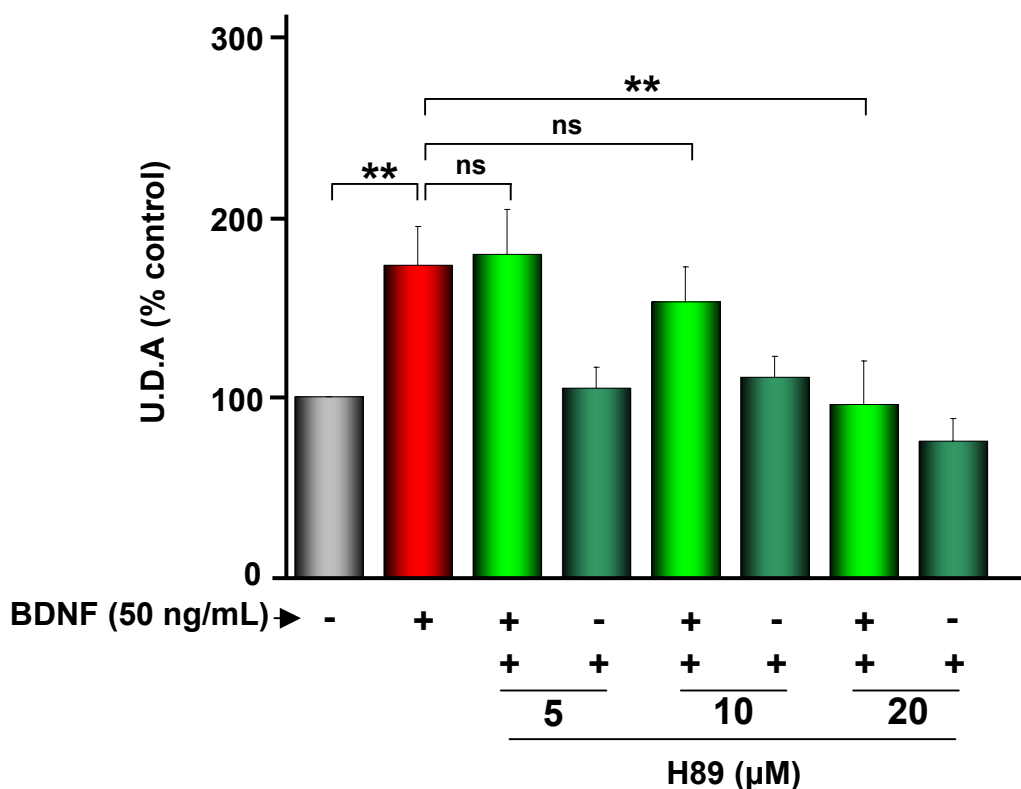
A**B**

Figura 39. Efecto del bloqueo de la vía AMPc/PKA con el inhibidor H89 sobre la inducción del ARNm de SS por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con H89 (5, 10 y 20 μM) y posteriormente se trataron durante 48 horas con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Northern blot, donde se empleó una ribosonda de SS marcada con d-UTP- $P^{32\alpha}$. Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de una sonda de ARNr 18S marcada con d-CTP- $P^{32\alpha}$.

B: Cuantificación densitométrica del ARNm de SS, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), **, p<0,01, ns, no significativo.

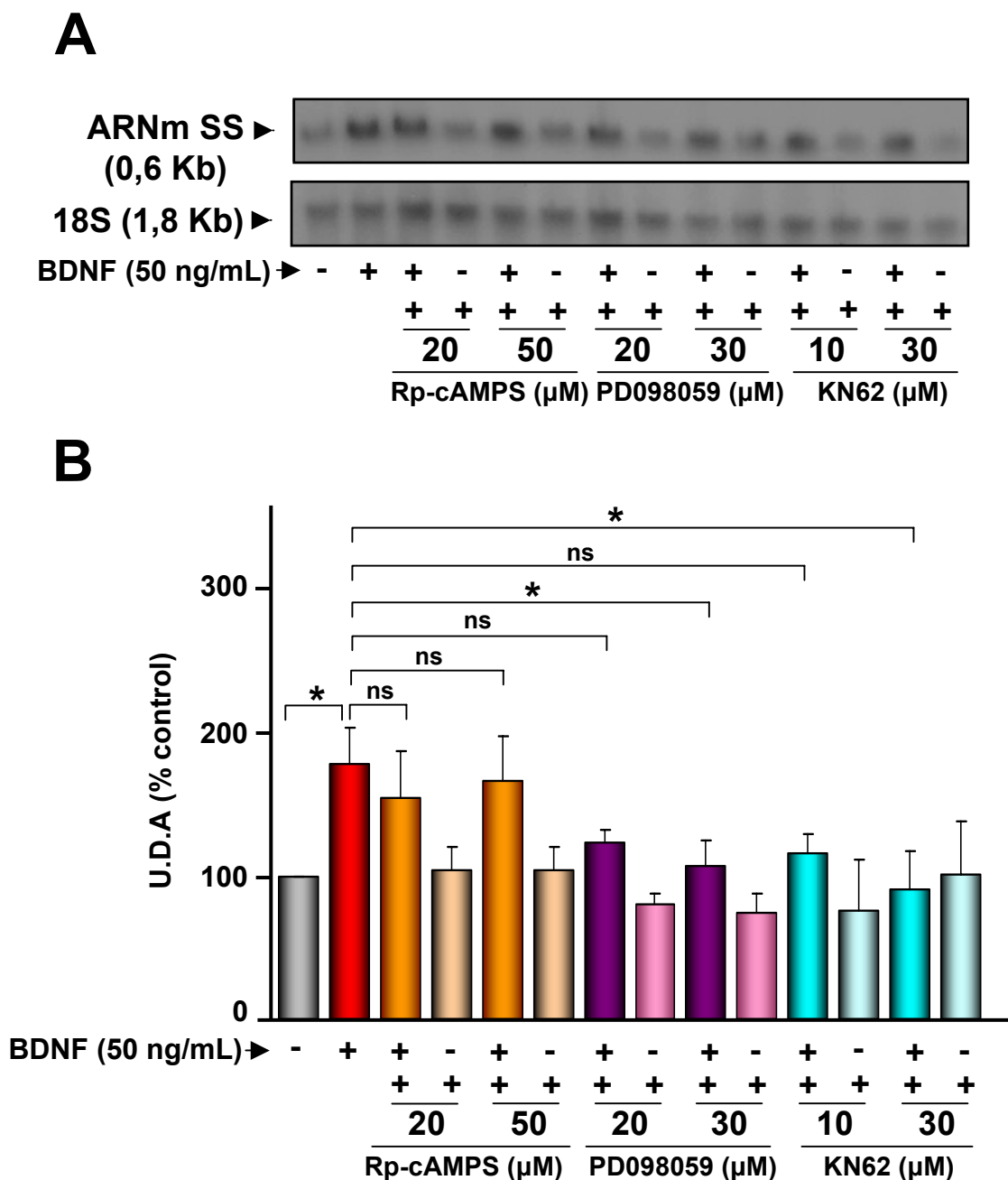


Figura 40. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, con el inhibidor Rp-cAMPS, MAPK (ERK 1/2), con el inhibidor PD098059, y CaMKs con el inhibidor KN62, sobre la inducción del ARNm de SS por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con Rp-cAMPS (20 y 50 μM), PD098059 (20 y 30 μM) y KN62 (10 y 30 μM) y posteriormente se trataron durante 48 horas con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Northern blot, donde se empleó una ribosonda de SS marcada con d-UTP- $P^{32\alpha}$. Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de una sonda de ARNr 18S marcada con d-CTP- $P^{32\alpha}$.

B: Cuantificación densitométrica del ARNm de SS, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, $p < 0,05$, ns, no significativo.

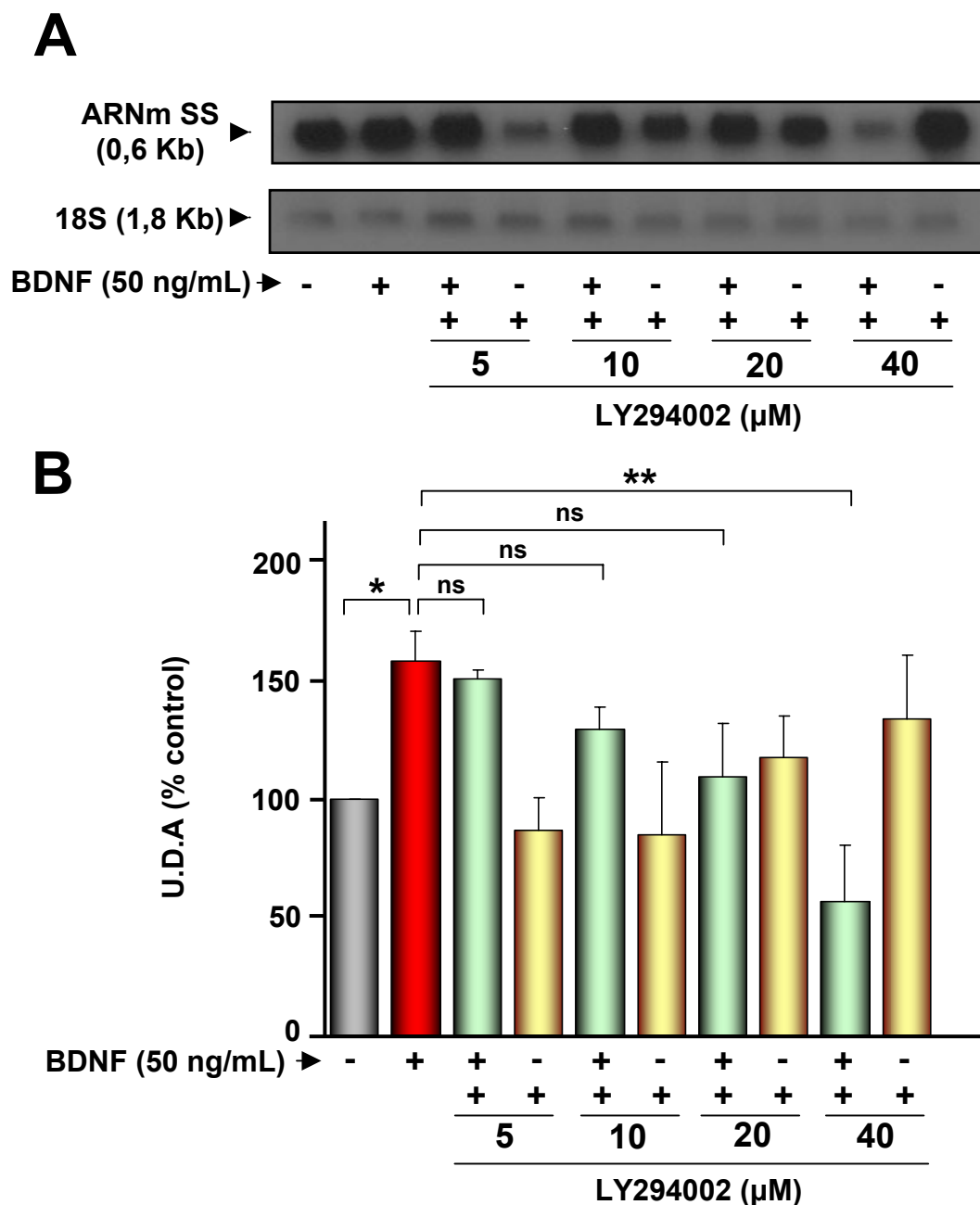


Figura 41. Efecto del bloqueo de la vía PI3K/Akt con el inhibidor LY294002 sobre la inducción del ARNm de SS por BDNF. Las células cerebrocorticales se incubaron durante 45 minutos con LY294002 (5, 10, 20 y 40 μM) y posteriormente se trataron durante 48 horas con BDNF (50 ng/ml).

A: Autorradiografía representativa de un Northern blot, donde se empleó una ribosonda de SS marcada con d-UTP- $P^{32\alpha}$. Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de una sonda de ARNr 18S marcada con d-CTP- $P^{32\alpha}$.

B: Cuantificación densitométrica del ARNm de SS, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos \pm E.S. (n=3), *, p<0,05, **, p<0,01, ns, no significativo.

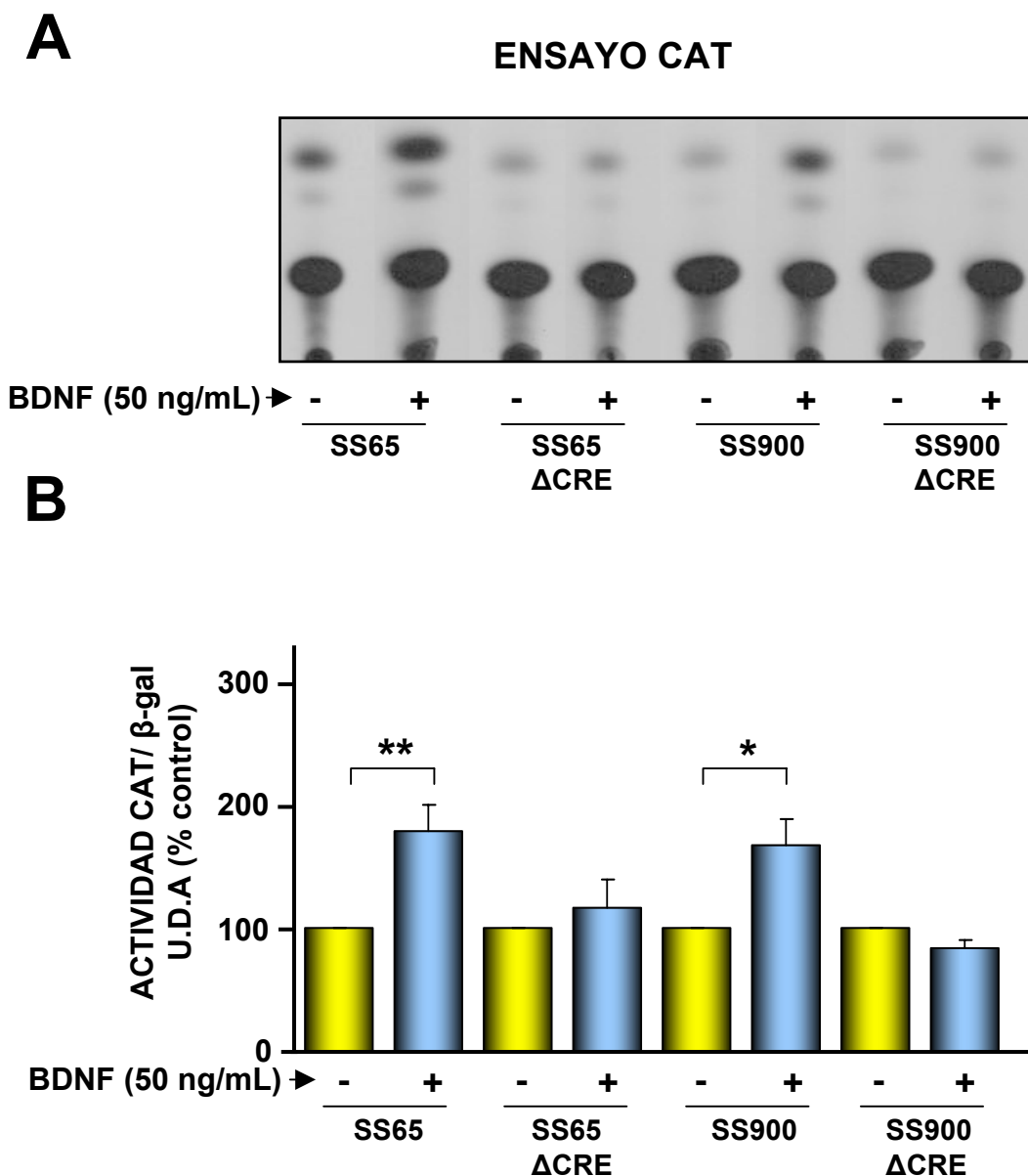


Figura 43. Efecto del BDNF sobre la actividad transcripcional del promotor del gen de SS unido a cloranfenicol acetil transferasa en la línea celular PC12trkB. Las células PC12trkB se transfectaron con las diferentes construcciones del promotor de SS unido al gen de cloranfenicol acetil transferasa [SS65, SS65ΔCRE, SS900 y SS900ΔCRE]. Posteriormente, las células se incubaron en presencia o no de BDNF (50 ng/ml) durante 48 horas. Como control de transfección un grupo de células fueron transfectadas con el promotor pRSV-CAT (datos no mostrados). Los resultados representan el porcentaje de la actividad CAT/actividad β -gal con respecto a su grupo control (no tratados con BDNF). Los valores representan la media densitométrica de 3 experimentos \pm E.S. (n=3), *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

A

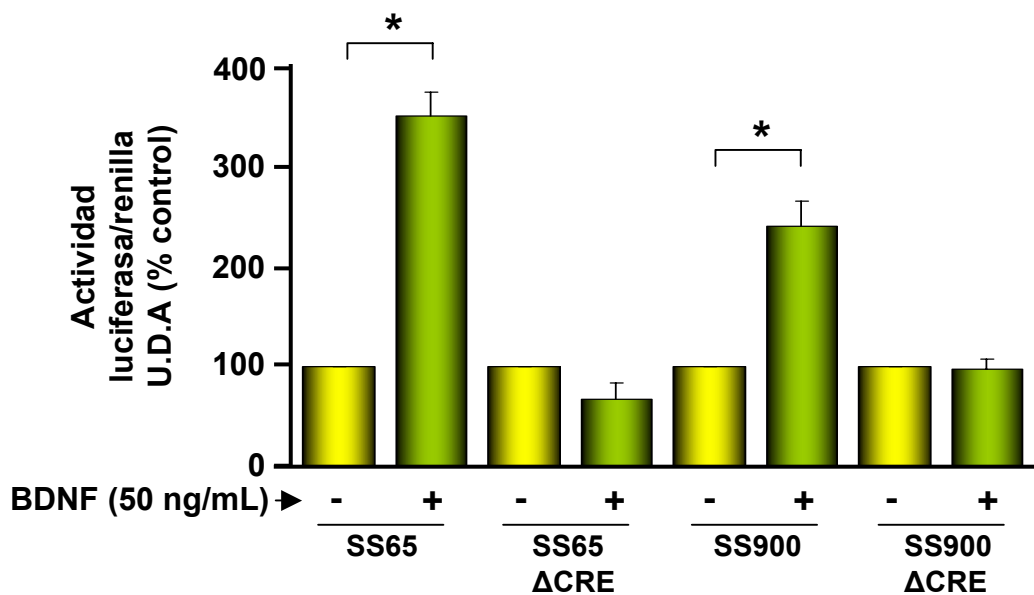


Figura 44. Efecto del BDNF sobre la actividad transcripcional del promotor del gen de SS unido a luciferasa en cultivos primarios. Las células cerebrocorticales, previamente incubadas durante 24 horas en medio DMEM-N1 sin FGFb, se transfectaron con las diferentes construcciones del promotor de SS unido al gen de luciferasa [SS65, SS65ΔCRE, SS900 y SS900ΔCRE]. Posteriormente, se incubaron en presencia o no de BDNF (50 ng/ml) durante 48 horas. Como control de transfección un grupo de células fueron transfectadas con el promotor pRSV-Luc (datos no mostrados). Los resultados representan el porcentaje de la actividad luciferasa/actividad renilla con respecto a su grupo control (no tratados con BDNF). Los valores representan la media densitométrica de 5 experimentos \pm E.S. (n=5), *, $p < 0,05$.