



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

“EL ENVEJECIMIENTO DE LOS ASTROCITOS Y LA PÉRDIDA DE
ESPINAS DENDRÍTICAS. POSIBLES IMPLICACIONES EN EL
SÍNDROME DE DOWN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

HERNÁNDEZ GUZMÁN DAVID ANTONIO

DIRECTOR DE TESIS

DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

REVISOR:
DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA

COMITÉ SINODAL:
DRA. MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ ORTIZ
DR. OSCAR ZAMORA ARÉVALO
DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO.



® Facultad
de Psicología

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice General

LISTA DE ABREVIATURAS:	1
RESUMEN:	2
INTRODUCCIÓN:	4
CAPÍTULO 1: ENVEJECIMIENTO FISIOLÓGICO Y ENVEJECIMIENTO EN EL SÍNDROME DE DOWN	7
1.1 ENVEJECIMIENTO	7
1.2 ENVEJECIMIENTO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	8
1.3 EL ENVEJECIMIENTO EN EL SÍNDROME DE DOWN.....	9
CAPÍTULO 2: ESPINAS DENDRÍTICAS, SÍNDROME DE DOWN Y EL ENVEJECIMIENTO	12
2.1 LAS ESPINAS DENDRÍTICAS.....	12
2.2 ESPINAS DENDRÍTICAS Y ENVEJECIMIENTO.....	16
2.3 ESPINAS DENDRÍTICAS Y SÍNDROME DE DOWN.....	18
CAPÍTULO 3: ASTROCITOS, TROMBOSPONDINAS Y ESPINAS DENDRÍTICAS	21
3.1 LOS ASTROCITOS.....	21
3.2 ASTROCITOS Y ENVEJECIMIENTO	22
3.3 <i>LOS ASTROCITOS COMO MODULADORES DE LA FORMACIÓN DE ESPINAS DENDRÍTICAS</i>	23
3.4 <i>TROMBOSPONDINA 1 (TSP-1)</i>	24
4. JUSTIFICACIÓN:	27
5. OBJETIVOS:	27
5.1 GENERAL:	27
5.2 Particulares:	27
6.- HIPÓTESIS:	28
7. MATERIALES Y MÉTODO:	28
7.1 CULTIVOS CELULARES.....	28
7.2 COCULTIVOS NEUROGLIALES DE HIPOCAMPO.....	29
7.3 INMUNOFLUORESCENCIA:.....	30
7.4 ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA:	31
7.5 MUESTRAS SANGUÍNEAS	31
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	32
8. RESULTADOS:	33
9. DISCUSIÓN:.....	42
10. CONCLUSIÓN:	48
11. REFERENCIAS:	50

Dedicatorias:

A mis padres (apas) quienes han sido la fuente de mis sueños y mi principal apoyo para conseguirlos; ustedes que a pesar de ignorar los caminos que he recorrido, han sabido ser los mejores guías. ¡Los quiero!

A mis hermanos Faico y Marina, que desde que tengo memoria me han acompañado en el viaje de esta vida, mostrándome esos caminos y llenándolos de momentos- buenos y malos- que recuerdo con emoción y que me impulsan a recorrer otros nuevos.

A mis hermanas (postizas) Angelique, July, Jimena, Nubia; Nos encontramos de paso y nos acompañamos desde entonces, ustedes quienes también comparten este viaje, me soportaron y colaboraron para que yo pueda lograrlo. Por todo lo vivido son ahora parte de mi familia. ¡Gracias!

A mis amigos: Raf, Giovanni, Axler, Eben, Ivonne, Ale Pingüino, May, Tzitzik, Jezz, Angel, Chio, Ale Rivera, Daniel, Lau bere, Vaiiolet, Josué, Luis, Rulo, Betsa, Yahir. A quienes me encontré por fortuna y me brindaron más de lo que hubiera esperado. Con quienes pasé los momentos que le dieron ese sabor exquisito a mi experiencia y que llevaré siempre en el recuerdo. A quienes extraño y espero encontrarme cumpliendo sus sueños para conmemorar juntos en los nuevos tiempos.

A mi grupo teatrero: Karla, Daniel *-allá donde estés-*, Gio, Danny, Poeta, Augusto, Juanito, Dulce, Iliana, Jenny, Deya, Merari, Adri, Pao, Anaité, Orlando, Niza: Por quienes escapaba de cursos y del laboratorio para unirme a la pasión que sentimos.

A todos

Por su apoyo, sus risas, sus ideas.
Por los momentos, dudas, metas, salidas y descubrimientos
Por el llanto, los encuentros, las peleas, los abrazos.
Por las desveladas, las subidas, las bajadas.
Por los deseos de seguir, los viajes y las palabras.
Por su inteligencia, compañía y abandonos.
Por lo prestado, lo devuelto y lo olvidado.
Por la vergüenza y el orgullo.
Por el hambre y la abundancia.
Por la sorpresa, la cordura y la desfachatez.
Por lo aprendido y lo olvidado.
Por lo bueno y por lo malo.
Por haber estado.

** Éste trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Neurobiología del síndrome de Down de la facultad de psicología de la UNAM. Durante el desarrollo del trabajo se contó con el apoyo y una beca del proyecto PAPIIT IN217211-3 "Patología y plasticidad de las espinas dendríticas en el síndrome de Down. Contribución de la Trombospondina-1 (TSP-1)".*

Se hace un reconocimiento especial a la Dra. Leticia Verdugo de la Facultad de Medicina de la UNAM, por las facilidades otorgadas en la realización de ésta tesis, y al Dr. Jorge Busciglio de la Universidad de California Irvine, por la facilitación de muestras sanguíneas.

"[Las neuronas] células de formas delicadas y elegantes,
las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas
quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."

-Santiago Ramón y Cajal-

Lista de abreviaturas:

APP- *proteína precursora del péptido beta amiloide.*

A β - *péptido beta amiloide.*

BACE2- *proteína beta secretasa 2.*

EA- *enfermedad de Alzheimer.*

EAAT2- *transportador excitatorio de aminoácidos 2.*

ELISA- *Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.*

GFAP- *siglas del inglés: Glial Fibrillary Acidic Protein (Proteína Fibrilar Acídica de la Glía).*

GPx- *enzima antioxidante Glutación peroxidasa.*

MCA.- *medio acondicionado de astrocitos*

mRNA- *RNA mensajero.*

NF-1- *Neurofibromatosis-Related Protein. (Proteína relacionada a la fibromatosis)*

NMDA- *receptor glutamatérgico N-metil D-aspartato.*

PSN1- *gen de la presenilina 1*

ERO- *especies reactivas de oxígeno*

S-100 β - *proteína de unión a calcio involucrada en regulación de procesos de procesos como la progresión del ciclo celular y la diferenciación.*

SD – *síndrome de Down.*

SD/EA- *síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer.*

SNC- *sistema nervioso central.*

SOD-1- *enzima Super óxido dismutasa*

TNF- α – *factor de necrosis tumoral alfa.*

TSP-1- *Trombospondina 1.*

u.a.- *unidades arbitrarias de medición.*

Resumen:

El síndrome de Down (SD), es la principal aneuploidía autosomal desarrollada en humanos y la causa genética más común de retraso mental. Las anomalías en las espinas dendríticas, la disminución en la densidad sináptica, la disfunción cognoscitiva, el envejecimiento prematuro y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA), son características comunes del SD. Las personas con SD que desarrollan la EA, muestran una disminución notable en la densidad de las espinas dendríticas y las sinapsis. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en este proceso no se conocen. Los astrocitos juegan un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de las espinas dendríticas y la sinaptogénesis. Previamente, hemos demostrado que los astrocitos SD están directamente involucrados en la disminución de las espinas dendríticas y las sinapsis, debido a una alteración en la secreción de una glicoproteína de la matriz extracelular: la trombospondina-1 (TSP-1). Sin embargo, la relación entre la TSP-1 y la pérdida de espinas asociada al envejecimiento y al desarrollo de la EA relacionada con el SD no se conoce. Este trabajo se propuso estudiar si el envejecimiento de los astrocitos afecta la secreción de TSP-1, y si esto tiene efectos sobre la aparición de un marcador de espinas dendríticas (drebrina).

Cultivos primarios de células astro-gliales fueron utilizados para evaluar el efecto del envejecimiento de los astrocitos sobre su capacidad de secretar TSP-1. Los niveles de TSP-1 fueron determinados en el medio acondicionado de los astrocitos jóvenes (5-10 DIV) y viejos (30 DIV). Los resultados indican que los niveles de TSP-1 se reducen con la edad del cultivo. Con el fin de determinar si la reducción de los niveles de TSP-1 en cultivos viejos de astrocitos afecta la formación de espinas dendríticas; se sembraron neuronas hipocampales sobre los cultivos de astroglia de 30DIV y los niveles de drebrina (un marcador de espinas dendríticas) fueron cuantificados. En estas condiciones, se observó que la drebrina disminuye hasta un 75% (5.01 ± 0.30 u.a.) comparado con las neuronas sembradas sobre los astrocitos de 10 DIV (20.75 ± 0.74 u.a.). Adicionalmente, y con el fin de explorar si los niveles de la TSP-1 disminuyen durante el envejecimiento en humanos, se

determinaron los niveles de TSP-1 en el suero de personas jóvenes y de edad avanzada. Los resultados indican que los niveles de la TSP-1 en sangre disminuyen durante el envejecimiento.

Estos resultados sugieren fuertemente que la TSP-1 podría estar involucrada en la pérdida de las espinas dendríticas que se observa en el envejecimiento normal, en las personas con SD y en las personas con SD que desarrollan la enfermedad de Alzheimer (SD/EA).

Introducción:

El síndrome de Down (SD) o trisomía 21, es la principal alteración genética en la población humana compatible con la vida (Sherman *et al.*, 2007). Las personas diagnosticadas con este padecimiento pueden mostrar anomalías fenotípicas que incluyen: el dismorfismo craneo-facial (Rechtsmeier *et al.*, 2000), deficiencias inmunes y endócrinas (Fort *et al.*, 1984; Kennedy *et al.*, 1992), alta incidencia de leucemia y diabetes (Anwar *et al.*, 1998; Roizen *et al.*, 1993), defectos congénitos del corazón y tracto gastrointestinal (Freeman *et al.*, 1998; Carnicer *et al.*, 2001), así como retraso mental (Roizen y Patterson, 2003).

En los últimos años, como resultado de la mejora en los servicios de salud, la tasa de supervivencia y la longevidad de las personas con SD han mejorado de manera importante (Roizen y Patterson, 2003); no obstante estas condiciones se acompañan a su vez de un *envejecimiento prematuro* y una alta vulnerabilidad para desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA) (Patterson y Costa, 2005; Patterson, 2007). Ambas condiciones conducen a *una disfunción intelectual* relacionada con la pérdida progresiva de la memoria que asemeja a los cambios ocurridos durante el envejecimiento normal (Lott y Head, 2001). Estas alteraciones cognitivas, presentes en el SD y en los pacientes con SD que desarrollan la EA (SD/EA), podrían estar asociadas a cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas (Marín Padilla, 1972,1976; Purpura, 1974; Suetsugu y Mehraein, 1980; Ferrer y Gullota, 1990; Huttenlocher, 1991). Sin embargo, los mecanismos involucrados en este proceso son aún desconocidos.

Las espinas dendríticas son pequeñas proyecciones que emergen del cuerpo de las dendritas y constituyen los principales sitios de transmisión sináptica excitatoria (Yuste y Bonhoeffer, 2004; Ethell y Pasquale, 2005). Las espinas, son estructuras altamente móviles y pueden sufrir remodelamientos dependientes de actividad sináptica a lo largo de la vida (Halbach, 2009). Las alteraciones en la morfología y densidad de las espinas dendríticas se han reportado en pacientes

con desórdenes neurológicos como la isquemia, daño traumático y epilepsia (Jiang *et al.*, 1998; Fiala *et al.*, 2002), en desordenes psiquiátricos como la esquizofrenia (Garey *et al.*, 1998; Glantz y Lewis, 2000) así como en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (McNeill *et al.*, 1988), la EA (Ferrer y Gullota, 1990; Baloyannis, 2009), enfermedad de Huntington (Richards *et al.*, 2011) y en desórdenes del neurodesarrollo (Fiala *et al.*, 2002). Las modificaciones en la forma y número de las espinas dendríticas pueden tener como resultado defectos en la actividad sináptica que podrían afectar los circuitos involucrados en diversas funciones cognitivas (Morrison y Baxter, 2012).

En humanos, el declive cognoscitivo es una característica común en el envejecimiento normal y patológico (*en presencia de enfermedades neurodegenerativas*). Dicho daño cognoscitivo puede ocurrir mucho antes de que exista una pérdida neuronal apreciable y se cree que es mediado por alteraciones dendríticas y sinápticas (Jacobs *et al.*, 1997; Morrison y Hof., 1997; Dickstein *et al.*, 2007; Morrison y Baxter, 2012). Sin embargo, pocos estudios se han enfocado a conocer los mecanismos celulares involucrados en este proceso.

En los últimos años diversas evidencias experimentales han demostrado que los astrocitos juegan un papel importante en la sinaptogénesis así como en el desarrollo, movilidad y estabilidad de las espinas dendríticas (Hansson y Ronnback, 2003; Slezak y Pfrieder, 2003, 2006; Nishida y Okabe, 2007), a través de la liberación de factores solubles como el colesterol y el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), entre otros (Mauch *et al.*, 2001; Beattie *et al.*, 2002; Göritz *et al.*, 2002) o por la interacción física con las neuronas (Haber *et al.*, 2006; Nishida y Okabe, 2007). Sin embargo, el papel de los astrocitos durante el envejecimiento celular y su relación con la pérdida de espinas dendríticas ha recibido poca atención.

En trabajos previos, se ha demostrado que la trombospondina-1 (TSP-1), una proteína liberada y sintetizada por los astrocitos, puede tener un efecto modulador de la formación de las espinas dendríticas y las sinapsis durante el

desarrollo. (Christopherson *et al.*, 2005; Eroglu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). De manera interesante, se ha observado que la TSP-1 se encuentra disminuída en los cerebros de personas con SD (García *et al.*, 2010) y que puede expresarse en placas neuríticas de pacientes con EA (Buée *et al.*, 1993; Cáceres *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009), dos condiciones en las que se observan alteraciones en las espinas dendríticas, sugiriendo que la TSP-1 podría tener un efecto modulador en el desarrollo y mantenimiento de las espinas y sinapsis a lo largo de la vida. Sin embargo, se desconoce si la concentración de la TSP-1 cambia a lo largo de la vida del individuo, y si esto podría ser la causa de la disminución de la memoria observada durante el envejecimiento normal y/o durante el envejecimiento acelerado que se observa en personas con SD/EA.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar si los niveles secretados de la TSP-1 disminuyen durante el envejecimiento de los astrocitos, y si esto influye en la pérdida de un marcador de espinas dendríticas en un modelo *in vitro*. Además éste trabajo contribuye a incrementar el conocimiento sobre las interacciones neurogliales en las condiciones de envejecimiento normal y sobre la fisiología de la TSP-1.

Capítulo 1: Envejecimiento fisiológico y envejecimiento en el síndrome de Down

1.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo y universal en los seres vivos, que consiste en un conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que suponen una disminución de la capacidad de adaptación en cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, que con el tiempo dirigen hacia la muerte (Romo, 2008).

Con los desarrollos actuales en la mejora de los servicios y cuidados médicos, la esperanza de vida en México se ha incrementado. De acuerdo con las proyecciones del Consejo Nacional de Población (CONAPO), en el año 2005 la población de la tercera edad (65 años en adelante), representaba 5.2% de la población total mientras que, para el año 2010 representaba el 5.9%. Se estima que para mediados de este siglo (año 2050), la población de adultos mayores que actualmente representa el 7% de la población total, ascienda al 28% de los cuales más de la mitad será mayor a 70 años de edad (CONAPO, 2005), por lo que la atención a las personas de la tercera edad representará una inversión económica muy alta con el fin de evitar problemas de salud en esta población. Por ello el estudio de este grupo poblacional resulta de gran interés y particularmente por los cambios que involucran al sistema nervioso central (SNC). Durante el envejecimiento, en el SNC existen diversas alteraciones, entre las que se enumeran, la reducción en la complejidad de las ramificaciones dendríticas neuronales (Nakamura *et al.*, 1985; Peters *et al.*, 2001), la reducción del tamaño del soma neuronal (Peinado *et al.*, 2000), alteraciones en número de receptores a neurotransmisor (Gazzaley *et al.*, 1996; Hof *et al.*, 2002), cambios en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas (Chang *et al.*, 2005) y la retracción o pérdida de espinas dendríticas y sinapsis (Jacobs *et al.*, 1997; Duan *et al.*, 2003; Dickstein *et al.*, 2007). Dichos cambios, inciden sobre la capacidad plástica del cerebro y sobre su capacidad para el procesamiento de la información; además,

hacen más probable el surgimiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA y se han visto asociados a la pérdida de las habilidades para la vida cotidiana y al declive cognoscitivo observable en la reducción de la capacidad para el desarrollo de actividades instrumentales, ambos indicadores de competencia funcional y a su vez de bienestar subjetivo (Quiroz; 2010).

Debido a lo anterior, una de las metas más importantes de la neurobiología del envejecimiento es determinar los mecanismos que subyacen a los cambios relacionados con la habilidad cognoscitiva.

1.2 Envejecimiento en el sistema nervioso central

El envejecimiento del cerebro, es un fenómeno natural y progresivo que se manifiesta por el decline cognoscitivo. Particularmente las alteraciones en el hipocampo durante el envejecimiento conducen a déficits funcionales en procesos asociados a memoria y aprendizaje (Rosenzweig y Barnes, 2003). En los roedores viejos, por ejemplo, se han descrito déficits en tareas espaciales dependientes de hipocampo y tareas de aprendizaje contextual (Gallagher y Pelleyrmounter, 1988; Barnes, 1988).

Por muchos años, el declive en las áreas más importantes del cerebro se creía asociada con la pérdida neuronal, ya que se hipotetizaba que la senescencia estaba asociada inevitablemente a la muerte de neuronas. Sin embargo, las investigaciones recientes muestran que el envejecimiento fisiológico del cerebro (*en ausencia de patologías degenerativas*), no se asocia con alguna pérdida neuronal significativa (Morrison y Hof, 1997; West *et al.*, 2004; Dickstein *et al.*, 2007). Por ejemplo, en modelos animales de envejecimiento el declive de la habilidad cognoscitiva no se asocia con la pérdida de neuronas en el hipocampo (Rapp y Gallagher, 1996) o corteza (Gazzaley *et al.*, 1997; Rapp *et al.*, 2002). Actualmente se hipotetiza que el envejecimiento del cerebro se manifiesta en cambios más sutiles de la conectividad neuronal, observables en alteraciones

como: el número de receptores a neurotransmisores (*p.ej. la reducción en la expresión del mRNA de la subunidad NRB2 de receptores glutamatérgicos tipo NMDA en la corteza prefrontal de macacos [Bai et al., 2004] y una reducción de las subunidades GLUR2 y NMDAR1 en neuronas corticales de proyección durante el envejecimiento [Hof et al., 2002]*); una reducción de la complejidad dendrítica (*p.ej. reducción en el número de dendritas basales en neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora humana (Nakamura et al., 1985; Dickstein et al., 2007)*); alteraciones en la tasa de disparo del potencial de acción (Chang et al., 2005) y de forma importante, reducción de la densidad de espinas dendríticas y sinapsis (Jacobs et al., 1997, 2001; Duan et al., 2003; Hof y Morrison 2004; Dickstein et al., 2007) que podría influir en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas.

1.3 El envejecimiento en el síndrome de Down

El síndrome de Down (SD), es la principal aneuploidía autosomal capaz de producir organismos viables y funcionales (Sherman et al., 2007). Etiológicamente el SD representa un grupo homogéneo cuyas alteraciones son causadas por la presencia de una copia extra del cromosoma 21, que puede originarse por una trisomía, translocación o mosaicismo (Paterson y Costa, 2005). Su incidencia es de aproximadamente 1 de cada 733 nacimientos vivos (Sherman et al., 2007). En México, de acuerdo con un estudio de la fundación John Langdon Down (www.fjld.com.mx), se estima una población de 140,000 personas que lo padecen, aunque este número puede ser mayor ya que no existe una cifra oficial de personas con SD en el país.

Las personas afectadas con SD presentan diversas anomalías fenotípicas que incluyen, el dismorfismo cráneo-facial (Retchsmeier et al., 2000), deficiencias inmunes y endocrinas (Fort et al., 1984; Kennedy et al., 1992), alta incidencia de leucemia y diabetes (Anwar et al., 1998; Roizen et al., 1993), defectos congénitos del corazón y tracto gastrointestinal (Freeman et al., 1998;

Carnicer *et al.*, 2001). Sin embargo, los efectos más notables del SD tienen relación con el sistema nervioso central (SNC) ya que implican, de manera invariable, retraso mental (Zigman y Lott, 2007) y en algunos casos déficit de atención/hiperactividad, depresión, agresividad, incoordinación motora, hipotonía muscular y respuestas sensoriales anormales (Myers y Pueschel, 1991). Como resultado de un avance en los cuidados médicos, la expectativa de vida de individuos con SD se ha incrementado en los últimos años (Nieuwenhuis-Mark, 2009). Desafortunadamente este progreso ha sido acompañado por una alta incidencia del desarrollo la enfermedad de Alzheimer (EA) en adultos con SD (Mann, 1988; Zigman y Lott, 2007). El desarrollo de este proceso produce nuevos cambios para los pacientes y sus familiares debido a la necesidad de ajustarse a nuevos tipos de cuidados.

La EA es la forma más común de demencia, clínicamente caracterizada por la pérdida progresiva de la memoria y cognición. Comúnmente es diagnosticada en individuos de 65 años de edad en adelante, sin embargo, en pacientes con SD la EA aparece aproximadamente a los 40 años de edad (Mann, 1988), produciendo en ellos un mayor deterioro de las funciones intelectuales. Los genes responsables de la neuropatología asociada con SD no han sido totalmente caracterizados, pero diversas evidencias indican que el desarrollo de la EA en el SD puede estar relacionado con la sobreexpresión de genes localizados en el cromosoma 21; particularmente la proteína precursora del β -amiloide (APP) (Perluigi y Buterfield, 2011). El incremento de la expresión de la proteína precursora del péptido β -amiloide, conduciría a un incremento de β -Amiloide que podría activar procesos de muerte neuronal (Selkoe, 2001). Consistentes con esta hipótesis, son los resultados que revelan un incremento en los niveles de A β 42 en plasma sanguíneo de pacientes con SD (Schupf *et al.*, 2001; Schupf *et al.*, 2007) y la detección de A β 42 soluble en cerebros con SD, pero no en sujetos control (Teller *et al.*, 1996). Además, han sido detectados depósitos difusos de A β 42 en algunos cerebros SD durante la niñez (Lemere *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha sugerido que el desarrollo de la EA en pacientes SD también podría estar

asociada a una sobreexpresión de los genes *BACE2* y *SOD-1*, ambos localizados en el cromosoma 21 (Lott y Head, 2001; Zigman y Lott, 2007) y al polimorfismo -48C/T en la región promotora del gen de la presenilina1 (PSN1), que se involucra en la modulación del péptido β -amiloide en humanos que padecen EA y se asocia también al SD (Prasher *et al.*, 1997; Lucarellia *et al.*, 2004); sugiriendo mecanismos de susceptibilidad compartida en ambos desordenes.

Los mecanismos anteriores podrían favorecer no solo el desarrollo de las placas amiloides, sino que también un incremento en el estrés oxidativo, generando una neuropatología similar a la que se desarrolla en EA por vías de un envejecimiento prematuro (Sandowski *et al.*, 1994; Lott y Head, 2001; Antonarakis *et al.*, 2004; Webb y Murphy, 2011), haciendo que las personas que padecen al SD cursen con un deterioro acelerado y progresivo de sus funciones intelectuales, que impactan directamente en su calidad de vida.

Capítulo 2: Espinas dendríticas, Síndrome de Down y el envejecimiento

2.1 Las espinas dendríticas

Las neuronas son un tipo de células altamente diferenciadas del sistema nervioso cuyas principales características son la excitabilidad eléctrica de su membrana plasmática y su especialización para la recepción de estímulos y conducción de impulsos nerviosos (Kandel *et al.*, 2000; Squire *et al.*, 2008). Desde el punto de vista funcional, cada neurona presenta tres partes: el cuerpo celular o *soma*, encargado de integrar la información recibida, y que contiene al *núcleo* o almacén del material genético; *el axón*, zona por donde emite señales a otras neuronas, y las *dendritas*, que son zonas receptoras encargadas de recibir la información que proviene de otras neuronas (Squire *et al.*, 2008) [fig. 1]. Estas últimas especializaciones a su vez pueden ramificarse en patrones complejos y poseen múltiples protrusiones llamadas *espinas dendríticas* porque asemejan a las espinas del tallo de una rosa [fig. 2A]. Anatómicamente, las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias especializadas que emergen de las dendritas constituidas por una cabeza anclada al cuerpo de la dendrita a través de un tallo o cuello de 0.04–0.5 μm de diámetro y de longitud de entre 0.2–2 μm ; su volumen total oscila entre 0.01–0.8 μm^3 (Sorra y Harris, 2000; Heike y Morgan, 2001; Fiala *et al.*, 2002) [fig. 2B]. Con base en estudios anatómicos detallados de tejido cerebral, las espinas dendríticas se han clasificado de acuerdo a su morfología en espinas tipo: hongo (espinas con cuellos delgados y largos y cabezas irregulares), tazón (con apariencia de copa), regordetas (espinas sin cuello y cabeza con apariencia globular), delgadas (espinas con cuello largo y cabezas pequeñas) y filipodios (Protrusiones largas, delgadas y carentes de cabeza) (Peters A. y Kaiserman–Abramoff; 1979; Sorra y Harris, 2000) [fig. 2C]. Éstas últimas son consideradas formas inmaduras de una espina dendrítica (Ziv y Smith, 1996). Además, las diferencias morfológicas en las espinas se ve reflejada en sus características moleculares; por ejemplo, en las espinas con cabezas grandes (tipo Hongo) predominan receptores glutamatérgicos del tipo AMPA (α -amino-3-

hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) y muestran potenciales postsinápticos excitatorios grandes; mientras que las espinas del tipo delgado parecen estar dominadas por receptores tipo NMDA (N-methyl-D-aspartate) y ser comparativamente menos sensibles al glutamato (Takumi *et al.*, 1999; Matsuzaki *et al.*, 2001).

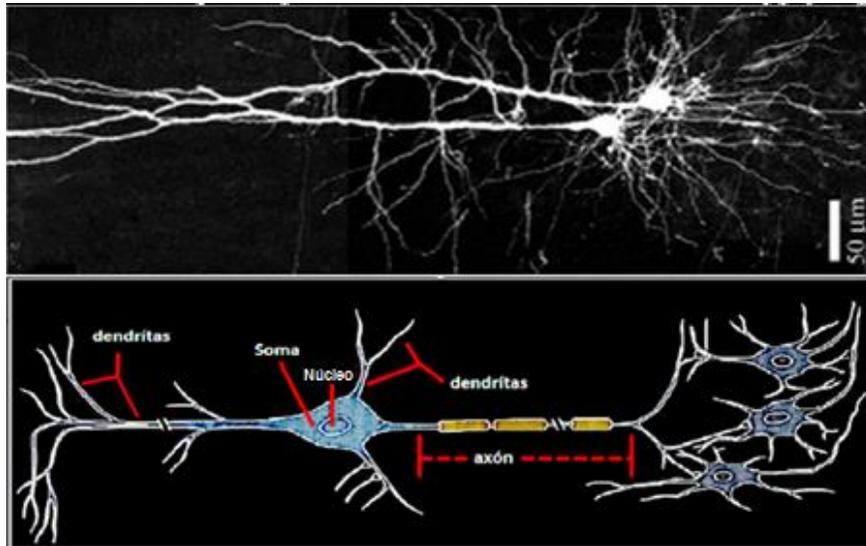


Fig. 1. La estructura de la neurona. A) Imagen de microscopía confocal muestra morfología de dos neuronas piramidales. B) Representación esquemática. El cuerpo celular o soma, contiene la información genética y da origen a dos tipos de procesos, los axones y las dendritas. Los axones son el elemento transmisor del potencial de acción. Las dendritas son los elementos de entrada de información a la neurona y en conjunto con el soma, reciben los contactos sinápticos de otras neuronas formando sinapsis. [Modificado de Kandel *et al.*, 2000 y Kalisman *et al.*, 2004].

Las espinas se distribuyen densamente a lo largo de un mismo segmento dendrítico (aproximadamente 1-10 espinas por micrómetro de longitud dendrítica), y en ese mismo segmento se pueden describir todas las morfologías antes mencionadas (Harris, 1999; Sorra y Harris; 2000), por lo que se cree que no existe especialización morfológica asociada a regiones específicas del tejido nervioso, sino que la morfología de cada espina representa la historia de activación de la neurona en la que residen.

Desde su descubrimiento y descripción por Don Santiago Ramón y Cajal en 1888, se propuso que las espinas dendríticas podrían funcionar como los elementos de comunicación y contacto del SNC (García-López *et al.*, 2007); dicha hipótesis fue confirmada al determinarse que las espinas no solo establecen sinapsis sino que, constituyen el principal sitio de contactos excitatorios en el SNC, dado que ~ 90% de las sinapsis axo-dendríticas glutamatérgicas corresponden a sinapsis formadas sobre las espinas (Harris y Kater , 1994; Nimchinsky *et al.*, 2004; Ethell y Pasquale; 2005).

Las espinas contienen toda la maquinaria especializada (receptores a neurotransmisores, organelos y sistemas de señalización), para permitir la función sináptica, por lo que son estructuras clave en la regulación de la actividad neuronal (Sorra y Harris, 2000; Nimchinsky *et al.*, 2002; Álvarez y Sabatini, 2007). Las espinas no son estructuras fijas, son altamente dinámicas siendo capaces de cambiar su morfología en respuesta a la actividad eléctrica de la neurona (Ethell y Pasquale, 2005; Wyatt *et al.*, 2012), por ello se cree que la presencia de diferentes morfologías en un mismo segmento dendrítico y en un momento determinado, corresponden a los distintos niveles de actividad de las entradas sinápticas que recibe una misma célula.

Por su pequeño tamaño las espinas son capaces de restringir su contenido citoplasmático con respecto al de la dendrita en la que se posicionan, actuando como sitios de especificidad bioquímica y compartimentalización molecular (Sabatini *et al.*, 2002; Yuste, 2011; Majewska *et al.*, 2000; Yuste *et al.*, 2000; Ethell y Pasquale, 2005). A su vez, cumplen una función como sitios para la síntesis local de proteínas (Aakalu *et al.*, 2001; Ostroff *et al.*, 2002), lo que les confiere la capacidad de modular sus cambios plásticos de manera específica. Además las espinas se han visto involucradas en otras funciones importantes para la modulación de los circuitos neuronales, como por ejemplo: incrementar la conectividad sináptica en el SNC, al aumentar el área de superficie dendrítica disponible para la formación de contactos sinápticos con axones de neuronas

vecinas (Yuste; 2011), filtrar la propagación de potenciales eléctricos hacia la dendrita con el fin de aislar temporalmente a ésta de la actividad eléctrica generada en las entradas sinápticas vecinas (Araya *et al.*, 2006) y facilitar la sumación espacio temporal de los potenciales eléctricos en la neurona (Cash y Yuste ,1999).

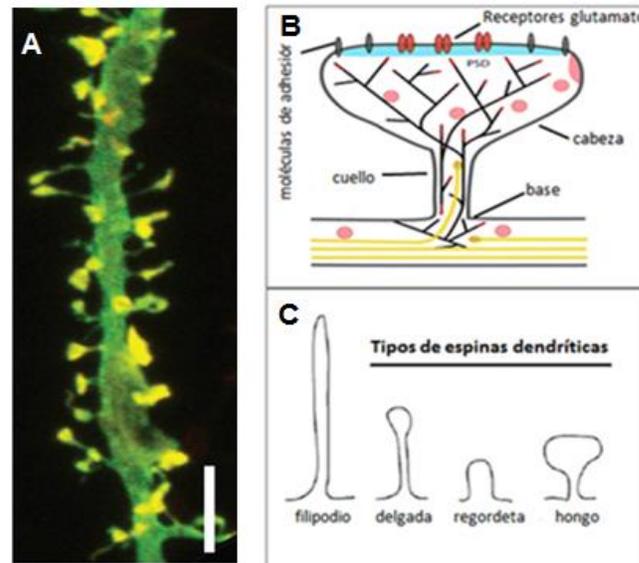


Fig2.- Morfología de las espinas dendríticas. A) Muestra el cuerpo de una dendrita (verde) y las espinas dendríticas que protruyen de él (amarillo); [Nótese el parecido de las espinas que recubren el cuerpo de la dendrita, con las espinas de una rosa]. B) Diagrama esquemático de una espina dendrítica, se muestran su base, cuello y cabeza, así como algunos de sus componentes (Receptores glutamatérgicos, moléculas de adhesión, densidad post-sináptica [PSD] y su citoesqueleto de actina. (C) Representación esquemática de un filipodio y las tres morfologías más comunes descritas por las espinas dendríticas (delgada, regordeta y hongo). Barra de escala = 5µm [Imágenes modificadas de *Hotulainen y Hoongenraad, 2010*].

Por tales razones, las espinas dendríticas juegan un papel de vital importancia en las propiedades funcionales de los circuitos neuronales, y cualquier cambio estructural que puedan sufrir, puede tener profundos efectos detrimentales sobre su función.

2.2 Espinas dendríticas y envejecimiento

Una idea común, pero errónea a cerca del envejecimiento del sistema nervioso central (SNC), es la que asocia el declive cognoscitivo con la pérdida de neuronas. La evidencia actual ha demostrado que durante el envejecimiento no existe una pérdida neuronal significativa que dé cuenta del daño cognoscitivo observable (Jacobs *et al.*, 1997; Morrison y Hof, 1997; Dickstein *et al.*, 2007; Morrison y Baxter, 2012); en cambio se propone que éste se asocia a daños más sutiles en la conectividad neuronal. Dado el hecho de que las espinas dendríticas representan los sitios principales de recepción de información en los circuitos neuronales, diversos estudios se han enfocado en la observación de estas estructuras durante el envejecimiento.

La evidencia sugiere cambios relacionados con la edad en la densidad de espinas dendríticas. Se ha descrito, por ejemplo, la pérdida de espinas dendríticas en el *giro dentado* del hipocampo de ratas de 26 y 27 meses de edad, presentando un decremento en la densidad de espinas en las dendritas basales y apicales del 10 y 12% respectivamente con respecto a ratas jóvenes (Geinisman *et al.*, 1986; Nunzi *et al.*, 1987). En el modelo de envejecimiento del ratón SAMP1TA, también se han descrito reducciones en el número de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo a la edad de 5 y 7 meses (Kawaguchi *et al.*, 1995). Estos decrementos en las densidades de espinas dendríticas del *giro dentado* y del área CA1 podrían estar relacionados con pérdida de la capacidad en el aprendizaje espacial (Geinisman *et al.*, 1986; Von Bohlen *et al.*, 2006).

En monos viejos, se ha descrito una reducción de neuronas de proyección en la corteza temporal de asociación (Duan *et al.*, 2003), y de un 32 % en neuronas piramidales de la capa III en la corteza prefrontal (Dumitriu *et al.*, 2010) con respecto a monos jóvenes, así como una reducción del 43% y 27% en el número de espinas sobre dendritas, apicales y basales respectivamente (Duan *et al.*, 2003) [fig.3]. Dicha reducción correlaciona significativamente con índices de daño

cognoscitivo en pruebas conductuales (Peters *et al.*, 1998; Dumitriu *et al.*, 2010). En lo referente a estudios con humanos, se ha observado una reducción del número de espinas dendríticas de casi el 50% en regiones corticales a partir de los 40 años de edad (Jacobs *et al.*, 1997).

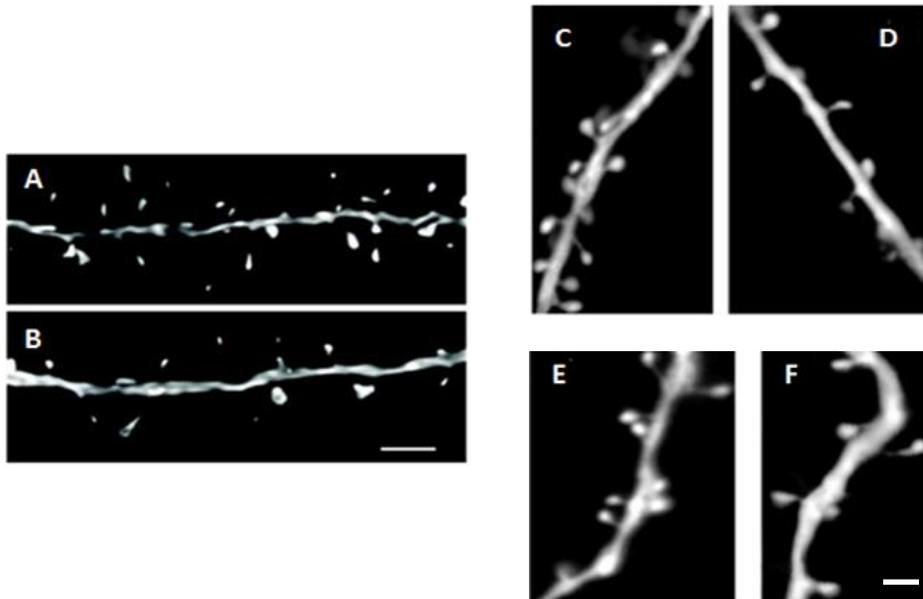


Fig.3.- Pérdida de espinas dendríticas en el envejecimiento: A y B: Reconstrucciones 3D representativas de segmentos dendríticos en Monos *Rhesus*: joven (A) y viejo (B). C-F, Imágenes de microscopía confocal laser, representativas de la morfología y densidad de espinas dendríticas en Monos de la especie *M. radiata*: adulto joven (C) y viejo (D); y de la especie *E. patas*: joven (E) y viejo (F) respectivamente. Hay consistencia inter-especie entre las densidades de espinas dendríticas en los animales jóvenes y viejos. Nótese que existe mayor densidad de espinas dendríticas en los animales jóvenes. (Barra de escala =2 µm para A-D y 3 µm para E y F) [A y B: modificado de Dumitriu *et al.*, 2010; C-F: Duan *et al.*, 2003].

Dado que las espinas representan los principales sitios postsinápticos de las sinapsis excitatorias, su reducción podría reflejar también las densidades sinápticas (Bernhardi., 2005; Duan *et al.*, 2003). En estudios de microscopía electrónica se ha observado una reducción paralela en la densidad sináptica; se reporta por ejemplo, que este decremento es de ~30-60% en la capa I de la corteza prefrontal en monos *Rhesus* (Peters *et al.*, 1998) y de 29% en la capa cortical III de monos *Macaca mulatta* (Uemura, 1980). En la corteza prefrontal

humana, las densidades sinápticas muestran un decremento progresivo en individuos de 74 años en adelante (Huttenlocher, 1979).

Los resultados de los estudios previos sugieren que la disminución en la densidad de las espinas dendríticas, durante el envejecimiento es un proceso común en que afecta la integridad de estructuras cerebrales involucradas en la actividad cognoscitiva.

2.3 Espinas dendríticas y síndrome de Down

Las espinas dendríticas están ausentes o se ven alteradas en su estructura y distribución en cerebros de personas que sufren diversas enfermedades neurológicas, psiquiátricas y desórdenes del desarrollo (McNeill *et al.*, 1988; Garey *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1998; Ferrer y Gullota, 1990; Glantz y Lewis, 2000; Fiala *et al.*, 2002; Baloyannis, 2009; Richards *et al.*, 2011); particularmente se ha observado una fuerte relación entre la alteración de las espinas y el retraso mental (Levenga y Willemsen, 2012). Marín-Padilla en 1972, describió por vez primera las anormalidades en las espinas dendríticas causadas por trisomías cromosómicas asociadas al retraso mental; dichas anormalidades describían una reducción en el número total de espinas dendríticas y espinas con morfología alargada y distribuidas de manera tortuosa a lo largo de la dendrita. Estas observaciones se hicieron posteriormente también en el SD (Marín-Padilla, 1976) y el retraso mental de origen no genético (Parpura, 1974) [Fig.4], sugiriendo que la alteración en la estructura de las espinas podía ser un sustrato común de las alteraciones cognoscitivas asociadas a estas patologías.

Con relación a estos estudios, en corteza visual primaria de pacientes con SD, se observó una reducción en la longitud y ramificación de las dendritas basilares de neuronas piramidales de la capa 5, acompañada de una reducción en el tamaño, grosor y densidad de las espinas dendríticas (Takashima *et al.*, 1981).

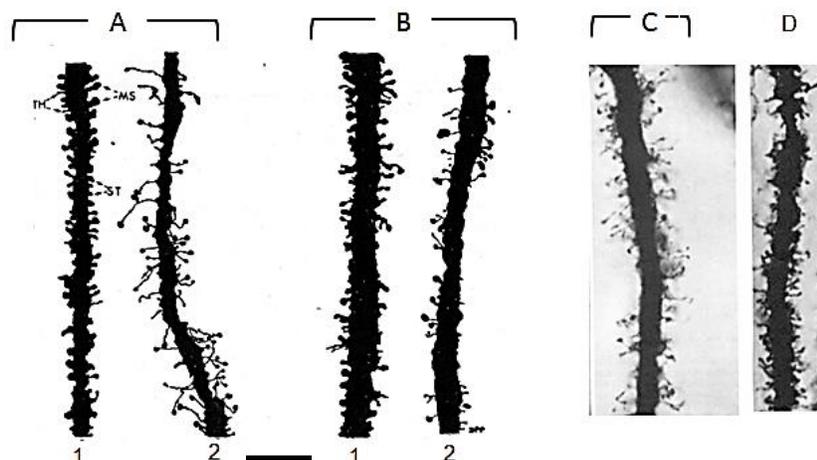


Fig.4.- **Morfología de espinas dendríticas en cerebros de personas con retraso mental de origen no genético y con retraso mental por SD.** [A: segmentos dendríticos proximal (A1) y apical (A2) de neuronas corticales de cerebro 6 meses de edad, capa V sin trisomía e historia neurológica negativa; B: segmentos dendríticos proximal (B1) y apical (B2) de corteza de cerebro en niño 10 meses edad con retraso sin trisomía (*Parpura, 1974*); C: Segmento apical de neurona cortical capa III de niño de 19 meses edad con Síndrome de Down; D: Muestra espinas normales en dendrita apical. (*Marín-Padilla, 1976*). En B y C se observa la longitud inusual, la estructura irregular y el acomodo anómalo de las espinas. Barra de escala = 10µm.

Estas alteraciones, en conjunto, podrían ser las responsables de un mal funcionamiento de los circuitos neuronales y producir un deterioro de las funciones intelectuales (*Purpura, 1974; Takashima et al., 1994; Fiala et al., 2000; Yuste, 2011*). Los resultados mencionados anteriormente también han sido descritos en ratones de la cepa Ts65Dn y Ts1Cje (*Belichenko et al., 2004; Belichenko et al., 2007*) usados como modelos de SD. En ambas cepas se observa una reducción de espinas dendríticas en el hipocampo, así como un aumento en el tamaño de la cabeza de las espinas. De manera interesante, dichos cambios se hacen más pronunciados en pacientes SD con edad avanzada. Por ejemplo, *Takashima et al., 1994*, describieron una reducción acelerada del número de espinas en dendritas basales de adultos con SD en comparación con la tasa de pérdida en adultos con cariotipo normal. Más aún, en el hipocampo de pacientes jóvenes y

adultos con SD se ha observado un decremento significativo en el número de espinas en dendritas apicales de la región del *subículum* (Suetsugu y Mehraein, 1980), y existe una reducción adicional de espinas en pacientes SD que desarrollan la enfermedad de Alzheimer (Ferrer y Gullota, 1990) [fig.5]. Aunque los mecanismos por los cuales las espinas dendríticas se ven alteradas durante el envejecimiento acelerado en el SD aún se desconocen.

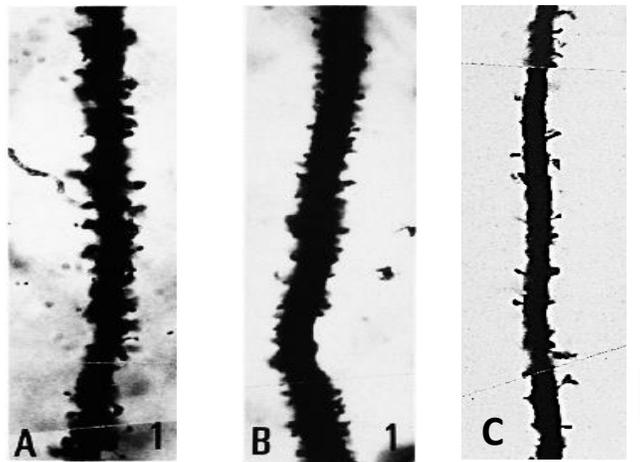


Fig.5.- Preparación de Golgi muestra reducción de espinas dendríticas en hipocampo de pacientes con SD y pacientes con SD/EA. Segmentos representativos de dendritas (*Células piramidales CA1*). En **A**) un sujeto control pareado por edad con **B**) un paciente de 35 años con SD y con **C**) paciente con SD y EA asociada. Se nota una reducción significativa (15%) en el número de espinas dendríticas en el segmento dendrítico del cerebro del paciente con SD. Una reducción adicional de espinas dendríticas ocurre (36%) en el cerebro del paciente con SD y EA asociada. Barra de escala = 10 μ m; [Imagen modificada de Ferrer y Gullota (1990)].

Capítulo 3: Astrocitos, Trombospondinas y espinas dendríticas

3.1 Los astrocitos

Los astrocitos son células gliales especializadas y el tipo celular más abundante en el SNC. La complejidad y densidad de éstas células incrementa dramáticamente con la escala filogenética (Oberheim, *et al.*, 2006; Oberheim *et al.*, 2009). En el cerebro humano constituyen el tipo celular más numeroso con un aproximado de 1.65 astrocitos por cada neurona (Bass *et al.*, 1971; Verkhratsky, 2007). A nivel genético, fisiológico y funcional, los astrocitos pueden ser tan heterogéneos como las neuronas (Hansson, 1990; Matthias *et al.*, 2003; Matyash y Kettenmann, 2010). Con base en su morfología, ubicación anatómica y fenotipo antigénico se pueden clasificar en al menos dos categorías: astrocitos protoplasmáticos y astrocitos fibrosos (Kettenmann y Verkhratsky; 2008) cada uno de los cuales difiere del otro en algunas de sus funciones principales.

Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran en la materia gris, poblando densamente la corteza cerebral y el hipocampo (Giaume *et al.*, 2007). Estas células del tejido nervioso juegan un papel importante en la homeostasis iónica, la síntesis de neurotransmisores, el metabolismo celular y la respuesta inflamatoria (Slezack y Pfrieder., 2006; Halassa *et al.*, 2007; Verkhratsky, 2007; Lynch *et al.*, 2010) y están fuertemente involucrados en una relación neuro-glial (Araque *et al.*, 1999; Verkhratsky, 2007), particularmente en la formación de las espinas dendríticas y sinapsis a través de la liberación de factores solubles como el colesterol (Göriz *et al.*, 2002), TNF- α (Beattie *et al.*, 2002) y las trombospondinas (TSP's) (Christopherson *et al.*, 2005; Eroglu, 2009) o por el contacto directo con las neuronas (Haber *et al.*, 2006; Nishida y Okabe, 2007). Se estima que un solo astrocito extiende cientos de procesos ramificados que contactan con cientos de dendritas de múltiples neuronas (Bushong *et al.*, 2002 ; Nedergaard *et al.*, 2003; Halassa *et al.*, 2007), dividiendo el neuropilo en compartimientos astrocíticos de ~ 69,000 μm^3 de superficie (Bushong *et al.*, 2002); se ha especulado que dichos

compartimientos constituyen una unidad para la integración y modulación local de la actividad neuronal dado el hecho de que todas las sinapsis que se encuentran en uno de estos compartimientos volumétricos en la corteza humana, (aprox. 140,000 sinapsis), pueden estar bajo la influencia de un único astrocito (Bushong *et al.*, 2002).

3.2 Astrocitos y envejecimiento

A pesar de sus importantes funciones y en comparación con las células neuronales, las células de la glía han recibido poca atención en la investigación neurobiológica en general (Barres, 2008) y en particular en su papel durante el envejecimiento normal o patológico. Algunos reportes sin embargo, han demostrado un incremento en la expresión de las proteínas GFAP y s-100 β en el hipocampo y otras regiones del cerebro durante el envejecimiento (Sabatinni *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005; Pertrusa *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2010; Kremsky *et al.*, 2012) y en pacientes adultos con SD (Takashima *et al.*, 1994); ambas proteínas sintetizadas por los astrocitos (Jorgensen *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2005) y asociadas a una respuesta de activación glial ante el daño y neurodegeneración (Sofroniew y Vinters, 2010). En cultivos de astrocitos envejecidos, se ha reportado una elevada producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (Pertrusa *et al.*, 2007), además de una notable reducción en número del transportador de glutamato (EAAT2), principal regulador de la recaptura de este neurotransmisor en el espacio sináptico (Simpson *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha observado también que las fallas metabólicas en los astrocitos derivados de cerebros con SD pueden contribuir con déficits en la secreción de moléculas (Busciglio *et al.*, 2002; Helguera *et al.*, 2013). El incremento de ERO, y déficits energéticos por deficiencias podrían contribuir a la pérdida neuronal mediante un mecanismo de excitotoxicidad (García y Massieu, 2004). Además, se ha reportado que el desarrollo de placas amiloides en la EA se relaciona íntimamente con los astrocitos derivados de cerebros con SD (Busciglio *et al.*, 2002) y con astrocitos

reactivos (Rodríguez *et al.*, 2007) pudiendo exacerbar el daño del tejido neuronal (Giaume *et al.*, 2007; Sofroniew y Vinters, 2010).

Estos datos sugieren que durante el envejecimiento normal o patológico (*p.ej.* SD), los astrocitos pueden presentar diversas alteraciones metabólicas que podrían influir en la homeostasis cerebral, facilitar el desarrollo de patologías neurodegenerativas y contribuir al deterioro cognoscitivo observado.

3.3 Los astrocitos como moduladores de la formación de espinas dendríticas

El primer reporte de la función de los astrocitos como moduladores de la densidad de las espinas dendríticas data de los trabajos de Meshul *et al.*, (1987), quienes reportaron un aumento en el número de espinas dendríticas sin aposiciones sinápticas en cultivos de células de Purkinje después de la exposición a un medio condicionado por astrocitos. Estudios subsecuentes dirigidos a comprender la función de los astrocitos en la morfología dendrítica y la formación de sinapsis fueron llevados a cabo por Pfrieger y Barres en 1997, quienes demostraron que en cultivos puros, las células ganglionares de la retina extendían elaboradas arborizaciones dendríticas y axones eléctricamente excitables, pero con poca actividad sináptica; sin embargo, cuando éstas se cultivaban con astrocitos o medio de cultivo condicionado por los mismos, su actividad sináptica aumentaba casi 70 veces. Cuatro años más tarde Ullian *et al.*, (2001), usando el mismo sistema experimental, identificaron que las neuronas cocultivadas con astrocitos desarrollan aproximadamente seis veces más sinapsis e incrementan en siete veces la efectividad sináptica comparado con neuronas cultivadas en ausencia de ellos, y que la habilidad de los astrocitos para aumentar la actividad sináptica se debe tanto al incremento del número de sinapsis como al incremento de la función pre y post-sináptica. La posibilidad de que los astrocitos actúen de forma similar *in vivo* se ha sugerido fuertemente por la correlación espaciotemporal de la sinaptogénesis con la aparición de los astrocitos inmaduros en el día postnatal 15 y la asociación de estos con las neuronas en sinapsis del

SNC (Ullian *et al.*, 2001; Miller y Gauthier, 2007), lo que sugiere que la sinaptogénesis requiere de la glía. Estos datos concuerdan con los de Nishida y Okabe (2007) quienes demostraron que para la formación de sinapsis es necesario el contacto directo de los astrocitos con las neuronas. Además la secreción de moléculas de la astrogliá, como el colesterol (Göritz *et al.*, 2002); TNF- α (Beattie *et al.*, 2002) y la trombospondina-1 (TSP-1) (Christopherson *et al.*, 2005), tienen un rol determinante en la sinaptogénesis, lo que sugiere que los astrocitos juegan un papel importante durante este proceso. Es así que una alteración en la función glial durante el envejecimiento fisiológico puede contribuir a la pérdida sináptica como parte de un proceso de atrofia neuronal en ausencia de muerte neuronal apreciable (Rosovsky *et al.*, 2005; Kremsky *et al.*, 2012) pero poco o nada se sabe al respecto del mecanismo que subyace a esta pérdida.

3.4 Trombospondina 1 (TSP-1)

La trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína de matriz extracelular miembro de una familia de 5 homólogos, cada una codificada por un gen distinto. Las trombospondinas en general, se encuentran entre los pocos genes más expresados en el cerebro de primates y especialmente en el cerebro humano (Cáceres *et al.*, 2006). En el tejido sanguíneo, la TSP-1 se involucra en la agregación plaquetaria, la inflamación y la angiogénesis (Chen *et al.*, 2000, Liauw *et al.*, 2008). En el SNC, la TSP-1 es sintetizada y secretada por los astrocitos particularmente durante el desarrollo (Iruela-Arispe *et al.*, 1993). En modelos murinos, la expresión de TSP-1 durante el desarrollo embrionario es baja, posteriormente (en los primeros periodos posnatales) se eleva y disminuye en el cerebro adulto (Iruela-Arispe *et al.*, 1993; Liauw *et al.*, 2008). La TSP-1 se ha visto involucrada en estimular la proliferación y diferenciación de células progenitoras neuronales (Lu y Kipnis, 2010) y es capaz de inducir sinaptogénesis y dirigir la formación de espinas dendríticas (Christopherson *et al.*, 2005; Eroglu *et al.*, 2009; Risher y Eroglu, 2010; García *et al.*, 2010). Además, los niveles de expresión de TSP-1 en el SNC correlacionan con el periodo sinaptogénico en las primeras 3

semanas posnatales del desarrollo (Christopherson *et al.*, 2005) y diversas evidencias experimentales sugieren que la TSP-1 es capaz de inducir sinaptogénesis a través de la acumulación normal de proteínas de la densidad post-sináptica como la sinapsina y la PSD-95 (Barres, 2008); por lo que la liberación de la TSP-1 derivada de los astrocitos podría explicar la correlación espacio-temporal del desarrollo astrocítico con el desarrollo de las espinas (Bushong *et al.*, 2002; Ullian *et al.*, 2001).

Los déficits de expresión de la TSP-1 afectan el número y la forma de las espinas dendríticas así como la formación de las sinapsis (Christopherson *et al.*, 2009; Eroglu *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010). Christopherson y sus colaboradores (2005), demostraron en un modelo murino que la TSP-1 es capaz de promover adhesión sináptica y dirigir al establecimiento de especializaciones pre y post sinápticas normales; pero tras la delección genética de la TSP-1, se observa una reducción significativa del 30% en la densidad de sinapsis excitatorias. En nuestro laboratorio, demostramos previamente una reducción significativa de la TSP-1 en cerebros de pacientes con SD, misma que podría estar relacionada con la evidencia de la disminución en el número de espinas y sinapsis que se ha observado en los cerebros de individuos con SD (García *et al.*, 2010). De manera interesante la TSP-1 se ha visto asociada a la expresión de la proteína β -amiloide en cerebros de personas con EA (Buée *et al.*, 1993; Cáceres *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009), sugiriendo una relación entre la concentración de TSP-1, la EA y el SD/EA. Resultados parciales no publicados de nuestro laboratorio muestran que los pacientes SD/EA tienen un decremento en los niveles de la TSP-1 en plasma (Hernández-Guzmán *et al.*, 2012). Además, las alteraciones en la expresión de la TSP-1 se han visto asociadas también a padecimientos que se desarrollan durante el envejecimiento, como en la degeneración macular (Uno *et al.*, 2006), desórdenes cerebrovasculares (Meng *et al.*, 2009) y la falla cardíaca (Almen *et al.*, 2011), sugiriendo un papel importante durante el proceso de envejecimiento.

En este trabajo se tratará de determinar si cambios en los niveles de expresión de la TSP-1 en distintas ventanas temporales podrían afectar el desarrollo de las espinas dendríticas, medido a través del marcador de espinas *drebrina*, tratando de establecer alguno de los mecanismos involucrados en la pérdida acelerada de las espinas que se observa en las personas con SD que desarrollan la EA, o durante el envejecimiento fisiológico.

4. Justificación:

El envejecimiento prematuro, la discapacidad intelectual y el desarrollo de la EA, son algunas de las características comunes del SD. Aunque la alteración de las espinas dendríticas puede ser un factor común entre éstas, los mecanismos implicados en este proceso aún son desconocidos.

Debido a la reciente descripción de las alteraciones en expresión de la TSP-1 en patologías asociadas a la edad y su papel en la modulación de las espinas dendríticas y sinapsis, es posible que una alteración en la expresión de la TSP-1 pueda contribuir a la pérdida de las sinapsis y las espinas dendríticas durante el envejecimiento. Un mejor conocimiento sobre los mecanismos celulares implicados en la pérdida de las espinas durante el envejecimiento nos podría ayudar a retrasar la pérdida cognoscitiva o el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas durante el envejecimiento. Adicionalmente este trabajo contribuye a conocer el papel de la TSP-1 en el SNC así como las interacciones neurogliales durante el envejecimiento.

5. Objetivos:

5.1 General:

Conocer el papel de la TSP-1 secretada por los astrocitos en la pérdida de espinas dendríticas durante el envejecimiento.

5.2 Particulares:

*Determinar si los niveles de la TSP-1 disminuyen durante el envejecimiento de los astrocitos

*Determinar si neuronas cultivadas sobre astrocitos envejecidos muestran una pérdida del marcador de Drebrina para las espinas dendríticas.

*Explorar si los niveles de la TSP-1 pueden usarse como un biomarcador de envejecimiento.

6.- Hipótesis:

*Durante el envejecimiento, los astrocitos pierden la capacidad de secretar y/o sintetizar TSP-1, lo cual podría influir en la pérdida de marcadores para las espinas dendríticas.

7. Materiales y Método:

7.1 Cultivos celulares

Astrocitos de hipocampo de 3 ratones de 1-2 días de edad fueron disectados y disociados en suspensión celular mediante la incubación con 0.25% de tripsina/40mg/ml DNAsa (Sigma), en solución salina de Hanks's a 37°C, durante 15 minutos. Posteriormente el tejido cerebral fue disociado mecánicamente con puntas de micro-pipeta. Tradicionalmente las células de la glía y las neuronas se han preparado en los primeros 2-3 días postnatales por varias razones: 1) Las neuronas son menos susceptibles al daño durante la disociación debido a que su soma aun es pequeño y no han extendido arborizaciones dendríticas y axonales elaboradas; 2) a esta edad, las células son menos dependientes de factores tróficos provistos por sus células diana; 3) resulta más sencillo eliminar meninges y tejido conectivo (Banker y Goslin, 1998).

Una vez disociadas las células, fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio circulares 18 mm diámetro (Decgläser) y mantenidas en medio de cultivo DMEM (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bobino (GIBCO), para asegurar su crecimiento hasta confluencia. Los cultivos se mantuvieron durante 10 y 30 Días *In Vitro* (DIV) [A los 30DIV los cultivos son considerados viejos] (Kawano *et al.*, 2012).

Una vez alcanzada la confluencia, los astrocitos fueron utilizados como una alfombra (monocapa) de crecimiento para neuronas hipocampales como se describe en el siguiente apartado.

La identidad y pureza de los cultivos astrocíticos fue confirmada por inmunohistoquímica con anticuerpo anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Proteín), que es una proteína de los filamentos intermedios expresado por la astrogía (Morrison *et al.*, 1985).

7.2 Cocultivos neurogliales de hipocampo

Para generar el cocultivo neuroglial, el hipocampo de 3 ratones recién nacidos (1-3 días) se disectó e incubó con tripsina (0.25%)/DNAsa (0.25%) (Sigma) por 10 minutos y se trituró mecánicamente con una pipeta Pasteur de cristal. Las neuronas disociadas se colocaron directamente sobre las monocapas de astrocitos de 10 y 30 DIV para evaluar el efecto que éstas tenían, sobre el crecimiento neuronal y la formación de sinapsis en el modelo *in vitro*. Como ya se mencionó; las células gliales tienen la capacidad de actuar como fuente de factores neurotróficos solubles, y en la práctica, algunos protocolos para cultivar neuronas del SNC dependen de altas densidades de glía endógena para promover el desarrollo neuronal (Banker y Goslin 1998).

Cuatro horas después de la siembra se cambió el medio para eliminar cualquier residuo de tejido sobrante y células no adherentes en el mismo y se hicieron cambios parciales de medio cada 5 días para asegurar que se supliera a las células con los nutrimentos consumidos en los periodos de crecimiento.

Los cocultivos se mantuvieron 21 DIV para permitir el desarrollo y maduración de espinas dendríticas y sinapsis (García *et al.*, 2010)

7.3 Inmunofluorescencia:

Los cultivos primarios de células astrogliales y cocultivos fueron fijados con una solución de 4% paraformaldehído/sucrosa 0.12 M y PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM y KH₂PO₄ 2mM), usada para mantener un pH constante de 7.4, durante 15 min para preservar la estructura celular.

Una vez fijadas, las células fueron permeabilizadas con 0.2% TritonX-100/PBS por 15 minutos para permitir la entrada de los anticuerpos al interior de las células. Posteriormente, los cocultivos fueron bloqueados por 30 minutos con PBS-Albumina de suero bovino (5%), con la finalidad de prevenir la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos

Finalmente los cocultivos se incubaron con uno o más de los siguientes anticuerpos primarios: GFAP (1:1000; Sigma), marcador de astroglia, anti-tubulin isotype III (1:1000; Sigma), marcador de neuronas, mouse anti-trombospondina-1 (1:250; Santa Cruz Biotechnology), y mouse-anti-debrin (1:250; Enzo lifesciences) marcador de espinas dendríticas, durante 1hr. a temperatura ambiente. Seguido por la incubación con los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa Fluor 488nm (1:500; Invitrogen) y (Alexa Fluor 488 (1:500 Invitrogen) por 30 minutos.

Se utilizó un microscopio de fluorescencia (Zeiss) para la visualización, captura y cuantificación de imágenes de las espinas dendríticas. Las imágenes se capturaron con una cámara digital y se procesaron usando el software *Image Focus 2.0*. (Zeiss).

7.4 Análisis de fluorescencia:

Las intensidades de fluorescencia se analizaron con el Software de análisis de imagen digital de dominio público *Image J versión 1.47*.

Ocho imágenes/fotografías aleatorias se seleccionaron de 7 cultivos diferentes por cada grupo de edad de cultivo (Jóvenes 10DIV; Viejos 30DIV). De cada imagen fueron seleccionadas aleatoriamente 45 regiones de interés (ROI's por sus siglas en inglés, definen una selección de área [cuadrada] en la superficie de cada imagen). En cada ROI se cuantificó el número total de píxeles en escala de grises con cuentas desde 0 a 255 (cada píxel se codifica mediante un conjunto de bits de longitud determinada, de manera que cada píxel admite hasta 256 variaciones de color que van desde 0 a 255 en unidades arbitrarias [u.a.]) generada por el software de análisis de imagen. Se obtuvo la media de los valores de pixel en cada ROI y el total de las intensidades de píxeles de todos los campos seleccionados, por imagen y por grupo de imágenes, se promediaron y se expresaron como la media \pm desviación estándar (Rama *et al.*, 2013).

7.5 Muestras sanguíneas

Con el fin de investigar si los cambios en TSP-1 podrían servir como un posible biomarcador del envejecimiento, se determinaron los niveles de TSP-1 en el plasma de pacientes normales.

Muestras de sangre fueron provistas y procesadas para la obtención de suero por el Centro de Investigación en Alzheimer de la Universidad de Irvine California (UCI-ADRC, por sus siglas en inglés) (protocolo 2008-6454). Se clasificaron 2 grupos: **1)** sujetos normales (**NL**) (*ausencia de patologías*) jóvenes (n=18, rango de edad de 26-40 años, promedio de edad 33 años), **2)** sujetos normales viejos (**NL** viejos) (n=10, rango de edad de 80-98 años, promedio de edad 89 años).

7.6 Medición de TSP-1

Los niveles de TSP-1 fueron determinados del medio condicionado de astrocitos y del plasma sanguíneo, a través de un inmunoensayo de ELISA (R&D systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente este ensayo consistente en inmovilizar un antígeno para detectarlo mediante el uso de un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable y hacer la cuantificación. Los niveles de TSP-1 se obtuvieron a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de TSP-1 y los resultados se expresaron como ng/ml (García *et al*, 2010).

7.7 Análisis estadístico:

Todos los experimentos *in vitro* fueron repetidos 3-7 veces usando cultivos de diferentes especímenes.

Los datos de concentración de TSP-1 se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiple Tukey-Kramer (Software: PRISM versión 5 para Windows).

Los datos del análisis de fluorescencia se analizaron usando una prueba T-student (Software: PRISM versión 5 para Windows) utilizando las medias de los valores de intensidad de píxeles.

Todos los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar y se evaluó su significancia con una $p < 0.05$.

8. Resultados:

Los cultivos de astrocitos de hipocampo fueron sembrados y dejados crecer durante 3,6,10,15,30 y 60 DIV con el fin de observar cambios morfológicos y evaluar su supervivencia *in vitro*. Los astrocitos fueron capaces de crecer y alcanzar la confluencia a los 10 DIV. Durante los primeros días los astrocitos crecen y presentan cambios morfológicos progresivos. A los 6 DIV se observa una extensión de procesos finos, después de los 10 DIV se observa la formación de procesos gruesos característicos de astrocitos maduros (McCarthy y De Vellis, 1980), entre los 10 -15 DIV la mayoría de los cultivos alcanzan la confluencia. El cambio de medio permitió que los astrocitos pudieran sobrevivir hasta los 60 DIV.

En este trabajo se utilizaron cultivos de 30DIV que han sido considerados como cultivos de astrocitos viejos (Kawano et al., 2012) [Fig.6].

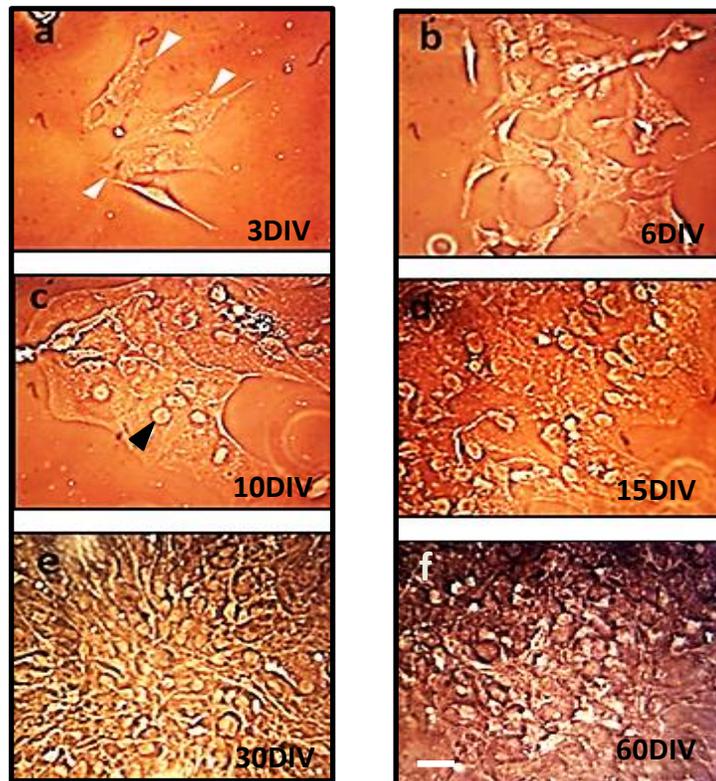


Fig6.- Cultivos de astrocitos corticales – La fotografía muestra el desarrollo de astrocitos de corteza de rata desde los 3 DIV (a) hasta los 60 DIV (f) observados con el objetivo de 20X. A los 10 DIV (c) los astrocitos llegan a la confluencia y pueden permanecer así hasta los 60DIV. (Las cabezas de flecha blancas en a señalan astrocitos individuales, la cabeza de flecha negra en C señala el núcleo de astrocito individual). Barra de escala = 40µm.

8.1 Los astrocitos viejos expresan GFAP

La identidad de los astrocitos en cultivo fue determinada con base en la Inmunofluorescencia para la “Proteína Fibrilar Acídica de la Glía” (**GFAP**); que es una proteína de los filamentos intermedios expresada por los astrocitos (Morrison *et al.*, 1985).

La GFAP fue expresada desde los 10 DIV y su expresión incrementa conforme el cultivo envejece [fig.7]. Un análisis de intensidad de fluorescencia indica que, los astrocitos viejos (30 DIV) expresan éste marcador cerca de un 42% más (27 ± 1.41 u.a.) con respecto a los astrocitos jóvenes (10 DIV) (19.02 ± 1.67 u.a.). Las diferencias son estadísticamente significativas [$t=3.64$; $gl=268$; $p < 0.0001$].

El incremento en la expresión de GFAP es una característica de cerebros envejecidos (Sabatinni *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005; Pertrusa *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2010; Kremisky *et al.*, 2012).

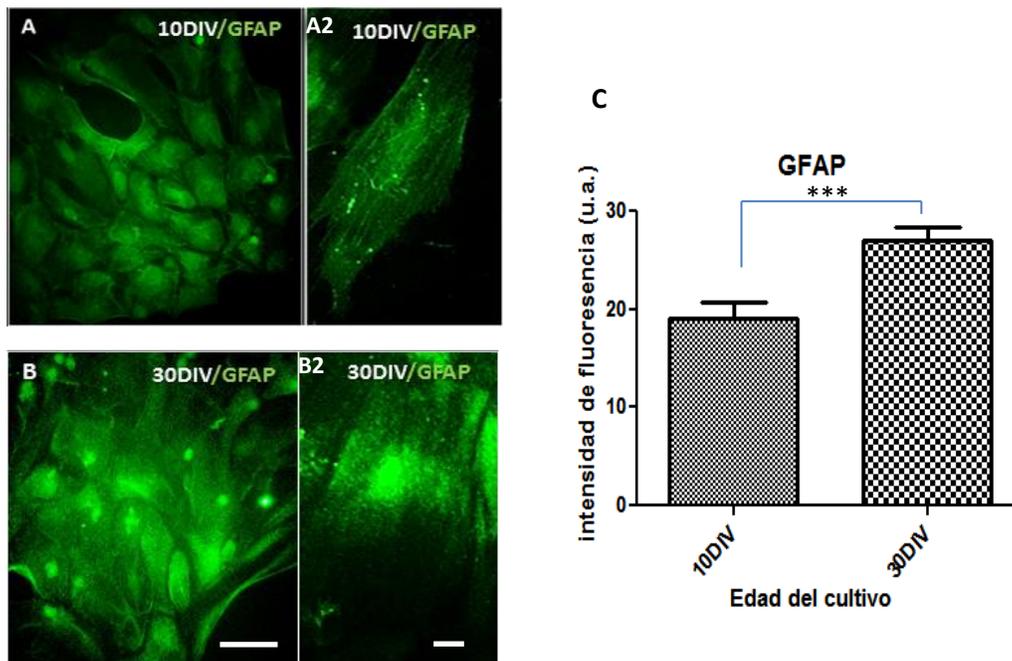


Fig 7. Astrocitos viejos expresan en mayor proporción el marcador para GFAP. A) Astrocitos de 10 DIV observados con un objetivo de 20X (A) y 40X (A2). B) Astrocitos de 30 DIV observados con un objetivo de 20X (B) y 40X (B2). Barra de escala A y B (20X)=20 μ m; A2 y B2 (40X)=10 μ m C) Cuantificación de intensidad de fluorescencia; los cultivos viejos expresan en un 42% más el marcador para GFAP (27.0 ± 1.4 u.a.) con respecto a los cultivos jóvenes (19.0 ± 1.7 u.a.). Las mediciones fueron hechas en 7 cultivos diferentes para cada una de las edades mostradas. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas con un nivel $P < 0.0001$.

8.2 Los astrocitos viejos expresan bajos niveles de TSP-1

La TSP-1 es una proteína sintetizada y expresada por los astrocitos humanos (Asch *et al.*, 1986). Su expresión es alta durante las primeras etapas del desarrollo (Eroglu 2009), sin embargo, su expresión durante el envejecimiento ha recibido poca atención.

Con el fin de determinar la expresión de TSP-1 durante el envejecimiento, se realizó una inmunocitoquímica contra TSP-1 en cultivos jóvenes (5 DIV) y cultivos viejos (30 DIV). Los resultados muestran altos niveles de TSP-1 en los cultivos de 5 DIV ($61.5 \text{ u.a} \pm 0.93$). Sin embargo, después de 30 DIV los niveles de TSP-1 disminuyen notoriamente hasta en un 31% ($21.6 \pm 0.69 \text{ u.a.}$). Las diferencias son estadísticamente significativas [$t=34.3$; $gl=190$; $p < 0.0001$].

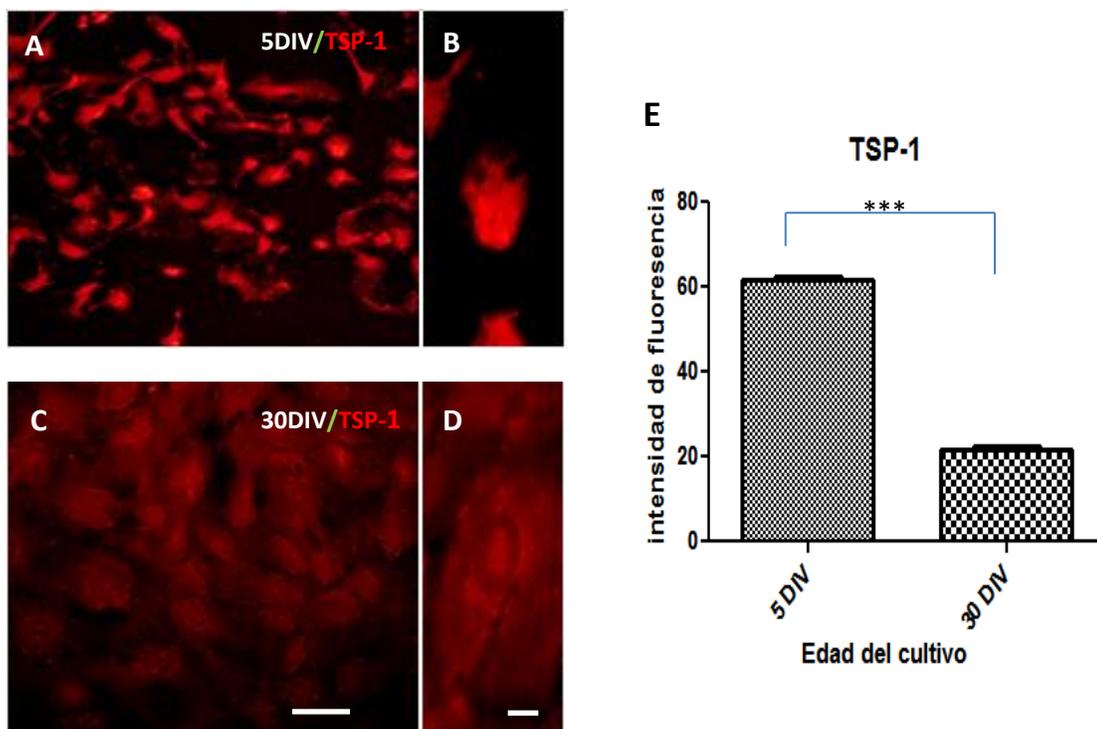


Fig.8- Niveles de TSP-1 sintetizada por los astrocitos de 5 y 30 DIV. A y C) Cultivos de 5 DIV y 30 DIV expresan marcador TSP-1 [Objetivo 10X]. B) Núcleo de astrocito individual en la misma preparación que (A) [objetivo 40X]. D) Núcleo de astrocito individual en la misma preparación que (C) [objetivo 40X]. Barra de escala A y C = 20µm; B y D= 10 µm. E) Cuantificación de intensidad de fluorescencia. Los cultivos viejos expresan un 31% menos el marcador para TSP-1($21.6 \pm 0.6 \text{ u.a.}$) con respecto a los cultivos jóvenes ($61.5 \pm 0.9 \text{ u.a.}$). Las mediciones fueron hechas en 7 cultivos diferentes para cada una de las edades mostradas. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas con un nivel $p < 0.0001$

8.3 La secreción de TSP-1 disminuye durante el envejecimiento de los cultivos celulares.

Con el fin de determinar si los cambios observados en la expresión de TSP-1 tienen también un efecto sobre su secreción, los niveles de TSP-1 fueron determinados en el medio condicionado por los astrocitos (MCA) de 5, 15 y 30 DIV, mediante un inmunoensayo de ELISA.

Los resultados muestran que a los 5 DIV, el MCA tiene una concentración de 44.66 ± 7.34 ng/ml; diez días después (15 DIV), los cultivos reducen en un 90% esta concentración y a los 30 DIV llegan a disminuir hasta en un 95% los niveles de la TSP-1. Estos datos sugieren que la expresión y secreción de la TSP-1 disminuye significativamente [$F=215.3$; $gl=2$] conforme los astrocitos envejecen.

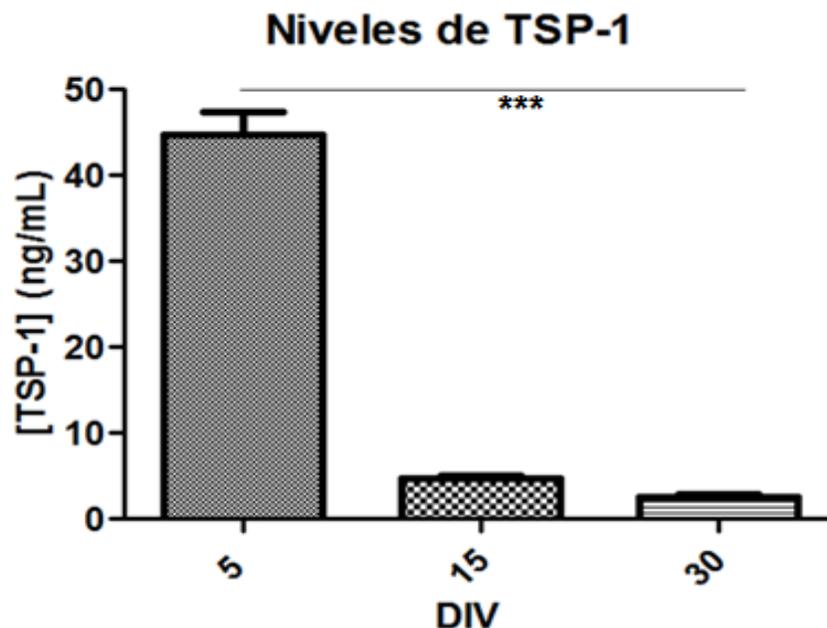


Fig.9- Niveles de TSP-1 medidos en MCA a diferentes edades de cultivo. Las barras representan el promedio de la concentración de TSP-1 \pm el error estándar; a diferentes edades del cultivo: **5 DIV** (44.66 ± 7.1 ng/ml), **15 DIV** (4.70 ± 1.0 ng/ml); **30 DIV** (2.52 ± 1.0 ng/ml). Las mediciones fueron hechas en 7 cultivos diferentes para cada una de las edades mostradas. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas con un nivel $P < 0.0001$.

8.4 Los astrocitos viejos son capaces de mantener a las neuronas en desarrollo.

Los astrocitos son una fuente de factores neurotróficos solubles y sirven de soporte para promover el desarrollo y mantenimiento de las neuronas (Banker y Goslin,1988). Nosotros previamente demostramos que las neuronas pueden crecer sobre astrocitos obtenidos de tejido fetal cerebral con SD (García et al., 2010). Con el fin de determinar si las neuronas son capaces de crecer sobre monocapas de astrocitos envejecidos, neuronas derivadas de hipocampo de ratas de 1-3 días de edad fueron sembradas sobre cultivos jóvenes (10 DIV) y viejos (30 DIV) de astrogliá. Bajo estas condiciones las neuronas se dejaron crecer por 21 días. Después de este periodo las neuronas muestran un crecimiento y extensión de procesos neuronales que pueden conectarse entre sí y no se observa un daño aparente en el soma o los procesos celulares.

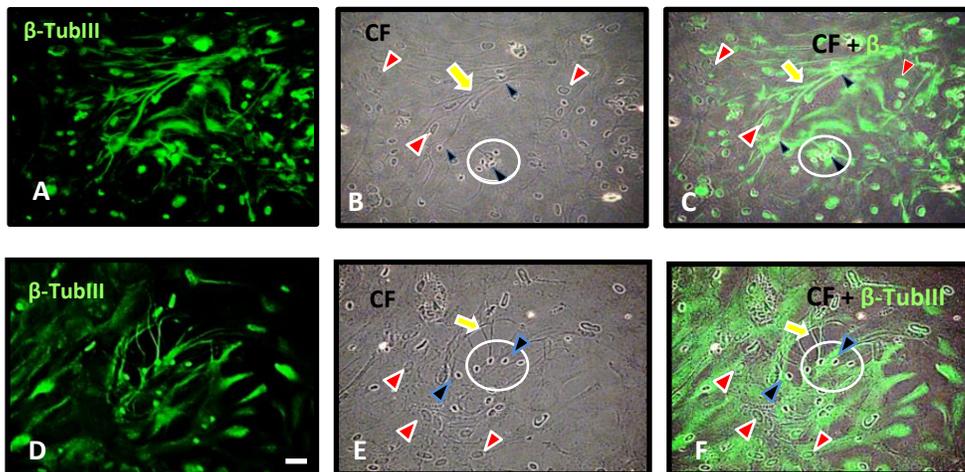


Fig.10.- Los cultivos de astrogliá 10 DIV y 30 DIV son capaces de permitir el crecimiento neuronal. A - C) Cocultivo 10 DIV; D - F) Co-cultivo 30 DIV. A y D) Imágenes de Fluorescencia con marcador anti β -Tubulin III. B y E) Contraste de fases (CF) sobre la misma sección que en A y D; se aprecian los núcleos de astrocitos y prolongaciones de neuronas. C y F) Sobreposición de imágenes (FLUORESENCIA + CF) (se aprecian en verde los procesos neuronales encima de la monocapa de astrocitos). (Cabezas de flecha rojas= núcleos de astrocitos; puntas de flecha Negras= Núcleos de neuronas; Flechas amarillas = procesos neuronales; Circunferencia= Grupos de núcleos neuronales). Barra de escala = 40 μ m.

8.5 Las neuronas que crecen sobre astrocitos viejos muestran una disminución de espinas dendríticas.

La drebrina es una proteína de unión a actina que se involucra en el desarrollo del SNC; la isoforma A se relaciona directamente con la maduración sináptica y se expresa de manera restringida en las neuronas y preferencialmente en las espinas dendríticas de las neuronas maduras (Sekino *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008; Aoki *et al.*, 2005), regulando su morfología (Mizui *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006).

Con el fin de evaluar los posibles efectos de la disminución de la secreción de TSP-1 en la formación de espinas dendríticas, los niveles de drebrina fueron estimados mediante un análisis de fluorescencia en neuronas cocultivadas sobre monocapas de astrocitos jóvenes (10 DIV) y viejos (30 DIV). Los resultados muestran que, las neuronas sembradas sobre los cultivos viejos presentan una disminución en el marcaje con drebrina de hasta un 75% (5.01 ± 0.30 u.a.), comparado con las neuronas sembradas sobre los astrocitos jóvenes (20.75 ± 0.74 u.a.), [$t=20.23$; $gl=359$] (Fig. 11).

Estos resultados sugieren que la disminución de TSP-1 que se observa durante el envejecimiento de los astrocitos puede afectar el mantenimiento de las espinas dendríticas en las neuronas.

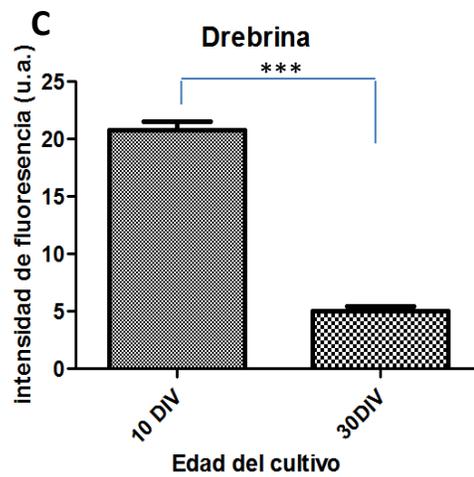
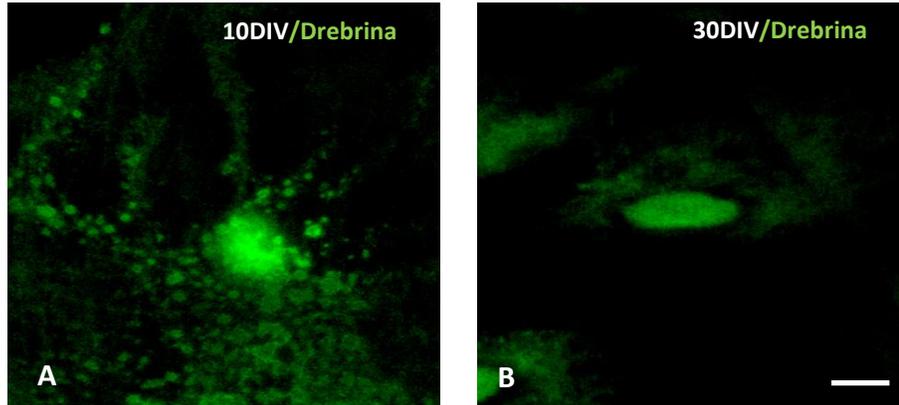


Fig11.-Disminución de 'Drebrina', un marcador de espinas dendríticas, en las neuronas que crecen sobre astrocitos viejos. A) Neurona creciendo sobre astrocitos de 10 DIV **B)** Neurona creciendo sobre astrocitos de 30 DIV [Objetivo 40X]. **C)** Cuantificación de intensidad de fluorescencia. Las neuronas sobre cultivos viejos expresan un 75% menos el marcador para drebrina (20.75 ± 0.74 u.a.) con respecto a las sembradas sobre cultivos jóvenes (5.01 ± 0.30 u.a.). Las mediciones fueron hechas en 7 cultivos diferentes para cada una de las edades mostradas. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas con un nivel $p < 0.0001$. Barra de escala = $10\mu\text{m}$.

8.6 Niveles de TSP-1 en sangre disminuyen con el envejecimiento.

Como se mencionó anteriormente, la TSP-1 es una proteína de matriz extracelular implicada en diversos procesos de desarrollo. En sangre, la TSP-1 es secretada por los gránulos α -plaquetarios (Smirnova y Festoff, 1994) y participa en procesos de cicatrización, apoptosis, inflamación, adhesión y migración celular (Chen *et al.*, 2000). Alteraciones en los niveles de TSP-1 ocurren en diferentes condiciones patológicas como la degeneración macular, desordenes cerebrovasculares, la falla cardíaca, esclerosis lateral amiotrófica y el SD. (Smirnova y Festoff, 1994; Uno *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010; Almen *et al.*, 2011), lo que sugiere que podría ser usada como marcador de ciertos desórdenes. Nosotros previamente demostramos que la expresión de TSP-1 en células cerebrales normales es alta (García *et al.*, 2010), lo que indica que el SNC es una fuente significativa de TSP-1. Por lo tanto, cambios en los niveles de TSP-1 en el cerebro podrían verse reflejados en los niveles de TSP-1 de sangre (suero o plasma).

Con el fin de explorar si los cambios en TSP-1 observados en los astrocitos, se pueden observar en la sangre, se determinaron los niveles de TSP-1 en el suero de personas adultas normales (*en ausencia de patologías*) jóvenes (rango de edad 26-42 años; n=12) y viejos (rango de edad de 80 a 97 años; n=10). Los resultados parciales sugieren que las concentraciones de TSP-1 en suero disminuyen significativamente durante el envejecimiento normal (Fig.12). De manera interesante, personas con SD con probable demencia tipo EA (promedio de edad 93.5 años) muestran una reducción, aunque no significativa, en los niveles de TSP-1 (Hernández Guzmán *et al.*, 2012).

Estos resultados sugieren un potencial uso de la TSP-1 como biomarcador del envejecimiento y patología.

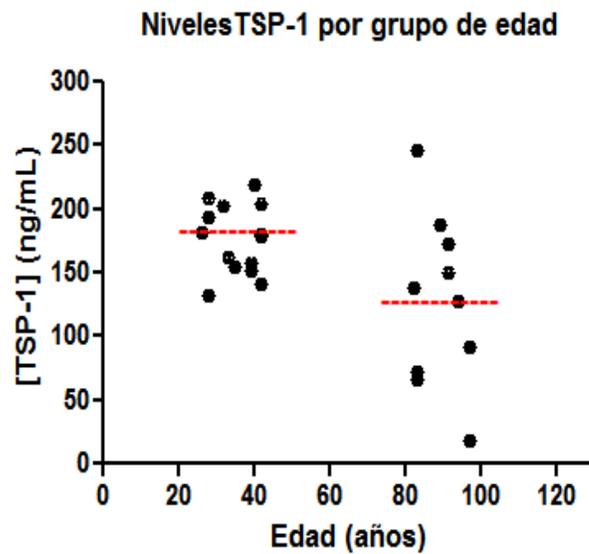


Fig.12. Niveles de TSP-1 en suero en personas jóvenes y de avanzada edad. El grupo de personas jóvenes muestra un promedio de 180.7 ± 25.45 ng/ml; las personas viejas un promedio de 127.0 ± 66.86 ng/ml, en los niveles de TSP-1. El análisis estadístico muestra una disminución significativa [$U= 23.00$; $p=0.026$] en los niveles de TSP-1 en personas de edad avanzada.

9. Discusión:

Las neuronas han sido el objeto principal de estudio en la neurobiología del envejecimiento, debido a sus complejas propiedades de excitabilidad eléctrica y la evidente importancia de su pérdida y patología en el desarrollo de los déficits conductuales y cognoscitivos que se observan durante el envejecimiento. Sin embargo, los estudios más recientes han demostrado que los déficits asociados a éstas condiciones no se relacionan directa y únicamente con una pérdida neuronal (Morrison y Hof, 1997; West *et al.*, 2004; Dickstein *et al.*, 2007) sino que se relacionan con alteraciones en la conectividad, especialmente la pérdida de espinas dendríticas y sinapsis (Barnes, 1994; Jacobs *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2003; Hof y Morrison 2004; Dickstein *et al.*, 2007). En los últimos años, por ejemplo, diversas evidencias experimentales han demostrado que los astrocitos son capaces de regular el desarrollo, movilidad y estabilidad de las espinas dendríticas así como la sinaptogénesis (Hansson y Ronnback, 2003; Nishida y Okabe, 2007; Slezak y Pfrieder, 2003,2006), a través de la liberación de factores solubles como la TSP-1 y por la interacción física con las neuronas (Haber *et al.*, 2006; Nishida y Okabe, 2007). Sin embargo, el papel de los astrocitos durante el envejecimiento celular y su relación con la pérdida de espinas dendríticas ha recibido poca atención.

En el presente trabajo se evaluó, mediante el uso de un sistema *in vitro*, el efecto del envejecimiento astrocítico sobre la secreción de la TSP-1 y el impacto que ésta puede tener sobre la pérdida de espinas dendríticas. Nuestros resultados muestran que los astrocitos en los cultivo son capaces de sobrevivir hasta por 60 DIV (fig.6). Conforme el cultivo envejece no se observaron alteraciones morfológicas evidentes; sin embargo se incrementó la expresión de GFAP. El incremento de la expresión de GFAP, así como de S-100 β , es una característica que se observa en cerebros envejecidos de roedores y humanos (Sabatinni *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005; Pertrusa *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2010; Kremsky *et al.*, 2012). La sobreexpresión de GFAP y S-100 β se han utilizado como índice de envejecimiento astrocítico. La inhibición de la sobreexpresión de GFAP durante el

envejecimiento favorece el crecimiento neurítico, sugiriendo que la sobreexpresión de GFAP está involucrada en la disminución de factores tróficos durante el envejecimiento (Rozovsky *et al.*, 2005; Pertrusa *et al.*, 2007). De manera interesante, en el curso de patologías como el Alzheimer, el incremento en los niveles de GFAP se relaciona directamente con la neurodegeneración (Simpson *et al.*, 2010). El mecanismo por el cual se incrementa la expresión de GFAP no se conoce aún, aunque se sugiere que la acumulación progresiva de cambios oxidativos podría estimular su transcripción, mediada por el elemento de respuesta NF-1 (Rozovsky *et al.*, 2005). La sobreexpresión del marcador GFAP con la edad, y la consecuente atenuación de factores que permiten el crecimiento neuronal podrían ser un factor importante para el desarrollo de la neurodegeneración observada en el envejecimiento normal y en la EA asociada al SD (Patterson y Costa, 2005; Patterson, 2007).

En el SNC, la TSP-1 es liberada principalmente por los astrocitos durante el desarrollo (Asch *et al.*, 1986; Eroglu, 2009) y se ha visto involucrada en estimular la proliferación y diferenciación de células progenitoras neuronales (Lu y Kipnis, 2010), en la inducción de la sinaptogénesis y la formación de espinas dendríticas *in vivo* (Christopherson *et al.*, 2005; Eroglu *et al.*, 2009; Risher y Eroglu, 2010; García *et al.*, 2010). La delección genética de la TSP-1 tiene como consecuencia una reducción significativa en el número de sinapsis (Christopherson *et al.*, 2005) y una alteración en el número y morfología de las espinas (García *et al.*, 2010).

Los resultados de este trabajo demuestran que la expresión y secreción de TSP-1 es muy alta durante los primeros 5 DIV; sin embargo, a partir de los 10 DIV empieza a disminuir hasta 30% la expresión y un 90% su secreción. El presente trabajo muestra que la secreción y síntesis de ésta proteína se restringe a los primeros días de vida del cultivo, desapareciendo casi completamente a los 10-15 DIV, y que ésta disminución coincide con el incremento de la expresión del marcador de envejecimiento astrocítico GFAP. Estas observaciones son consistentes con las realizadas en tejido de roedores, donde la expresión de TSP-1 se eleva en los primeros días postnatales y disminuye en el cerebro adulto

(Iruela-Arispe *et al.*, 1993; Christopherson *et al.*, 2005). Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual disminuye la TSP-1 durante el envejecimiento. Recientemente, en un estudio realizado por Chen *et al.* (2011), se determinó que la acumulación de estrés oxidativo es capaz de reducir la cantidad de TSP-1 mRNA y proteína en cultivos de astrocitos. En otro estudio Rama *et al.* (2013), utilizando un modelo *in vitro* similar al de este trabajo, se reportó una disminución en la secreción de TSP-1 por los astrocitos, después del tratamiento del cultivo con el péptido beta amiloide (A β 1-42), misma que pudo atenuarse al tratar los cultivos con agentes antioxidantes, lo que sugiere fuertemente una relación entre el estrés oxidativo y la incapacidad de los astrocitos para sintetizar y secretar TSP-1.

El estrés oxidativo celular es un fenómeno en el cual el equilibrio que existe entre especies con radicales libres y los sistemas que las contrarrestan se pierde (Halliwell, 2007). Existen reportes que indican que en las personas de edad avanzada el nivel de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) se encuentra disminuido (Rodríguez y Céspedes 1997). En concordancia con estos estudios se ha demostrado también que en cultivos de astrocitos envejecidos sucede una elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que es subsecuente a la pérdida de su capacidad de defensa antioxidante, y que tiene como resultado alteraciones metabólicas y déficits energéticos que impactan negativamente en la función neuronal (Pertrusa *et al.*, 2007); Adicionalmente, se sabe que los astrocitos SD presentan déficits metabólicos que podrían exacerbar el estrés oxidativo (Helguera *et al.*, 2013). Por otra parte, la proteína β -amiloide sobre expresada en cerebros EA y SD, es capaz de inducir la producción de estrés oxidativo, posiblemente mediante la producción excesiva de superóxido (Butterfield, 2002). Nosotros previamente hemos observado una disminución importante de TSP-1 en los cerebros de personas con síndrome de Down (García *et al.*, 2010), esta condición podría asociarse a nivel molecular con el desarrollo de placas amiloides y el incremento en el estrés oxidativo (Lott y Head, 2001; Antonarakis *et al.*, 2004; Webb y Murphy, 2011) y a nivel estructural con la alteración de la morfología de las espinas dendríticas y la

reducción en su densidad, lo que genera una neuropatología similar a la que ocurre durante el envejecimiento y que se traslapa considerablemente con la patología de la EA por vías de un envejecimiento prematuro (Lott y Head, 2001; Antonarakis *et al.*, 2004; Webb y Murphy, 2011).

Todo lo anterior sugiere que durante el envejecimiento normal o patológico (p.ej. en el envejecimiento con SD) los astrocitos pueden presentar diversas alteraciones metabólicas y pérdida de la capacidad de defensa antioxidante, que dirigen a déficits en la secreción de moléculas, entre ellas la TSP-1, lo que podría afectar el mantenimiento de las espinas dendríticas, contribuyendo a su vez al deterioro cognoscitivo observado durante el envejecimiento. Experimentos en progreso están siendo dirigidos para explorar la participación del estrés oxidativo en la disminución de TSP-1 durante el envejecimiento (Helguera *et al.*, 2013).

Consecutivo a los experimentos anteriores y con el fin de evaluar los posibles efectos de la disminución en la secreción de TSP-1 en la aparición de un marcador de espinas dendríticas, fue cuantificada la expresión de la drebrina en las neuronas que crecían encima de astrocitos envejecidos. Los resultados muestran que los niveles de drebrina disminuyen notablemente (75%). La drebrina es una proteína de unión y regulación de los filamentos de actina que se involucra en el desarrollo del SNC, la isoforma A se relaciona directamente con la maduración sináptica y se expresa de manera restringida en las neuronas y preferencialmente en las espinas dendríticas de las neuronas maduras (Aoki *et al.*, 2005; Sekino *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008) regulando su morfología y función (Takahashi *et al.*, 2003; Mizui *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006); además se ha reportado una disminución significativa de la drebrina en cerebros de pacientes con EA y SD (Shim y Lubec 2002). Se ha sugerido que la pérdida de esta proteína puede ser responsable de la pérdida de la plasticidad y de la morfología anómala de las espinas, mediada por una desorganización de la dinámica de los filamentos de actina en desordenes neurodegenerativos, causando afección de las funciones cognoscitivas (Shim y Lubec 2002; Kojima *et al.*, 2010). El rearrreglo del citoesqueleto de actina juega un rol determinante en la formación y

remodelamiento sináptico, y se ha visto ligado particularmente a la formación de las especializaciones post-sinápticas de las conexiones excitatorias (Svitkina *et al.*, 2010).

Recientemente se identificó el receptor neuronal que media la sinaptogénesis inducida por trombospondina como el receptor a gabapentina $\alpha 2\delta$ -1, una subunidad accesoria de canales de calcio dependientes de voltaje (Eroglu, *et al.*, 2009). Se ha propuesto que la unión de la TSP-1 a su receptor en la membrana post-sináptica puede actuar como un “switch” para la iniciación de la formación de espinas dendríticas (Bolton y Eroglu, 2009), quizás mediante el control regulatorio de GTPasas de la familia Rho y la activación de vías de transducción de señales que finaliza en el reclutamiento de proteínas de andamiaje y adhesión, que traen como consecuencia la reorganización del citoesqueleto en las espinas (Tashiro y Yuste, 2004) aunque el mecanismo exacto se desconoce. Coincidente con lo anterior, Rama *et al.*, (2013), demostraron que una disminución en la secreción de TSP-1 por los astrocitos produce una pérdida notoria de un marcador post sináptico universal: la PSD-95 (proteína de andamiaje) y de un marcador pre-sináptico: sinaptofisina. Nuestros resultados apoyan esta idea y sugieren que durante el envejecimiento, la pérdida de marcadores de las espinas dendríticas y sinapsis es un evento ubicuo relacionado con la pérdida de factores que regulan su aparición, como lo es la TSP-1.

Nosotros previamente demostramos que el cerebro es una fuente importante de TSP-1 (García *et al.*, 2010), por lo que cambios en los niveles de TSP-1 en el cerebro podrían verse reflejados en los niveles de TSP-1 medidos en sangre. Con el fin de investigar si los cambios de TSP-1 podrían ser detectados en sangre, se evaluaron las concentraciones de TSP-1 en suero de sujetos normales jóvenes, y viejos. Los resultados muestran que, de manera similar a los datos obtenidos en cultivo, las concentraciones de TSP-1 en suero disminuyen en los sujetos de mayor edad y, adicionalmente, hemos observado que personas con SD/EA tienden a disminuir los niveles de TSP-1 en suero (Hernández-Guzmán *et al.*, 2012) lo que sugiere que con el envejecimiento existe una pérdida global en los

niveles de TSP-1 que pueden ser medidos directamente en sangre y utilizados como un biomarcador del envejecimiento. El uso de un marcador de patología nerviosa en sangre, abriría la posibilidad a procedimientos de detección no invasiva al evaluar alteraciones asociadas a los cambios neuroanatómicos durante el envejecimiento normal y patológico.

Estos resultados en conjunto, indican que durante el envejecimiento existen alteraciones metabólicas en los astrocitos que dirigen a la pérdida de la capacidad de síntesis y secreción de TSP-1 aunque estas alteraciones aún tienen un origen desconocido que espera ser revelado; más aún, dicha pérdida puede a su vez contribuir de manera importante a la pérdida de marcadores de espinas dendríticas como la drebrina. Esto podría ser indicativo de la pérdida de espinas dendríticas que, en un sistema vivo, podría producir las alteraciones en la función neuronal que se traslapan considerablemente con las de condiciones patológicas que dirigen a demencia o a disfunción intelectual, como la EA y la EA asociada al SD; aunque los mecanismos de acción aún esperan ser revelados.

10. Conclusión:

Hasta el momento, debido a la complejidad que supone su estudio, no existe información exacta con respecto a los mecanismos por medio de los cuales proceden los cambios neuroanatómicos y funcionales observados durante el envejecimiento normal y patológico, por lo que se requiere de un mejor conocimiento sobre los mecanismos celulares implicados. Debido a que virtualmente cada uno de los aspectos del desarrollo y función del cerebro involucran una relación neurona-glía, y al hecho de que se ha propuesto que desde una perspectiva fisiológica el envejecimiento cerebral consiste en una pérdida progresiva de la reserva homeostática neuronal, sin que suceda muerte neuronal (Toescu y Verkhratsky, 2003); la respuesta a importantes preguntas acerca de la función tanto normal como patológica del cerebro puede también involucrar a la glía. Así mismo, el hecho de que los patrones de envejecimiento, se traslapen considerablemente con los de condiciones más severas que dirigen hacia la disfunción intelectual por demencia o el retraso mental como en el SD (Fiala et al., 2002), ha llevado a sugerir la existencia de mecanismos similares que perturban una vía común del desarrollo en el SNC (Kaufmann y Mosser, 2000; Fiala y Spaceck, 2002).

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que durante el envejecimiento normal existen alteraciones en la función astrogliar capaces de afectar directamente la función neuronal al incidir sobre los mecanismos que permiten la formación y el mantenimiento de las espinas dendríticas; dichas alteraciones pueden estar directamente relacionadas con la acumulación de estrés oxidativo que a su vez interfiere con la capacidad de los astrocitos para secretar y sintetizar a la TSP-1.

El incremento de GFAP, y la disminución de marcadores sinápticos como la drebrina así como la pérdida de la capacidad de síntesis y secreción de TSP-1 durante el envejecimiento fisiológico de los astrocitos, podrían ser un sustrato

molecular común a las alteraciones cognitivas asociadas también a la patología, sin embargo es necesario profundizar en el mecanismo de acción.

En este trabajo, se propone a la TSP-1 como un importante *blanco* molecular de estudio al evaluar las alteraciones asociadas a los cambios neuroanatómicos durante el envejecimiento normal y patológico. Deberán plantearse experimentos a futuro para evaluar la respuesta de secreción de la TSP-1 en los astrocitos ante diversos tipos de daño oxidativo, y determinar las posibles vías que alteran la síntesis y secreción del péptido. Adicionalmente se deben incrementar los estudios para determinar si los niveles de TSP-1 en suero pueden ser usados efectivamente como un biomarcador de envejecimiento y/o patología dendrítica, y si éstos a su vez, pueden utilizarse como índice de las alteraciones cognitivas asociadas.

“Cada vez que miro al MICRO-scopio me encuentro un MACRO mundo”

(DAHG)

"He sido un hombre afortunado en la vida: nada me resultó fácil"

(S.Freud)

“La ciencia biológica [...] es realmente un dominio de infinitas posibilidades, debemos esperar de ella los más sorprendentes esclarecimientos y no podemos adivinar que respuestas dará, dentro de algunos decenios, a los problemas por nosotros planteados. Quizás sean dichas respuestas tales que echen por tierra nuestro artificial edificio de hipótesis”.

(S.Freud)

11. Referencias:

1. Aakalu G., Smith B., Nguyen N. Jiang C., Schumman E. (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron*. 30: 489-502.
2. Almen G., Verhesen W., Van Leeuwen R., van de Vrie M., Eurlings C., Schellings M., Swinnen M., Vleutjens J., van Zandvoort., Heymans S., Schroen B. (2011) Micro RNA-18 and micro RNA-19 regulate CTGF and TSP-1 expression in age-related heart failure. *Aging Cell*. 10: 769-779.
3. Alvarez V., Sabatini B. (2007) Anatomical and Physiological plasticity of dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*. 30:79-97.
4. Antonarakis S., Lyle R., Dermitzakis E., ReymondA, Deutsch S. (2004). Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nature Review Genetics*. 5: 725-738.
5. Anwar A., Walker J., Frier B., (1998) Type I diabetes mellitus and diabetes mellitus and Down's syndrome: Prevalence, management and diabetic complications. *Diabetic Medicine*. 15: 160-63.
6. Aoki C, Sekino Y, Hanamura K, Fujisawa S, Mahadomrongkul V, Ren Y, Shirao T (2005) Drebrin A is a postsynaptic protein that localizes in vivo to the submembranous surface of dendritic sites forming excitatory synapses. *Journal of Comparative Neurology*. 483:383–402.
7. Araque A., Parpura V., Sanzgiri RP., Haydon PG. (1999) Tripartite synapses:glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neuroscience*. 22(5):208-15.
8. Araya R., Jiang J., Eisenthal K., Yuste R. (2006) The spine neck filters membrane potentials. *Proceedings of Natural Academic of Sciences*. 103(47):17961-17966.
9. Bai L., Standaert D., Xing Y., Nelson S., Young A., Manusson K. (2004) Changes in the expression of the NRB2 subunit during aging in macaque monkeys. *Neurobiology of Ageing*. 25:201-208.
10. Bailey C., Kandel, E. (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annual Reviews Physiology*. 55, 397–426
11. Baloyannis S. (2009) Dendritic pathology in Alzheimer´s disease. *Journal of the Neurological Sciences*.153-157.
12. Banker G., Goslin K. (1998) Culturing Nerve cells. 2a edición. USA. MIT Press.
13. Barnes C. (1988) Ageing and the physiology of spatial memory. *Neurobiology of ageing*. 9:563-568.
14. Barres, B. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*. 60(3), 430-440.
15. Bass N., Hess H., Pope A., Thalheimer C., (1971) Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia and DNA in rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*. 143(4):481-90.
16. Beattie E., Stellwagen D Morishita W., Bresnahan J.C., Ha B., Zastrow M.B., Beattie M.S., Malenka R. (2002) Control of Synaptic Strength by Glial TNF α . *Science*. 295: 2282-2285.
17. Belichenko P., Kleschevnikov A., Salehi A., Epstein C., Mobley W. (2007) Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: Exploring genotype-phenotype relationships. *The Journal of Comparative Neurology*. 504: 329-345.
18. Belichenko P., Masliah E., Kleschevnikov A., Villar A., Epstein C., Salehi A., Mobley W. (2004) Synaptic structural abnormalities in Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *The Journal of Comparative Neurology*. 480:281-298.
19. Bernhardt M., (2005) Envejecimiento: cambios bioquímicos y funcionales del sistema nervioso central. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*. 43(4): 297-304.

20. Bloss E., Morrison J., Hof P., Dickstein D. (2011) Influence of ageing and neurodegeneration on dendritic spine morphology. *Translational Neuroscience*. 2(1):49-60.
21. Bolton M., Eroglu C. (2009) Look who is weaving the neuronal web: glial control of synapse formation. *Cuurrent Opinion in Neurobiology*. 19: 491-497.
22. Bueé L, Hof P, Roberts D, DelacourteA, Morrison J, Fillit H.(1993) Immunohistochemical Identification of Thrombospondin in Normal Human Brain and in Alzheimer's Disease. *American Journal of Pathology* .141(4):783-788.
23. Busciglio J., Pelsman A., Wong C., Pigino G., Yuan M., Mori H., Yanker B.A., (2002) Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron*. 33(5):677-88
24. Bushong E., Martone M., Jones Y., Ellisman M. (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 occupies separate anatomical domains. *The Journal of Neuroscience*. 22(1):183-192.
25. Butterfield D.A., (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity:implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free radical research*.36:1307-13.
26. Cáceres M., Suwyn C., Maddox M., Thomas J.W., Preuss TM. (2007) Increased cortical expression of two synaptogenic thrombospondins in human brain evolution. *Cerebral Cortex*. 17:2312—2321.
27. Carnicer J., Farre C., Varea V., Vilar P., Moreno J., Artigas J. (2001) Prevalence of coeliac disease in Down's syndrome. *European Journal of Gastroenterology and Hematology*. 13; 263-67.
28. Cash S., Yuste R. (1999) Linear summation of excitatory inputs by CA1 piramidal neurons. *Neuron*. 22(2):383-94.
29. Chang Y., Rosene D., Killiany R., Mangiamele R.,Luebke J.(2005) Increased action potential firing rates of layer 2/3 pyramidalcells in the prefrontal cortex are significantly related to cognitive performance in aged monkeys. *Cerebral Cortex*. 15: 409-418.
30. Chen H., Herndon E., Lawler J. (2000) The cell biology of Thrombospondin-1. *Matrix Biology* 19: 597-614.
31. Chen H., Herndon M.E., Lawler J. (2000) The cell biology of Thrombospondin-1. *Matrix Biology*. 19: 597-614.
32. ChenJ.K.,Zhan Y.J.,Yang C.S., Tzeng S.F. (2011) Oxidative stress-induced attenuation of thrombospondin-1 expression in primary rat astrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112(1):59-70.
33. Christopherson K.S., Ullian E.M., Stokes C., Mallowney C.E., Hell J.W., Agah A., Lawler J., Mosher D.F., Bornstein B., Barres B.A. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS sinaptogénesis. *Cell*, 120:421—433.
34. CONAPO (2005) "Estimaciones de la población en México 2005-2050. Consulta en internet en:http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones_de_la_poblacion_de_Mexico_2005-2050.
35. Dickstein D., Kabaso D., Rocher A., Luebke J., Wearne S., Hof P. (2007) Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*.6:275-284.
36. Duan H., Wearne S.L. Rocher A.B., Macedo A., Morrison J.H. Hof P.R., (2002) Aged-related changes in GuR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Research*. 928: 175-186.
37. Duan H.,Wearne S., Rocher A., Macedo A. Mrrison J., Hof P. (2003) Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in Macaque Monkeys. *Cerebral Cortex*. 13:950-961.

38. Dumitriu D., Hao J., Hara Y., Kaufmann J., Janssen W., Lou W., Rapp P., Morrison J.H. (2010) Selective Changes in Thin Spine Density and Morphology in Monkey Prefrontal Cortex Correlate with Aging-Related Cognitive Impairment. *The Journal of Neuroscience*, 30(22):7507–7515.
39. Eroglu C. (2009) The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 3:167-176.
40. Eroglu C., Allen N.J., Susman M., O'Rourke N.A, Park C.Y., Ozkan E., Chakraborty C., Mulinyawe S.B, Annis D.S., Huberman A.D., Green E.M., Lawler J., Dolmetsch R., Garcia K.C., Smith S.J., Luo Z.D., Rosenthal A., Mosher D.F., Barres B.A. (2009) Gabapentin Receptor $\alpha 2\delta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell*. 139: 380–392.
41. Ethell I., Pasquale E. (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in Neurobiology*. 75:161–205.
42. Ferrer I, Gullota F. (1990) Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathologica*. 79(6):680-5
43. Fiala J.C., Spacek J., Harris K.M. (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?. *Brain Research Reviews*. 39: 29-54.
44. Fort P., Lifshitz F., Bellizario R. (1984) Abnormalities in thyroid function in infants with Down syndrome. *Journal of Pediatrics*. 10:545-49.
45. Freeman S.B., Taft L.F., Dooley K.J. (1998) Population based study of congenital heart defects in Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 80: 213-17.
46. Gallagher M., Pelleymounter MA. (1988) Spatial learning deficits in old rats: a model for memory decline in the aged. *Neurobiology of Aging*. (5-6) 594-56.
47. García O., Massieu L. (2004) Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Archivos de Neurociencias*. 9 (1):29-36.
48. García, O., Torres, M., Helguera, P., Coskun, P., & Busciglio, J. (2010) A role for thrombospondin-1 deficits in astrocyte-mediated spine and synaptic pathology in Down's syndrome. *PLoS One*. 5(12), e14200.
49. García-López P., García-Marín V., Freire M.(2007) The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Progress in Neurobiology*. 83:110-130.
50. Garey L.J., Ong W.Y., Patel T.S., Kanani M., Davis A., Mortimer A.M., Barnes T.R., Hirsch S.R. (1998) Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 65:446–453.
51. Gazzaley A., Thakker M., Hof P.R., Morrison J. (1997) Preserved number of enthorinal cortex layer III neurons in aged Macaque Monkeys. *Neurobiology of Ageing*. 18(5):540-553.
52. Gazzaley A., Siejel A.J., Kordower J.H., Mufson E.J., Morrison J.H.(1996) Circuit specific alterations of N-Methyl D-aspartate receptor subunit 1 in the dentate gyrus of aged monkeys. *Proceedures of the Natural Academy of Sciences*.93: 3121-3125.
53. Geinisman Y., Toledo-Morell L., Morell F. (1986) Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: Morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*. 83:3027-3031.
54. Giaume C, Kirchoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007) Glia: The fulcrum of brain diseases. *Cell Death & Differentiation*. 14:1324-1335.
55. Glantz L., Lewis D. (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortex pyramidal neurons in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 57: 65-73.

56. Göritz C, Mauch D., Nägler K., Pfrieger F.W. (2002) Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse–glia affair. *Journal of Physiology*. 96:257–263.
57. Haber M., Zohul L., Murai K.K.,(2006) Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience*. (26)35:8881-91.
58. Halassa M.M., Fellin T. y Haydon P.G. (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 13(2):1471-4914.
59. Halbach O.B. (2009) Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Annals of Anatomy*.191: 518—531.
60. Halliwell B., (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*.35: 1147-1150.
61. Hansson E. (1990) Regional heterogeneity among astrocytes in the central nervous system. *Biochemistry International*. 16(3):237-45.
62. Hansson E., Rönneback L. (2003) Glial-neuronal signaling in the central nervous system. *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.17:341-348.
63. Harris K., Kater S. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Reviews Neuroscience*. 17: 341-71.
64. Heike H., Morgan S., (2001) Dendritic spines : structure , function and regulation. *Nature Reviews* 888-888.
65. Helguera P., Seigle J., Rodríguez J., Hanna M., Helguera G., Busciglio J. (2013) Adaptive down regulation of mitochondrial function in Down Syndrome. *Cell Metabolism*. 17, 132–140.
66. Hernández-Guzmán D., Busciglio J., García O., (2012) Thrombospondin-1 (TSP-1) levels in plasma of Down syndrome patients. “I Congreso Internacional de la Federación de Asociaciones Latinoamericanas y del Caribe de Neurociencias (FALAN). Cancún, Quintana Roo, México. [Sometime para su presentación].
67. Hof P. (2003) Stereological evidence of the persistence of viable neurons in layer II of the enthorrhinal cortex and CA1 field in Alzheimer’s disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 62:55-67.
68. Hof P., Duan H., Page T.L., Einstein M., Wicinsky B., He Y., Erwin J.M., Morrison J.H. (2002) Age-related changes in GLUR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Research*. 928: 175-186.
69. Hof P., Morrison J., (2004) The ageing brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends in Neuroscience*. 27(10):607-613.
70. Huttenlocher P. (1979) Synaptic density in human frontal cortex --- Developmental changes and effects of aging. *Brain research* 163:195-205.
71. Huttenlocher P. (1991) Dendritic and synaptic pathology in mental retardation. *Pediatric Neurology*. 7:79-85.
72. Iruela-Arispe M., Liska D.,Sage E.,Bornstein P.(1993) Differential expression of Thrombospondin 1,2 and 3 during murine development. *Developmental Dynamics*. 197:40-56.
73. Jacobs B., Driscoll L., Schall M. (1997) Life-Span Dendritic and Spine Changes in Areas 10 and 18 of Human Cortex: A Quantitative Golgi Study. *Journal of Comparative Neurology*. 386:661–680.
74. Jacobs., Schall M.,Phrater M., Kapler E.,Driscoll L., Bac S., Jacobs J., Ford K.,Wanwright M., Trembl M. (2001) Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative Golgi study. *Cerebral Cortex* 11:558-571.

75. Jiang M., Lee C.L., Smith K.L., Swan J.W. (1998) Spine loss and other persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of Early-onset epilepsy. *The Journal of Neuroscience*. 18(20):8356–8368.
76. Jorgensen O., Brooksbank B, Baláz R. (1989) Neuronal Plasticity and astrocytic reaction in Down Syndrome and Alzheimer Disease. *Journal of the Neurological Sciences*.98:63-79.
77. Kalisman N., Silberberg G., Markram H., (2005) The neocortical microcircuits as a Tabula rasa. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 2(3) 880-885.
78. Kandel E., Schwartz J., Jessell T. (2000) Principles of neural science. USA: Mc Graw-Hill.
79. Kaufmann W.E., Moser H.W. (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex*. 10: 981-991
80. Kawaguchi S., Kishikawa M., Sakae M., Nakane Y. (1995) Age-related changes in basal dendrite and dendritic spine of hippocampal pyramidal neurons (CA1) among SAMP1TA/Ngs--- Quantitative analysis by the rapid Golgi method. *Mechanisms of Ageing and Development*. 83:11-20.
81. Kawano H., Katsurabayashi S., Yasuhiro K., Yamashita Y, Kubo N., Kubo M., Okuda H., Takasaki K., Kubota K., Mishima K., Fujiwara M., Harata N., Iwasaki K., (2012) Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. *PLoS One*. 7:e48034.
82. Kawas C., Katzman R., (1999) Epidemiology of dementia and Alzheimer disease in Alzheimer disease. Lippincott Williams & Wilkins.
83. Kennedy R.L., Jones T.H., Cuckle HS. (1992) Down's syndrome and the thyroid. *Clinical Endocrinology*. 37: 471-76.
84. Kettenman H., Verkhratsky A., (2008) Neuroglia: the 150 years after. *Trends in Neuroscience*.31(12): 653-9
85. Knobloch M, Mansuy IM. (2008). Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's neurons in Down's syndrome. A quantitative study. *Acta Neuropathologica*. 50: 207-210.
86. Kremsky I., Morgan T.E., Hou X., Li L., Finch C.E. (2012) Age-changes in gene expression in primary mixed glia cultures from young vs old rat cerebral cortex are modified by interactions with neurons. *Brain, Behavior, and Immunity*. 26:797-802.
87. Kurshan P., Oztan A., Schwarz T. (2009) Presynaptic $\alpha 2\delta$ -3 is required for synaptic morphogenesis independent of its Ca^{2+} -channel functions. *Nature Neuroscience*.12(11):1415-1423.
88. Lemere C., Blusztajn J., Yamaguchi H., Wisniewsky T., Selkoe D. (1996) Sequence of depositions of heterogeneous Amyloid β -peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in Amyloid plaque formation. *Neurobiology of Disease*.3:16-32.
89. Levenga J., Willemsen R. (2012) Perturbation of dendritic protrusions in intellectual disability. *Progress in Brain Research*. 197:153-168.
90. Liaw J., Hoang S., Choi M., Eroglu C., Choi M., Sun G., Percy M., Wildman-Tobriner B., Bliss T., Guzmán R., Barres B., Steinberg G. (2008) Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 28:1722-1732.
91. Lott I., Dierssen M. (2010) Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down syndrome. *The Lancet Neurology*. 9(6):623-33.
92. Lott I., Head E., (2001) Down syndrome and Alzheimer's disease: a link between development and aging. *Mental retardation and Developmental Disabilities*. 7(3):172-8.
93. Lu Z., Kipnis L. (2010) Thrombospondin-1 a key astrocyte-derived neurogenic factor. *The FASEB Journal*. 24(6): 1925–1934.

94. Lucarellia P., Piciullo A., Palmarinoc M., Verdecchiad M., Saccuccie P., Arpinoc C., Curatolod P. (2004) Association between presenilin-1 -48C/T polymorphism and Down Syndrome. *Neuroscience Letters*. 367:88-91.
95. Lynch A. Murphy K., Deighan B. O'Reilly J., Gun'Ko Y., Cowley T. Gonzalez Reyes R., Lynch M. (2010) The impact of Glial activation in the aging brain. *Aging and Disease*. 1(3):262-278.
96. Majewska A., Tashiro A., Yuste R. (2000) Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility. *The Journal of Neuroscience*. 20 (22): 8262-8268.
97. Mann D.M. (1988) The pathological association between Down Syndrome and Alzheimer disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 43: 99-136.
98. Marin- Padilla (1972) Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Research*. 44(2):625-9.
99. Marin-Padilla M. (1976) Pyramidal Cell with Cell Abnormalities in the Motor Cortex of a Down's syndrome. A Golgi Study. *Journal of Comparative Neurology*. 167: 63-82.
100. Matsuzaki M., Ellis-Dvies G., Nemoto T., Miyashita Y., Iino M., Kasai H. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*. 4 (11): 1806-1092.
101. Matsuzaki m., Honkura N., Ellis-Davies G., Kasai H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766
102. Matthias K., Kirchhoff F., Seifert G., Hüttman K., Matyash M., Kettenmann H., SteinhÄuser (2003) Segregated expression of AMPA-Type Glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 23(5):1750-1758.
103. Matyash V., Kettenmann H. (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*. 63:2-10.
104. Mauch D.H., Nägler K., Schumacher S., Göritz C., Müller E., Otto A., Priege F. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia derived cholesterol. *Science*. 294 (5545):1354-7.
105. McCarthy K., DeVellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *Journal of Cell Biology*. 85:890-902.
106. McNeill T.H., Brown S.A., Rafols J.A., Shoulson I. (1988) Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson's disease. *Brain Research*. 455:148-152.
107. Meng H., Zhang X., Blaivas M, Wang M. (2009) Localization of blood proteins Thrombospondin 1 and ADAMTS13 to cerebral corpora amylacea. *Neuropathology*. 29(6):664-671.
108. Meshul C., Seil F., Herndon M. (1987) Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Research*. 402: 139-145.
109. Miller F., Gauthier A. (2007) Timing is everything: Making neurons versus Glia in the developing cortex. *Neuron*. 54(3):357-69.
110. Mizui T, Takahashi H, Sekino Y, Shirao T (2005) Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions. *Molecular and Cellular Neuroscience* 30:149 –157.
111. Moolman D., Vitolo O., Vonsattel J.G., Shelanski. (2004) Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *Journal of Neurophysiology*. 33:377-387.
112. Morrison J.H., Baxter M.G. (2012) The ageing cortical synapse: Hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Review Neuroscience*. 13 (4):240-50.
113. Morrison J.H., Hof P.R. (1997) Life and death of neurons in the ageing brain. *Science*. 278:412-419.

114. Morrison RS., De Vellis j., Lee Y., Bradshaw RA, Eng.LF (1985) Hormones and growth factors induce the synthesis of glial fibrillary acidic protein in rat brain astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*.14 (2):167-76.
115. Myers B.A., Pueschel S.M. (1991) Psychiatric disorders in a population with Down Syndrome. *Jurnal of Nervous Mental Disorders*.179:609-13.
116. Nakamura S., Akiguchi I., Kameyama M., Mizuno N. (1985) Age related changes of pyramidal cell basal dendrites in layer iii and v of human motor cortex: a quantitative golgi study. *Acta Neuropathologica* .65(3-4) 281-4.
117. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neuroscience*.26 (10): 523-30.
118. Nieuwenhuis- Mark R.E. (2009) Diagnosing Alzheimer's dementia in Down syndrome: problems and possible solutions. *Research in Developmental Disabilities*. 30(5):827-38.
119. Nimchinsky E., Sabatini B., Svoboda K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*. 64:313-353.
120. Nimchinsky E., Yasuda R., Oertner T.,Svoboda K.(2004) The number of glutamate receptors opened by synaptic stimulation in single hippocampal spines. *The Journal of Neuroscience*. 24(8): 2054-2064.
- 121.Nishida H, Okabe S. (2007) Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *The Journal of Neuroscience*. 27(2):331–340.
122. Nunzi M., Milan F., Guidolin D., Toffano G., (1987) Dendritic spine loss in hippocampus of aged rats. Effect of brain phosphatidylserine administration. *Neurobiology of ageing*. 8:501-510.
123. Oberheim N., Takato T., Han X., He W.,Lin J.,Wang F., Xu Q., Wyatt J.,Pilcher W., Ojemann J.,Ransom B., Goldman S., Nedergaard M. (2009) Unique hominid features of human adult astrocytes. *Journal of Neuroscience*. 29(10): 3276-87.
124. Oberheim N., Wang X., Goldman S., Nedergaard M. (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences*. 29(10):547-553.
125. Ostroff L., Fial C.,Allwardt B., Harris K., (2002) Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat Hippocampal slices. *Neuron*. 35:335-545.
126. Parpura D. (1974) dendritic spine “Dysgenesis” and mental retardation. *Science*.126:1126-1128.
127. Patterson D, Costa ACS. (2005). Down syndrome and genetics-a case of linked histories. *Nature Reviews Gentic*s. 6: 137-147.
128. Patterson D. (2007) Genetic mechanisms involved in the mechanism of Down síndrome. *Mental Retardation and Developmental Disabilities*. 13: 199 – 206.
129. Peinado M., del Moral M., Esteban F., Martínez-Lara E., Siles E., Jimenez A., Hernández Cobo R., Blanco S., Rodrigo J., Pedrosa J. (2000) Envejecimiento y neurodegeneración: Bases moleculares y celulares. *Revista de Neurología*. 31(11): 1054-1065.
130. Perluigi M., Butterfield A. (2011) Oxidative Stress and Down syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia. *Current Gerontology and Geriatrics Research*. 1-10.
131. Pertrusa M., García-Matas S., Rodriguez-Farré E., Sanfeliu C., Cristófol R. (2007) Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *Journal of Neurochemistry*. 101: 798-805.
132. Peters A., Kaiserman Abramof IR.(1997) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikarion, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*. 127(4): 321-55.
133. Peters A., Moss M.B., Seathers C. (2001) The effects of aging on layer 1 of primary visual cortex in the rhesus monkey. *Cerebral Cortex*. 11:93-103.

134. Peters A., Sethares C., Moss M.B., (1998) The effects of ageing on layer 1 in area 46 of prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Cerebral Cortex*. 8(8):671-84.
135. Pfrieger F., Barres B. (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science*. 277 (5332):1684-7.
136. Prasher V., Chowdhury T., Rowe B., Bain S.C. (1997) Apo E genotype and Alzheimers disease in adults with Down syndrome: meta-analysis. *American journal of mental retardation*. 102(2):103-10.
137. Prasher V.P., Farrer M.J., Kessling A.M., Fisher E.M., West R.J., Barber P.C., Butler A.C. (1998) Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's Syndrome. *Annals of Neurology*. 43(3):380-3.
138. Purpura D. (1975) Dendritic differentiation in human cerebral cortex: normal and aberrant developmental patterns. *Advances in Neurology*.12:91-134.
139. Purpura D.P. (1974) Dendritic spine "Dysgenesis" and mental retardation. *Science*. 186:1127-1128.
140. Quiroz A.C. (2010) Envejecimiento exitoso y actividades de la vida diaria: efectos de un curso taller. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
141. Rama R.KV., Curtis K.M., Johnstone J.T., Norenberg M.D. (2013) Amyloid- β inhibits Thrombospondin-1 release From cultured astrocytes: effect on synaptic protein expression. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*.72 (8):735-44.
142. Rapp P.M., Gallagher M. (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23: 9926-9930.
143. Rapp P.R., Derocche P.S., Mao Y., Burwell R.D. (2002) Neuron number in the para hippocampal region is preserved in aged rats with spatial learning deficits. *Cerebral Cortex*.12:1171-1179.
144. Rechtsmeier J.T., Baxter L.L., Reeves R.H. (2000) Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Developmental dynamics*. 217:137-145.
145. Richards P., Didszun C. Campesan S., Simpson A., Horley B., Young B.W., GlynnP. Cain K., Kyriacou, Goirgini F., Nicotera P. (2011) Dendritic spine loss and neurodegeneration is rescued by rab11 in models of Huntington's Disease. *Cell Death and Differentiation*.18:191-200.
146. Risher W., Eroglu C. (2012) Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biology*. 31(3):170-7.
147. Rodríguez J.J., Olabarria M., Chvatal A., Verkhatsky A., (2009) Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death and Differentiation*. 16:378-385.
148. Rodríguez K y Cespedes E. (1999) Estrés oxidativo y envejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 18: 67-76.
149. Roizen N.J., Amarose A.P. (1993) Hematologic abnormalities in children with Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 46: 510-12.
150. Roizen N.J., Patterson D. (2003) Down's Syndrome. *Lancet*. 361 (9365):1281-9.
151. Romo E.G. (2008) Envejecimiento demográfico y Vejez del sistema de salud en México. Universidad Autónoma de Zacatecas, México. Trabajo presentado en el III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Población. Disponible en línea desde: http://www.alapop.org/2009/images/DOCSFINAIS_PDF/ALAP_2008_FINAL_140.pdf.
152. Rosenzweig E.S, Barnes C.A. (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology*. 69 143–179.
153. Rozovsky I., Wei M., Morgan T., Finch C. (2005) Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP. *Neurobiology of Ageing*. 26:705-715.

154. Sabatini B., Oertner T., Svoboda K. (2002) The life Cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines. *Neuron*. 33(3):439-52.
155. Sabatini B. P., Bronzetti E., Zaccheo D., Amenta F. (1999) Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mechanisms of Ageing and Development*. 108: 165–172.
156. Sandowski M., Wisniewsky H.M., Tarnawsky M., Kolowski P.B., Lach B, Wegiel J.(1999) Entorhinal cortex of aged subjects with Down's syndrome shows severe neuronal loss caused by neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathologica*. 97(2):156-64.
157. Schupf N., Patel B., Pang D., Zigman W., Silverman W., Mehta P., Mayeux R. (2007) Elevated Plasma B-amyloid peptide ab42 levels, incident dementia, and Mortality in Down syndrome. *Archives of Neurology* 64(7): 1007-1013.
158. Schupf N., Patel B., Silverman W., Zigman W.B., Zhong N., Metha P.D., Mayeux R. (2001) Elevated plasma amyloid beta-peptide 1-42 and onset of dementia in adults with Down syndrome. *Neuroscience Letters*. 301(3):199-203.
159. Sekino Y., Kojima H., Shirao T., (2007) Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry international* .52:92-104.
160. Selkoe D.J. (2001) Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Journal of Alzheimer's Disease*. 3(1):75-80.
161. Sherman SL., Allen E.G, Bean LH, Freeman SB. (2007) Epidemiology of Down Syndrome. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*.13 (3): 221-7.
162. Simpson J.E., Ince P.G., Lacey G., Forster G., Shaw P.J., Matthews F., Savva G., Brayne C., Wharton S.B. (2010) Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging*. 31:578-590.
163. Slezak M., Pfrieder F.W. (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *TRENDS in Neurosciences* 26 (10): 531-535.
164. Slezak M., Pfrieder F.W., Soltys Z. (2006) Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *Journal of Physiology*. 99: 84–91.
165. Smirnova I.V., Festoff B.W. (1994) Alterations in serum thrombospondin in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*.127:207-213.
166. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 119(1), 7-35.
167. Song M, Kojima N, Hanamura K, Sekino Y, Inoue HK, Mikuni M, Shirao T (2008) Expression of drebrin E in migrating neuroblasts in adult rat brain: coincidence between drebrin E disappearance from cell body and cessation of migration. *Neuroscience*. 152:670 – 682.
168. Sorra K., Harris K. (2000) Overview on the structure ,composition, function, development and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*.10:501-511.
169. Squire L.(Editor) , Berg D. (Editor), Bloom F. (Editor) ,Du Lac S. (Editor),Anirvan G. (Editor), Spitzer N. (Editor) (2012) *Fundamental Neuroscience 4a edición*. USA: Academic Press.
170. Steward O., Schumman E. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual Reviews Neuroscience*. 24:299-325.
171. Suetsugu M, Mehraein P. (1980) Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathologica* 50 (3):207-10.

172. Svitkina T., Lin W., Webb D., Yasuda R., Wayman G., Van Aelst L., Soderling S. (2010) Regulation of the postsynaptic cytoskeleton: roles in development, plasticity, and disorders. *Journal of Neuroscience*. 30: 14937-14942.
173. Takahashi H, Mizui T, Shirao T (2006) Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*. 97 (Suppl 1): 110 –115.
174. Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S, Shirao T (2003) Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *Journal of Neuroscience*. 23:6586 – 6595.
175. Takashima S., Becker L., Armstrong D., Chan F., (1981) Abnormal Neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with Down Syndrome . A quantitative and Qualitative Golgy study. *Brain Research*. 225:1-21.
176. Takashima S., Lida K., Arima M., (1994) Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *Journal of Intellectual Disabilities Research*.38 (Pt3):265-73.
177. Takumi Y., Ramírez-León V., Laake P., Rinvik E., Ottersen O. (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nature Neuroscience*.2(7) 618-624.
178. Tashiro A., Yuste R. (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Molecular and cellular Neuroscience*. 26:429-440.
179. Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna-Bricarelli F, Scartezzini P, Bertolini S, Mann DM, Tabaton M, Gambetti P. (1996) Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Medicine*. 2(1):93-5.
180. Toescu E.C., Verkhratsky A., (2003) Neuronal ageing from an intraneuronal perspective: roles of endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*.34:311-323.
181. Uemura E. (1980) Age-related Changes in prefrontal cortex of Macaca mulatta: synaptic density. *Experimental Neurology*. 69:164-172.
182. Ullian E., Sapperstein S., Christopherson K., Barres B. (2001) Control of synapse number by glia. *Science*. 291(5504):657-51.
183. Uno K., Bhutto A., McLeod D.S., Merges C., Luttig G.A. (2006) Impaired expression of Thrombospondin -1 in eyes with age related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*. 90:48–54.
184. Verkhratsky (2007) Glial neurobiology. USA. John Wiley & Sons, Ltd.
185. Von Bohlen und Halbach, O., Zacher C., Gass P., Unsicker K., (2006) Age-related alteration in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience Research*. 83(4):525-31.
186. Wang R., Zhang X., Zhang J., Fan Y., Shen Y., Hu W., Chen Z.(2012) Oxygen Glucose deprivation induced glial scar-like change in astrocytes. *Plos One*. 7(5): e37574.
187. Ward M.T., Stoelzel C.L, Markus E.J. (1999) Hippocampal dysfunction during aging II: Deficits on the radial-arm maze. *Neurobiology of Aging*. 20 (1999) 373–380.
188. Webb R., Murphy P. (2011) β -Secretases, Alzheimer's disease, and Down syndrome. *Current Gerontology and Geriatrics Research*: 1-8.
189. West M., Hawas C., Steward W., Rudow G, Troncoso J.(2004) Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiology of ageing*. 25:1205-1212.

190. Wu Y., Zhang A., Yew D.T. (2005) Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochemistry International*. 46: 565–574.
191. Wyatt R., Tring E, Trachtenberg J. (2012) Pattern, not magnitude, of neural activity determines dendritic spine stability in awake mice. *Nature Neuroscience*. 15(7): 949–951.
192. Xu J.,Xiao N., Jia J.,(2010) Thrombospondin-1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1. *Nature Neuroscience*. 13: 22-24.
193. Yuste R.(2011)Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron Review*.71:772-781.
194. Yuste R., Bonhoeffer T. (2004) Genesis of dendritic spines: Insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*. 5(1):24-34.
195. Yuste R., Majewska A., Holthoff K. (2000) From form to function: Calcium compartamentalization in dendritic spines. *Nature Neuroscience Reviews*. 3(7):653-659.
196. Zigman W.B., Lott IT (2007) Alzheimer's disease in Down syndrome: Neurobiology and Risk. *Mental Retardation and Developmental Disabilities*. 13:273-246.
197. Ziv N.E., Smith S.J. (1996) Evidence for a role of dendritic filipodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*. 17(1):91-102.