



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EXPRESIÓN DE TROMBOSPONDINA-1 (TSP-1)  
EN LA MICROGLÍA DEL HIPOCAMPO DE RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:  
**ALYSON CASTAÑEDA FLORES**

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021.



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.

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Neurobiología del Síndrome de Down de la Facultad de Psicología de la UNAM; con un apoyo del proyecto PAPIIT-IN304817 “El papel de la trombospondina-1 (TSP-1) en la plasticidad neuronal asociada al síndrome de Down”

Dedicada a mis padres Yadhira Eugenia Flores y Alfonso Castañeda; y a mí misma.  
Y mi agradecimiento sincero a todas las personas que me apoyaron en el proceso, algunas  
no leerán mi escrito, pero están presentes en cada palabra y en cada paso siguiente.

“Some women choose to follow men, and some women choose to follow their dreams. If  
you’re wondering which way to go, remember that your career will never wake up and tell  
you that it doesn’t love you anymore”

-Lady Gaga

## Índice

Lista de abreviaturas .....	5
Resumen.....	7
Introducción .....	8
1. Trombospondinas (TSPs) .....	8
1.1. Funciones de las TSPs .....	11
2. Trombospondina – 1 (TSP-1) .....	12
2.1. TSP-1 y Sistema nervioso Central.....	15
3. Macrófagos y TSP-1 .....	16
3.1. TSP-1 e inflamación .....	17
Antecedentes.....	18
1. El hipocampo: anatomía, funciones y patologías asociadas.....	18
2. Las células gliales .....	19
2.1. Microglía .....	21
2.2. Microglía y expresión de TSP-1 en el hipocampo .....	24
3. Justificación .....	25
4. Objetivos .....	26
5. Hipótesis .....	26
6. Materiales y Método .....	27
6.1 Animales .....	27
6.2 Disección hipocampal .....	28
6.3 Tinción de Golgi .....	30
6.4 Tinción de Nissl .....	31
6.5 Cuantificación de TSP-1 e IL-6 .....	32
6.6 Detección de microglía .....	33
6.6 Análisis estadístico .....	33
7. Resultados .....	34
8. Discusión .....	41
9. Conclusiones .....	44
10. Referencias .....	45

## Lista de abreviaturas

<b>bFGF</b>	Fibroblastos básico
<b>CRP</b>	Proteoglicanos
<b>CD36</b>	Proteína asociada a Integrina con grupo de diferenciación 36
<b>CD47</b>	Proteína asociada a Integrina con grupo de diferenciación 47
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidemial
<b>RPE</b>	Epitelio pigmentario retiniano
<b>Gal-1</b>	Galactina-1
<b>GD</b>	Giro Dentado
<b>IFN</b>	Interferones
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina-1 $\alpha$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>ip</b>	Intraperitoneal
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MHC</b>	Complejo de histocompatibilidad
<b>MyO</b>	Minociclina
<b>M1</b>	Estado proinflamatorio
<b>M2</b>	Estado anti-inflamatorio
<b>NG2</b>	Antígeno nervioso / glial 2
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NR4A2</b>	Receptor 4A2
<b>PPAR</b>	Proliferación del peroxisoma
<b>SN</b>	Sistema Nervioso
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SYP</b>	Sinaptofisina
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento $\beta$ 1
<b>TSPs</b>	Trombospondinas

<b>TSP-1</b>	Trombospondina 1
<b>TSP-2</b>	Trombospondina 2
<b>TSP-3</b>	Trombospondina 3
<b>TSP-4</b>	Trombospondina 4
<b>TSP-5</b>	Trombospondina 5
<b>TSRs</b>	Trombospondinas Repetidas
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial
<b>VWC</b>	Factor Von Willebrand
<b><math>\alpha 2\delta</math>-1</b>	Subunidad del canal de calcio $\alpha 2$ channel-1

## **Resumen**

La Trombospondina-1 (TSP-1), es una proteína de matriz extracelular involucrada en diversos procesos celulares, como angiogénesis, cáncer, cicatrización, migración celular, apoptosis e inflamación. La inflamación es una reacción de un tejido vivo a un daño local. El proceso de inflamación comienza cuando las células, detectan el daño y liberan mediadores químicos llamados citoquinas o interleucinas, esta liberación la realizan principalmente células del sistema inmune. En el sistema nervioso central (SNC), la liberación de citoquinas o interleucinas es realizada por células inmunocompetentes, llamadas microglía. Sin embargo, la secreción de TSP-1 se lleva a cabo por los astrocitos, donde juega un papel importante en procesos como: sinaptogénesis, espinogénesis, migración y diferenciación neuronal. Aunque algunos estudios sugieren que los astrocitos pueden secretar interleucinas, no es del todo claro si la microglía es capaz de secretar TSP-1, por lo que en esta tesis se buscó establecer si la microglía del hipocampo de ratón, puede expresar TSP-1. Los resultados de este estudio mostraron que el hipocampo de ratón presenta aproximadamente un 15% de células microgliales. La inyección de minociclina (un inhibidor de la actividad microglial), produce una disminución de Interleucina 6 (IL-6, un marcador de la actividad microglial), y un incremento en la secreción de TSP-1. Sin embargo, la expresión de Iba-1 (proteína de unión a calcio específica que funciona también como un marcador de la actividad microglial), bajo las mismas condiciones, no mostró cambios estadísticamente significativos en su expresión, sugiriendo que la TSP-1 podría ser secretada por la microglía y tener una participación en los procesos de inflamación del SNC.

**Palabras clave:** Microglía, Trombospondina-1 (TSP-1), Neuroinflamación, Hipocampo, Astrocitos.



## Introducción

### 1. Trombospondinas (TSPs).

Las trombospondinas (TSPs) pertenecen a un grupo de glicoproteínas de unión a calcio, (Adams & Lawler, 2011), que se unen a la matriz extracelular (MEC), lo que les permite funcionar como un puente entre la superficie celular y los diferentes componentes de la MEC (Bornstein, 2001), regulando las interacciones célula-célula y célula-matriz (Stenina-adognravi, 2015). Estas interacciones se realizan a través de receptores de membrana, factores de crecimiento, citoquinas y proteasas extracelulares entre otras moléculas y proteínas (Adams, 2001; Adams & Lawler, 2011; Bornstein, 1995).

La estructura de las TSPs presenta multidominios comunes (Resovi, Pinessi, Chiorino, & Taraboletti, 2014) que incluyen: dominio C-terminal, secuencias repetidas tipo III de unión a calcio, secuencias repetidas tipo Factor de Crecimiento Epidemial (EGF), dominio N-terminal y el dominio de oligomerización (Kazerounian & Yee, 2009) (Figura 1).

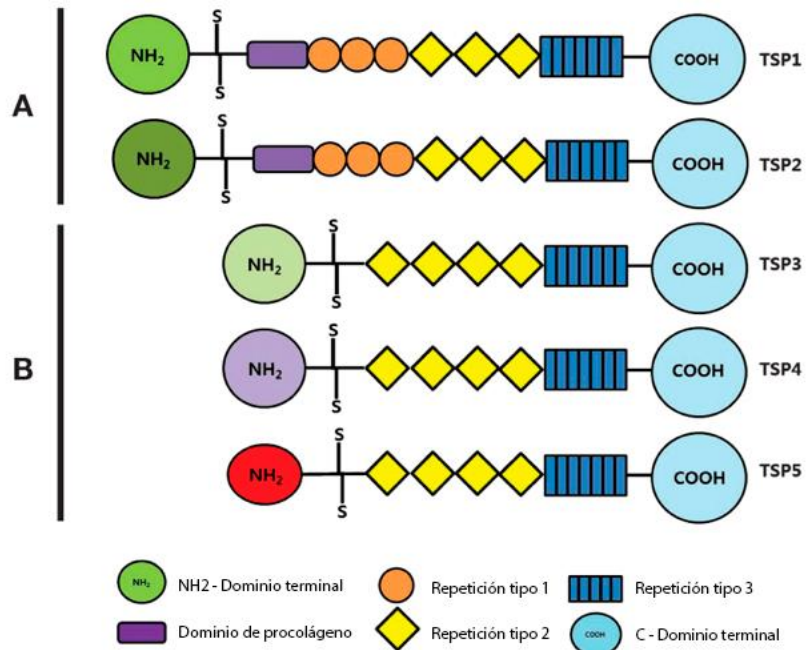
Las TSPs están conformadas por una familia de cinco miembros: TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 y TSP-5 (Yang, Kyriakides, & Bornstein, 2000). Basados en la conservación de su dominio, secuencia y estructura oligomérica las TSPs se dividen en dos subgrupos (Adams & Lawler, 2011). El subgrupo A compuesto por la TSP-1 y TSP-2 caracterizado por una estructura trimétrica, y el subgrupo B compuesto por la TSP-3, TSP-4 y TSP-5 conformado por una estructura pentamérica (Adams & Lawler, 2011). El subgrupo A contiene tres secuencias repetidas tipo EGF, (Breitkopf et al., 2005), una secuencia repetida tipo I (también conocida como trombospondinas repetidas; TSRs) y un dominio tipo C factor Von Willebrand (VWC) (Frangogiannis, 2015); mientras que el subgrupo B, está conformado por 4 secuencias repetidas tipo EGF, pero que no contiene dominios TSRs ni VWC (Figura 1). Cada uno de estos dominios le permite a las TSPs unirse a diferentes tipos de receptores de membrana como receptor a gabapentina ( $\alpha 2$ - $\beta 1$ ), receptor al grupo de diferenciación 36 (CD36), receptor al grupo de diferenciación 47 (CD47), factor de crecimiento (TGF- $\beta$ ), factores de

crecimiento, proteasas extracelulares, citocinas y proteínas de la matriz extracelular (Bornstein, 1995; Dawson et al., 1997; Adams, 2001; Adams & Lawler, 2011).

Las TSPs son codificadas por genes separados (Adams & Lawler, 2011) y su ubicación se encuentra en diferentes cromosomas. En humano la TSP-1 se encuentra dentro del cromosoma 15; TSP-2 en el cromosoma 6; TSP-3 en el cromosoma 1; TSP-4 en el cromosoma 5; y TSP-5 en el cromosoma 19 (Stenina-adognravi, 2015). En el caso del ratón la TSP-1 se ubica dentro del cromosoma 2; TSP-2 en el cromosoma 17; TSP-3 en el cromosoma 3; TSP-4 en el cromosoma 13; y TSP-5 en el cromosoma 8 (Laherty, 1992; Bornstein et al., 1993).

La TSP-1 y la TSP-2 están estrechamente relacionadas, ya que han evolucionado con un conjunto de dominios específicos de forma estructural y funcional (Christopherson et al., 2005), como las TRS (Zhang & Lawler, 2008) y de homología de procolágeno (Bornstein, 2009), las cuales son importantes para la unión del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). La TSP-1 y TSP-2 se expresan en grandes niveles durante la remodelación del tejido, la cual está asociada con la cicatrización de heridas, la progresión de tumores (Kazerounian, & Yee, 2009) y en el proceso de angiogénesis (Adams y Lawler, 2011). La TSP-3 es estructuralmente similar a la TSP-5 (Hankenson, Hormuzdi, Meganck, & Bornstein, 2005) ya que ambas son producidas durante una lesión aterosclerótica (Frolova et al., 2011). La TSP-3 está involucrada en funciones como la génesis y remodelación de tejidos (Andrade et al., 2009), en la progresión del osteosarcoma (Dalla-torre et al., 2006) y en la regulación de la maduración esquelética en ratones (Hankenson, Hormuzdi, Meganck, & Bornstein, 2005). Mientras que la TSP-4, se expresa diferencialmente en el carcinoma de mama lobular invasivo (Turashvili, Bouchal, Burkadze, & Kolář, 2005) y está presente en el sistema nervioso adulto donde se localiza en algunas sinapsis del Sistema Nervioso Central (SNC), participa en procesos relacionados con la unión neuromuscular (Arber & Caroni, 1995) y la enfermedad de la arteria coronaria (Stenina et al., 2004). Por último, la TSP-5 se expresa principalmente en el cartílago, en tejidos conectivos (Posey et al., 2008), tendón, ligamento y los vasos sanguíneos (Bornstein, 2009; Ekman, Schmitz, Paulsson, & Zaucke,

2006) y algunas de sus funciones comprenden la unión de condrocitos, la diferenciación y el ensamblaje de ECM de cartílago (Lashea, Alcorn, & Hecht, 2014).



**Figura 1.** Dominios estructurales de la familia de la Trombospondinas (TSPs). Las Trombospondinas son una familia de cinco glicoproteínas extracelulares, los cinco miembros contienen las repeticiones de tipo 2, la repetición de tipo 3 y un dominio C-terminal altamente conservado, sin embargo, solamente la TSP-1 y 2, contienen las repeticiones de tipo 1. La TSP-1 y la TSP-2 pertenecen al subgrupo A, caracterizada por una estructura trimétrica, mientras que la TSP-3, TSP-4 y TSP-5 pertenecen al subgrupo B, caracterizado por una estructura pentamérica (modificado de Junggubo, 2015).

## 1.1. Funciones de las TSPs.

Las TSPs presentan varias funciones fisiológicas en diversos órganos y sistemas (Henkin & Volpert, 2011; Stenina-adognravi, 2014). Por ejemplo, durante la embriogénesis en humanos y roedores, participa en el desarrollo de diversos órganos como huesos, músculos, corazón y cerebro (Shea et al., 1990).

Durante la etapa postnatal las TSPs están implicadas en la regulación de la angiogénesis y progresión del cáncer (Bornstein, Agah, & Kyriakides, 2004, Bornstein, 2009; Lawler, 2012), en la regulación de la inflamación (Frolova et al., 2011; Lopez-dee, Pidcock, & Gutierrez, 2011; Stenina-adognravi, 2014); modulación de la respuesta inmune (Miller, Kaur, Keefe, & Roberts, 2014); mantenimiento de la integridad y función del miocardio (Roberts, 2013); regulación de la fibrosis (Murphy, 2013); organización del tejido conectivo (Bornstein et al., 2004); angiogénesis (Adams, 2001) y en la sinaptogénesis (Risher & Eroglu, 2012).

En la etapa adulta, tanto la expresión como la regulación de las TSPs se asocia con etapas específicas en la cicatrización de heridas (Raugi, 1987; Reed et al., 1993) y la remodelación de tejidos (Lynch et al., 2013; Mustonen et al., 2008). En todos los casos sus distintos papeles se deben a diferencias en la regulación transcripcional de cada gen y a las capacidades funcionales de cada uno de los miembros de las TSPs y los receptores con los que interactúa (Risher & Eroglu, 2012).

## 2. Trombospondina – 1 (TSP-1).

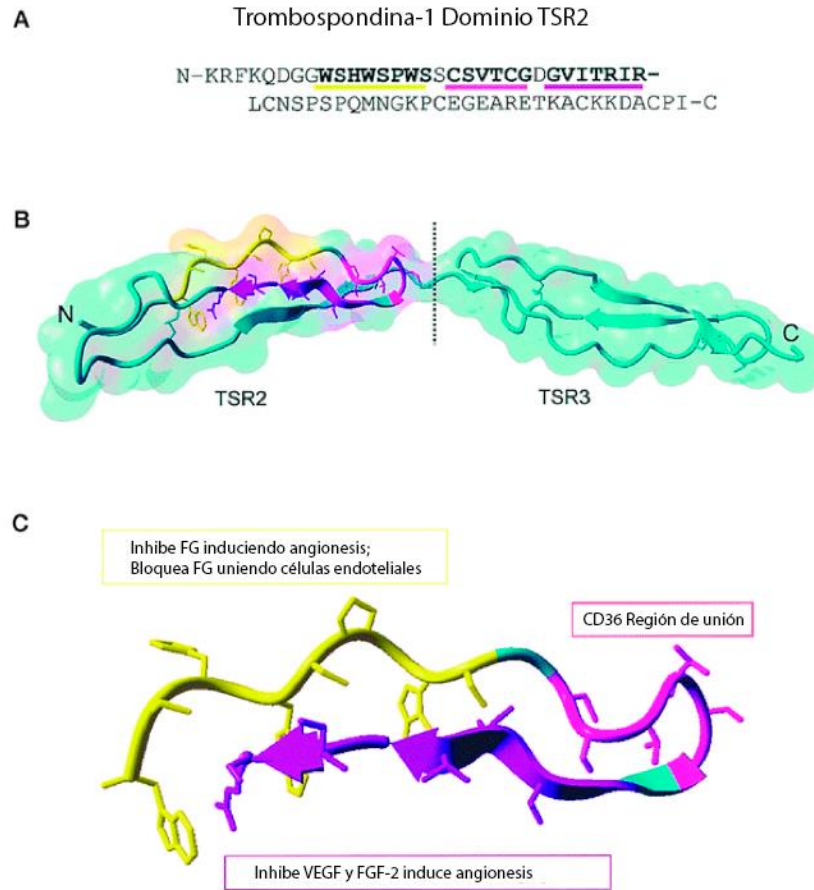
La trombospondina-1 (TSP-1), fue la primera TSP en descubrirse en plaquetas activas (Raugi, 2015), por lo que es la TSP mejor estudiada. La TSP-1 es una glicoproteína de matriz extracelular con un tamaño de 420 kD, es una proteína trimérica y cada monómero está compuesto por múltiples dominios: dominios globulares NH<sub>2</sub>-terminal y COOH-terminal; un dominio de tipo procolágeno; y tres TSR tipo 1, 2 y 3 (Lawler & Hynes, 1986) (Figura 2). Estas repeticiones median la unión celular y están involucradas en la migración celular, comunicación y remodelación de tejidos; unión a glicosaminoglicanos; inhibición de la angiogénesis; activación de TGF $\beta$  y la inhibición de las metaloproteinasas de la MEC (Tan et al., 2001; Lawler & Hynes, 1986). En la estructura de los TSR, las secuencias activas se encuentran en dos barriles  $\beta$  antiparalelas y el giro intermedio (Tan et al., 2001), de esta manera, las tres secuencias activas se organizan en un parche de superficie cargado positivamente en el segundo TSR, cuyo parche representa el sitio de unión para los diversos ligandos de los TSR, incluidos TGF $\beta$  y CD36 (Zhang & Lawler, 2008) (Figura 2). Los TSR inhiben la migración de células endoteliales a través de su interacción con CD36 (Dawson et al., 1997; Klenotic et al., 2013; Simantov & Silverstein, 2003), induciendo también la apoptosis de estas células (Jiménez, 2000).

Generalmente las TSPs se secretan de las células por exocitosis constitutiva, es decir, se liberan para formar parte de la matriz extracelular, pero la liberación de TSP-1 se da a través de los gránulos de plaquetas almacenados que se descargan con la activación de las plaquetas por trombina (Blair & Flaumenhaft, 2010). La TSP-1 es expresada por una variedad de células en cultivo, incluyendo células endoteliales (Mcphersons, Sage, & Bornstein, 1981; Mosher, Doyle, & Jaffe, 1982; Sage, Pritzl, & Bornstein, 1981); fibroblastos (Jaffe et al., 1983); adipocitos, células del músculo liso (Raugi, 1987); monocitos, macrófagos, células transformadas en células malignas como gliomas (Frazier, 1987; Good et al., 1990; Iruelarispe, Bornsteint, & Sage, 1991; Mumby, Abbott-brown, Raugi, & Bornstein, 1984) y tejido adiposo visceral (Agah et al., 2002).

Entre las principales funciones de la TSP-1 se encuentran: la formación de complejos multiproteínicos que modulan el fenotipo celular durante la génesis y reparación de tejidos

(Chen et al., 2000), la agregación plaquetaria (Stenina-adognravi, 2015); respuesta inflamatoria (Mcmorrow et al., 2013); modulación de las respuestas inmunitarias (Ma et al., 2015); en la regulación de la angiogénesis durante la reparación de la herida y el crecimiento del tumor (Almog et al., 2006; Roudier et al., 2014; Zaslavsky et al., 2011; Zhang & Lawler, 2001). Por otro lado, gracias a las TSR (Lawler, 2000), la TSP-1 participa en la inhibición de la migración de células endoteliales inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Isenberg, Martin-Manso, Maxhimer, & Roberts, 2009).

Por otro lado, la TSP-1 puede regular la adhesión, migración, proliferación y supervivencia de las células a través de la activación de TGF $\beta$ , fibronectinas e integrinas. Mientras que la angiogénesis (Iruela-arispe, Bornsteint, & Sage, 1991), apoptosis (Lawler, Miao, Duquette, Bronson, & Hynes, 2001), cicatrización (Streit et al., 2000) y la respuesta inflamatoria e inmune podría estar asociada a la unión de receptores de lipoproteínas de baja afinidad (CRP) (Dipietro & Polverini, 1993) y proteínas de membrana como integrinas (IAP o CD47) (Murphy-Ullrich, 2001), y múltiples receptores (Kaur et al., 2010; Osz, Ross, & Petrik, 2014), como el receptor VEGFR2, CD47 y 4A2 (NR4A2) (Kaur et al., 2010).



**Figura 2.** Estructura de TSP-1 con sus repeticiones 1, 2 y 3 (TSR). **(A)** Secuencia del segundo dominio de la repetición de tipo 1 (TSR2) de la TSP-1, las regiones de TSR2 tienen un papel en la actividad antiangiogénica y están marcadas en negritas. **(B)** Estructura tridimensional de TSR2 y TSR3 de TSP-1 humana y las regiones de la estructura correspondientes a las secuencias activas antiangiogénicas se representan utilizando el mismo color que el subrayado en la Fig. 1A. **(C)** Estructura secundaria del esqueleto y las posiciones de la cadena lateral de secuencias activas antiangiogénicas adyacentes que comprenden las hebras y el giro conectivo de un solo surco cargado positivamente en la superficie de TSR2 (Modificado de Grant, 2017).

En humanos, los niveles bajos de TSP-1 pueden contribuir a la fibrosis adiposa en la obesidad, ya que la expresión del ARNm de la TSP-1 se correlaciona positivamente con el IMC (Índice de Masa Corporal) y se relaciona negativamente con la sensibilidad a la insulina (Varma et al., 2010). La TSP-1 también juega un papel en el desarrollo del síndrome metabólico (Chavez et al., 2012, Memetimin et al., 2018), por lo que la TSP-1 circulante puede considerarse como un marcador biológico para definir los fenotipos del síndrome metabólico, la diabetes y la inflamación del tejido adiposo asociado con la obesidad humana (Matsuo et al., 2016).

También se ha demostrado que bajos niveles de TSP-1, están relacionados con la disminución del número de sinapsis excitadoras en la corteza e irregularidades en la arborización dendrítica (Garcia et al., 2010) así como en la cicatrización deficiente de la herida, la disminución del contenido de colágeno y un retraso en la llegada de macrófagos (Jacques, DiPietro, Murphy-Ullrich, Hynese & Lawler, 2011).

## 2.1. TSP-1 y Sistema Nervioso Central

En el SNC, la TSP-1 es sintetizada y secretada principalmente por astrocitos durante el desarrollo postnatal temprano (Asch et al., 1986; Risher & Eroglu, 2012), promoviendo la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neurales (Lu, Kipnis, & Tsp, 1999), migración y adhesión neuronal (Eroglu et al., 2010; Li, Qi, Tong, & Wang, 2013), crecimiento de neuritas (Osterhout, Frazier, & Higgins, 1991; Shea, 1990; Yu, Chung, Deo, Thompson, & Turner, 2008), así como la regulación y mantenimiento de la sinaptogénesis y espinogénesis (Christopherson et al., 2005; Crawford, Xiaoping Jiang, Amanda Taylor, 2013; Eroglu et al., 2010; Hughes, Elmariah, & Balice-gordon, 2011), a través del receptor de gabapentina  $\alpha 2\delta$ -1 (Eroglu et al., 2010) y neurologina-1 (Xu et al., 2010). La TSP-1 incrementa el número de espinas dendríticas y sinapsis en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Dorostkar, Zou, Llorca, & Herms, 2015), síndrome de Down (Garcia, Torres, Helguera, Coskun, & Busciglio, 2010; Torres, Garcia, Tang, & Busciglio, 2017), síndrome



de X frágil (Cheng et al., 2016) y lesión de motoneuronas (Zhao, Franklin, Karadottir, & Fawcett, 2014).

Algunos estudios han reportado que la TSP-1 favorece la recuperación funcional después de lesión o episodio isquémico (Liau et al., 2008), mejora el aprendizaje espacial (Chu, Ko, Wang, & Wang, 2016) e incrementa la excitabilidad en modelos de epilepsia en ratones (Sun, Ma, Zhang, Pan, & Wang, 2018). Estos trabajos en su conjunto sugieren un papel importante de la TSP-1 en la fisiología y patología del SNC. Aunque la mayoría de los trabajos proponen que la TSP-1 es sintetizada y secretada por los astrocitos (Asch, Leung, Shapitot, & Nachman, 1986; Risher & Eroglu, 2012), algunos estudios sugieren que la microglía también podría estar involucrada en la expresión de TSP-1 (Chamak, Morandi, & Mallat, 1994; Chamak, 1995).

### 3. Macrófagos y TSP-1.

Los macrófagos son células del sistema inmune que se forman a partir de monocitos en respuesta a una infección, lesión, inflamación o al cúmulo de células dañadas o muertas (Cavaillon, 2011; Medzhitov, 2008, 2010). Pueden activarse a través de una vía clásica, denominada M1 o inflamatoria, funcionando como células efectoras en las respuestas inmunes celulares Th1; y por la vía alternativa o M2 que es antiinflamatoria y profibrótica, involucrada en la inmunosupresión y la reparación tisular (Mantovani et al., 2004). La activación de estas vías está asociada a través de la activación, y presentación de antígenos, moléculas coestimuladas y citocinas (Mosser, 2003). Las funciones biológicas de los macrófagos activados se han fundamentado en procesos de inflamación patológica (Wu & Zhuo, 2008), y homeostática (Mcnelis & Olefsky, 2014; Weisberg et al., 2003).

Los macrófagos son capaces de producir TSP-1 (Kern, 2014; Lee, Saxena, & Frunza, 2015), generalmente en respuesta de algún tipo de lesión y estrés (Kermorvant-duchemin et al., 2005). Esta producción está asociada a la producción de citocinas como el TGF- y la IL-10, regulando la respuesta inmunológica inflamatoria (Tie et al., 2014).

### 3.1. TSP-1 e inflamación

La inflamación es la reacción de un tejido vivo a un daño local. El proceso de inflamación aguda comienza cuando las células detectan el daño y liberan mediadores químicos llamados citocinas (Chen, Deng, Cui, Fang, & Zuo, 2018). Durante esta fase aguda de la inflamación la TSP-1 es liberada transitoriamente a través de múltiples factores (Lopez-dee, Pidcock, & Gutierrez, 2011); su expresión en neutrófilos, induce una fuerte respuesta quimiotáctica al tejido lesionado (Roberts, 1987). La secreción de TSP-1 en respuesta a la inflamación promueve la resolución del proceso inflamatorio y facilita la fagocitosis de las células dañadas (Dardik et al., 1999). La TSP-1 media la fagocitosis de macrófagos de células apoptóticas vía CD36 y los procesos de inflamación vía óxido nítrico (NO), CD47 (Salajegheh, Raju, Schmidt, & Dalakas, 2007), y receptor activador de proliferación del peroxisoma (PPAR) (Dí & Ortiz-masia, 2012).

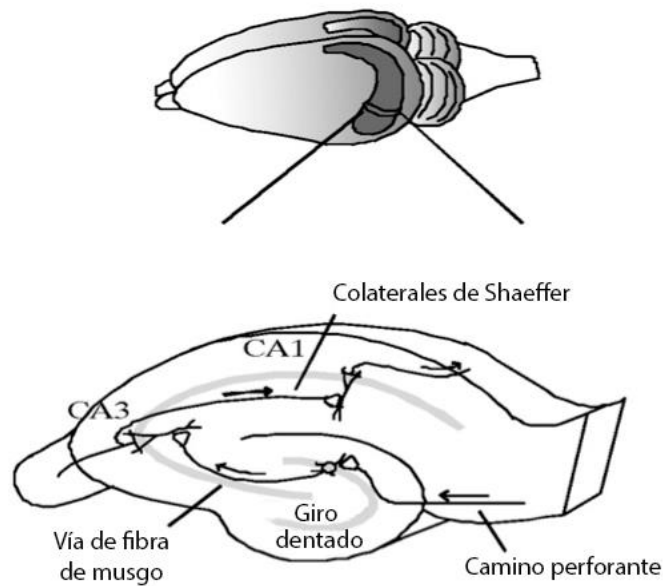
El incremento en la producción de TSP-1 podría ser un mecanismo compensatorio para controlar la respuesta inmune y la protección de tejidos de un daño excesivo (Lopez-Dee et al., 2011). Por otro lado, en condiciones de inflamación crónica, la TSP-1 puede modular el proceso inflamatorio por la inhibición o aumento de la secreción de interleucina 10 (IL-10), por esta vía, la TSP-1 regula la función de las células dendríticas (Dardik et al., 1999). Se ha reportado que la TSP-1 decrece la respuesta inmune por la inhibición de efectores de célula T o por la inducción directa de apoptosis en la célula T (Savill, Dransfield, Gregory, & Haslett, 2002). La TSP-1 ejerce un poderoso efecto angiogénico y esta función tiene un impacto significativo en la inflamación crónica (Haviv et al., 2005; Zak, Treven, Nash, & Gutierrez, 2008), sugiriendo que la expresión de la TSP-1 es esencial para mantener una respuesta inmune (Ng, Turpie, & Masli, 2009; Zamiri, Masli, Kitaichi, Taylor, & Streilein, 2004). Durante el desarrollo del SNC, los macrófagos liberan TSP-1 de forma activa, promoviendo el crecimiento de neuritas (Chamak, Morandi, & Mallat, 1994). Las microglías son consideradas los macrófagos del SNC sin embargo, se desconoce si la microglía puede expresar TSP-1, y si esta tiene alguna función dentro del SNC (Ginhoux et al., 2013; Michelucci, 2017). Por lo que en esta tesis se buscó conocer si la TSP-1 se expresa en la microglía del hipocampo de ratón.

## ANTECEDENTES

### 1. El hipocampo: anatomía y funciones

El hipocampo es una estructura que se sitúa dentro de la circunvolución parahipocampal en el asta temporal inferior del ventrículo lateral (Roth, 1993). Los subcampos del hipocampo incluyen cuatro compartimentos de *Cornus Ammonis* (CA1-CA4) y el complejo del subículo que incluye, además del subículo, el pre y el parasubículo. El giro dentado y el hipocampo forman dos anillos en forma de C que se entrelazan, mientras que el subículo es la zona de transición que une al hipocampo con el giro dentado (Kizilirmak et al., 2019). Los subcampos son estructuralmente similares en todas las especies de mamíferos (Amaral, Scharfman, & Lavenex, 2008) por lo que su estudio en roedores puede proporcionar información sobre el hipocampo humano (Mattison, Vaughan, & Branch, 2018) (Figura 3).

Tradicionalmente el hipocampo se ha asociado a la regulación del aprendizaje, codificación y consolidación de la memoria y sociabilización (Lisman et al., 2017). El hipocampo está estrechamente asociado con la amígdala, el septo y los cuerpos mamilares, de modo que cualquier estimulación de las partes cercanas también estimulan al hipocampo (Li et al., 2019).



**Figura 3.** Cerebro de ratón, el cual señala la estructura del hipocampo, sus circuitos y subregiones anatómicas (regiones: CA1, CA2, CA3, giro dentado, colaterales de Schaeffer, camino perforante) dentro de un corte transversal del hipocampo (Modificado de Nguyen, 2006).

## 2. Las células gliales.

Las células gliales son el tipo celular más abundante en casi todas las subregiones del cerebro de los mamíferos (Pfrieger & Barres, 1995). Los estudios que cuantifican experimentalmente los números de células gliales en cerebros de mamíferos han demostrado que, entre el 50% - 90% de todas las células en el cerebro humano, de primates y roedores, son glías, con diferencias entre diferentes áreas del cerebro y etapas del desarrollo (Farfel et al., 2009; Herculano-houzel, & Barton, 2009; Pelvig, Pakkenberg, Stark, & Pakkenberg, 2008).

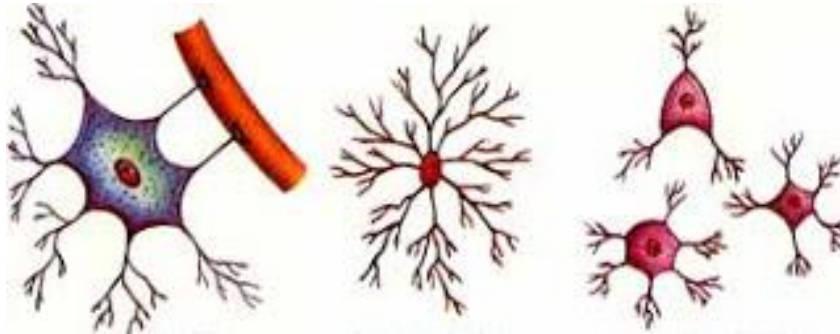
De acuerdo a su morfología, función y ubicación en el sistema nervioso, la glía se clasifica en dos grandes grupos (Zhang, 2001). El primero llamado macroglía que a su vez se subdivide en: 1) astrogλία, que incluye a los astrocitos, glía radial y células epidemiales; 2) oligodendroglía, que incluye propiamente a los oligodendrocitos y a las células de Shwann;

y 3) la glía NG2+ o células progenitoras NG2 (Dimou & Gallo, 2016) y el segundo grupo incluye a la microglía. Las macroglías tradicionalmente se consideran como células de soporte, mientras que las microglías se consideran como las células inmunes del cerebro (Reemst, Noctor, Lucassen, Hol, & Nolan, 2016) (Figura 4).

Los astrocitos son el tipo de célula más abundante en el cerebro (Volterra & Meldolesi, 2005), sus funciones están presentes durante el desarrollo, mantenimiento y plasticidad del SNC (Oberheim, Wang, Goldman, & Nedergaard, 2006), por lo que brindan soporte trófico para las neuronas, promueven la formación, poda y función de las sinapsis, además de cumplir con una variedad de otras funciones de mantenimiento homeostático (Chung et al., 2014; Clarke & Barres, 2015; Liddelov, Barres, & Barrier, 2015; Sofroniew & Vinters, 2015). A través de este contacto cercano con las neuronas, los astrocitos pueden modular la eficacia de las sinapsis mediante la liberación y la captación de sustancias neuroactivas (Eroglu, 2009).

Los oligodendrocitos y las células de Shawn tienen como función la mielinización, que es necesaria para la integridad y la supervivencia de los axones, (Nave & Werner, 2014). Los oligodendrocitos proporcionan a los axones metabolitos ricos en energía, y su pérdida está asociada directamente a enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica y la atrofia de múltiples sistemas (Mot, Depp & Nave, 2018).

El antígeno nervioso / glial 2 (NG2) es un proteoglicano de sulfato de condroitina que en el cerebro se clasifica principalmente en una clase de células gliales llamadas NG2-glia (Nishiyama et al. 2009) o en pericitos asociados con vasos sanguíneos (Ozerdem et al. 2001) En el SNC, la NG2-glia representa una población de células cerebrales que es distinta de las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.



**Figura 4.** Morfología de los diferentes tipos de células gliales; astrocito, microglía y oligodendrocito (respectivamente) (Modificado de Martínez, 2014)

## 2.1. Microglía

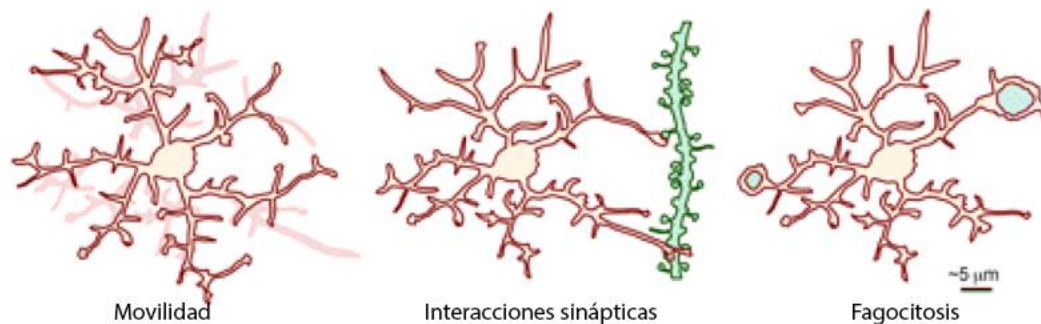
La microglía se origina de los macrófagos del saco vitelino, desde donde migra hacia el SNC durante el desarrollo prenatal (primeros 10 días) (Ginhoux et al., 2013). La microglía representan el 10 por ciento de las células gliales (Romano, 2011) y son consideradas las células del sistema inmune del cerebro (Paolicelli et al., 2011; Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhratsky, 2011). La microglía responde y forma señales inflamatorias en situaciones de infección, lesiones o daño en el SNC (Kohsaka & April, 2001) para lo cual pasa a través de tres estados: 1) microglía en reposo, 2) microglía activa o en estado proinflamatorio y 3) microglía fagocítica o estado antiinflamatorio.

En condiciones fisiológicas normales, la microglía se encuentra en un estado de reposo-vigilancia, limpiando los desechos celulares y células apoptóticas (Liddel et al., 2017). Sin embargo, en condiciones inflamatorias o de riesgo para el cerebro, la microglía pasa de tener función de vigilancia inmune a funciones de fagocitosis, produciendo citoquinas inflamatorias y presentando antígenos en presencia de un estímulo inmune (Perry et al., 2003). La microglía activa es capaz de adquirir dos fenotipos: 1) la microglía activa o de estado proinflamatorio (M1), que responde a la lesión o infección mediante la producción de citoquinas proinflamatorias como interferones (IFN) tipo I, interleucinas como son las citoquinas IL-1 IL-6, IL-12, TNF  $\alpha$  y  $\beta$ , e IFN- $\gamma$  y quimiocinas proinflamatorias para inducir la infiltración de leucocitos periféricos en el tejido con el fin de combatir y eliminar la infección (Wendeln et al., 2018) y 2) microglía fagocítica o estado antiinflamatorio (M2).

En el estado M2, se produce el efecto contrario con la secreción de citoquinas anti-inflamatorias (Ransohoff, 2016), regulando la inflamación del estado M1, facilitando la fagocitosis de los restos celulares y promoviendo la reconstrucción de la matriz extracelular y la reparación de tejidos (Arcuri, Mecca, Bianchi, Giambanco, & Donato, 2017) por medio de la liberación del TGF- $\beta$  e IL-10 y con la ayuda de la galactina-1 (Gal-1), que es secretada por los astrocitos (Starossom et al., 2013). Sin embargo, la relación entre microglía y TSP-1 durante el proceso inflamatorio no ha sido totalmente explorada.

Además de su papel inmune la microglía también desempeña un papel fundamental en procesos del desarrollo normal del cerebro (Pfeiffer, Avignone, & Nägerl, 2016) (Figura 5). Está involucrada en la poda sináptica (Fuentes et al., 2016); establecimiento y remodelación de circuitos neuronales (Schafer et al., 2012); maduración sináptica (Parkhurst et al., 2014); neurogénesis (Cunningham, Martinez-Cerdeno, & Noctor, 2013; Ueno et al., 2013); crecimiento axonal (Chamak et al., 1994); muerte celular programada (Wakselman et al., 2008); eliminación de sinapsis (Verney, Monier, Fallet-Bianco, & Gressens, 2010); y en procesos de mielinización (Miron et al., 2013). Además existen evidencias que la microglía está implicada en enfermedades y lesiones del SNC (Helmut Kettenmann, Kirchhoff, & Verkhratsky, 2013; Schafer et al., 2012), como el infarto cerebral (Perry, 1998) y el desarrollo activo de enfermedades crónicas (Prinz & Priller, 2014; Wu et al., 2014) como son la enfermedad de Alzheimer (Liu & Quan, 2018) y la esclerosis lateral amiotrófica (Lee et al., 2016). Lo que sugiere que la microglía es esencial para el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Datta et al., 2018).

En modelos de axotomía del nervio facial y en ojos tratados con fotocoagulación con láser se ha observado una expresión de la TSP-1 en respuesta a una lesión tanto en neuronas y microglía (Chan et al., 2005, Binz et al., 2005, Ng et al., 2009). También se ha reportado una fuerte inmunorreactividad a la TSP-1 en los vasos sanguíneos de retina (Suzuma, Takagi, & Otani, 1999), y en microglía estriatal durante su transformación a macrófagos fagocíticos (Chamak et al., 1994). La expresión de la TSP-1 por macrófagos apoya su función antiinflamatoria (Masli, Turpie, Hecker, & Wayne, 2015; Masli, Turpie, & Streilein, 2009) pero su importancia en la microglía no se ha establecido totalmente



**Figura 5.** Comportamiento de la microglía en el cerebro. Los procesos microgliales remodelan continuamente su entorno local (izquierda), interactúan estructural y funcionalmente con elementos sinápticos como las espinas dendríticas (centro; espinas dendríticas: verdes) a través de contactos directos e intercambios de señales moleculares. Y contribuyen a la reestructuración de los circuitos neuronales mediante fagocitosis de los elementos sinápticos (derecha) (Modificado de Tremblay et al., 2011).



## 2.2. Microglía y expresión de TSP-1 en el hipocampo.

La distribución de las células microgliales en el hipocampo se ha demostrado a través de diferentes métodos estereológicos (Long et al., 1998; Savchenko, Mckanna, Nikonenko, & Skibo, 2000; Wirenfeltd, Dalmau, & Finsen, 2003). Estos estudios muestran que la densidad de la microglía en la región CA1 es mayor que en la GD, aunque el número total de microglía también es diferente. Usando la inmunohistoquímica con la molécula adaptadora de unión a calcio ionizada (Iba-1), se encontró que en el hipocampo del ratón la densidad microglial en la región CA3 es más baja que en la región CA1 y la GD, y la densidad de la microglía en la CA1 es mayor que en la GD (Jinno, Fleischer, Eckel, Schmidt, & Kosaka, 2007). Lo que sugiere que la densidad de las células microgliales podría estar involucrada en la vulnerabilidad específica del hipocampo, y que la distribución heterogénea de la microglía podría participar en la modulación de la actividad neuronal del hipocampo (Imai, Ibata, Ito, Ohsawa, & Kohsaka, 1996).

En cultivos primarios de neuronas del hipocampo de rata se ha demostrado que la TSP-1 aumenta la velocidad en el proceso de formación de sinapsis (sinaptogénesis) en la etapa temprana de las neuronas, sin embargo, la TSP-1 no estimula la densidad sináptica en neuronas ya maduras, sugiriendo que la TSP-1 podría inducir un mecanismo para controlar el número total de sinapsis en neuronas del hipocampo (Christopherson et al., 2005). En modelos de síndrome de X frágil (Cheng et al., 2016), síndrome de Down (García et al., 2010) e hipoxia (Tohidpour et al., 2017), se ha observado que los astrocitos presentan un déficit en la secreción de TSP-1, los cuales contribuyen a un desarrollo anormal de las neuronas y de la sinaptogénesis (Cheng, Lau, & Doering, 2016). Adicionalmente se ha observado que la TSP-1 protege contra el daño inducido por el péptido B-amiloide en hipocampo (Kan et al., 2018), sugiriendo que la TSP-1 puede tener un papel importante en la actividad de las células hipocampales. Sin embargo, el papel de la microglía y la TSP-1 en el hipocampo en modelos *in vivo* es desconocido.

### **3. Justificación**

La síntesis y secreción de TSP-1 en el SNC ha sido observada en astrocitos (Asch et al., 1986; Christopherson et al., 2005), en oligodendrocitos (Scott-drew, 1997), en neuroblastomas, astrocitomas (Pijuan-thompson et al., 1999) y en células de Müller (Eichler, Yafai, Keller, Wiedemann, & Reichenbach, 2004). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la microglía también podría estar involucrada en su expresión (Chamak, Morandi, & Mallat, 1994; Chamak, 1995). Particularmente se ha observado que la microglía de ratas puede expresar TSP-1 después de una lesión (Chamak et al., 1994), y también durante el desarrollo del cerebro anterior (Chamak et al., 1995). Mientras que en ratones deficientes de TSP-1, se ha demostrado que una lesión en la retina incrementa la expresión de genes asociados a la inflamación en la microglía (Ma, Wenxin, 2014). Sin embargo, no se conoce totalmente como es la expresión de TSP-1 en la microglía, y si esta expresión es funcional durante un proceso inflamatorio, por lo que en esta tesis se trató de establecer si la microglía del hipocampo de ratón puede expresar TSP-1. Los hallazgos derivados de este proyecto pueden contribuir a un mejor conocimiento sobre la fisiología de la microglía y el papel de la TSP-1 en los procesos de inflamación del SNC.

#### **4. Objetivo general:**

Conocer si la microglía es capaz de expresar TSP-1 en el hipocampo del ratón C57BL/6J.

##### **4.1. Objetivos específicos:**

- 1) Analizar la expresión de TSP-1 en el hipocampo de ratón C57BL/6J.
- 2) Conocer si la TSP-1 es secretada por la microglía del hipocampo de ratón C57BL/6J.
- 3) Conocer si la administración de minociclina altera la actividad de los marcadores de la microglía, de Iba-1 y de IL-6.
- 4) Determinar si la inhibición de la microglía por minociclina, se correlaciona con una baja en la expresión y/o secreción de TSP-1 en el hipocampo del ratón C57BL/6J

#### **5. Hipótesis**

Ho. La microglía del hipocampo de ratón expresa y secreta TSP-1

H1. La microglía del hipocampo de ratón no puede expresar y ni secretar TSP-1

H2. La inhibición de la microglía afectará la expresión y secreción de TSP-1

H3. La inhibición de la microglía no tiene ningún efecto en la expresión y secreción de TSP-1.

## 6. Materiales y Método

### 6.1 Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J, procedentes del bioterio del Laboratorio de Neurobiología del Síndrome de Down, de la Facultad de Psicología, UNAM (Figura 6). Todos los ratones tuvieron una edad de cuatro semanas postnatales después del destete. El destete se realizó en el día 21. Los ratones se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12:12h) con las luces encendidas de 8:00 am a 8:00 pm, con una temperatura y humedad constante. Todo el protocolo se realizó durante la fase de luz. Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* de agua y alimento durante toda la fase experimental. Después de 4 semanas de desarrollo los ratones fueron sacrificados y sus cerebros procesados para la determinación de TSP-1 así como los análisis histológicos. El mantenimiento, manipulación y cuidado de los ratones siguió las reglas establecidas en la norma Oficial Mexicana (NOM-062-200-1999). El uso de los animales y el desarrollo experimental han sido previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Psicología de la UNAM (FPSI/DIP/CE/07/2015).

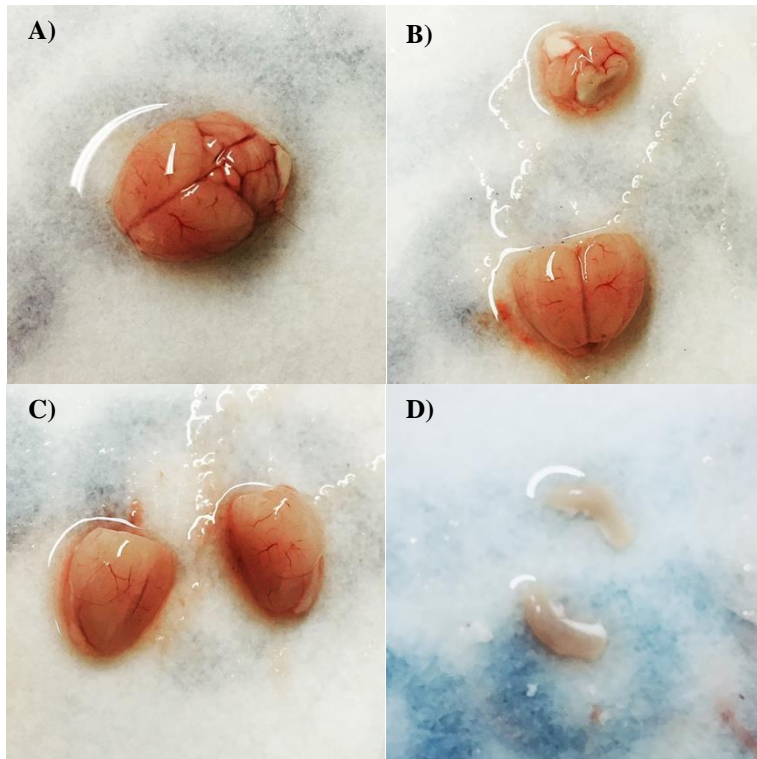
Para los experimentos de inhibición de la microglía, los ratones del grupo experimental fueron inyectados por vía intraperitoneal (ip) con una inyección de minociclina (Silvera Ciencia e Ingeniería S.A de C.V.) de 1 mg/200  $\mu$ L, donde se dejó actuar la reacción del fármaco durante una hora entre cada ratón y para su posterior sacrificio; el mismo procedimiento se aplicó para el grupo control sustituyendo la minociclina con agua destilada como vehículo de control. La minociclina es un antibiótico derivado de las tetraciclinas con acciones antiinflamatorias y que inhibe la actividad de la microglía (Kobayashi, 2013).



**Figura 6.** Ratón de la cepa C57BL/6J. Esta cepa se utilizó durante todo el proceso experimental.

## 6.2 *Disección hipocampal.*

La disección del hipocampo se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Barón et al. (2018). Los sujetos fueron sacrificados por decapitación rostral en la primera vértebra cervical, posteriormente se empujó la piel del cuero cabelludo hasta el hueso nasal. Se realizó un corte del cráneo siguiendo la línea media para extraer sus capas, una vez expuesto el cerebro, fue retirado de la base del cráneo. Durante la disección, el cerebro se mantuvo en Buffer RIPA (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.5% Desoxicolato de Sodio, 0.1% Dodecil Sulfato de Sodio con inhibidores de proteasas) (Figura 7A). Se realizó un primer corte para retirar el cerebelo (Figura 7B), posteriormente se cortó el cerebro por la línea media separando ambos hemisferios a los cuales se les retiró la capa de la corteza parietal dejando expuesta la corteza temporal donde se podía visualizar el hipocampo (Figura 7C), el hipocampo, a través de la cual se pudo extraer el hipocampo dejando a un lado los núcleos subcorticales. Una vez extraído el hipocampo se procesó para la determinación de la concentración de TSP-1 y de IL-6 (Figura 7D).



**Figura 7.** Disección del hipocampo de ratón C57BL/6J. **A)** Cerebro expuesto después de retirar del cráneo **B)** Separación del cerebelo del resto del cerebro **C)** Corte del cerebro por la línea media separando ambos hemisferios a los cuales se les retiró la capa de la corteza parietal dejando expuesta la corteza temporal donde se podía visualizar el hipocampo, **D)** Hipocampos de ambos hemisferios expuestos.

### 6.3 Tinción de Golgi

La visualización de las microglía se realizó por medio de una modificación de la tinción de Golgi (Vargas, Manzano & Rugerio, 2000). Brevemente, los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (2ml) (Pet's Pharma USA). Los cerebros se procesaron por medio de un ensayo rápido Golgi (FD NeuroTechnologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cerebros se impregnaron en una solución A y B compuestas por dicromato de potasio al 3% y tetraóxido de osmio al 0.3%, las cuales permanecieron en total oscuridad a temperatura ambiente por 15 días. Posteriormente los cerebros se sumergieron en la solución C, compuesta por nitrato de plata al 0.75% para su impregnación durante 72 hrs. Después de este periodo los cerebros se sumergieron en parafina y posteriormente se obtuvieron rebanadas de 70  $\mu\text{m}$  que contenían al hipocampo con un micrótopo (EcoShell) (Figura 8). Finalmente, las rebanadas con los cerebros fueron deshidratadas con alcohol al 70% y montadas en portaobjetos. Los portaobjetos fueron puestos en un horno de disección por tres días y posteriormente tratados con xilol y alcohol absoluto. Las preparaciones se dejaron secar por dos días para su posterior análisis.

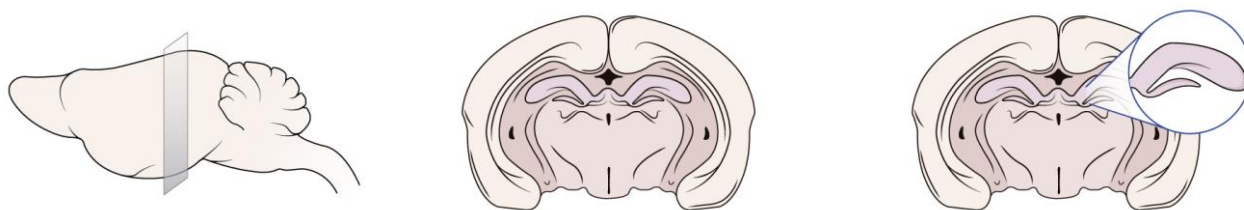
El análisis para identificar cada tipo celular fue tomado de Ranjan & Mallick (2012). Las neuronas se identificaron por su cuerpo celular “triangular” específico de las neuronas piramidales que son frecuentes en el hipocampo; los astrocitos por el tipo de ramificaciones y mayor tamaño en comparación de las neuronas; y por último las microglías se detectaron por su cuerpo celular “aplastado” y su tamaño más pequeño que el resto de las células, teniendo cuidado de no confundirlas con las células epiteliales. En este análisis los oligodendrocitos no pudieron ser identificados.

#### *6.4 Tinción de Nissl*

La tinción de Nissl se utilizó para identificar la morfología de las células nerviosas. La tinción utiliza el violeta de cresilo para identificar ácido nucleico, lo que permite visualizar los núcleos celulares, y a partir del diámetro del núcleo identificar neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía (John, Barbas, & Zikopoulos, 2016). La tinción de Nissl se llevó a cabo por medio del kit FD Rapid MultiStain (FD NeuroTechnologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (2ml) (Pet's Pharma USA). Posteriormente los cerebros se obtuvieron y fijaron con PFA/PBS al 4% por 12 horas seguidos de lavados con agua destilada, y sumergidos en alcohol al 70% para su proceso de deshidratación y aclaramiento. Los cerebros se colocaron en bloques de parafina, y se cortaron en rebanadas de 20  $\mu$ m con un micrótopo (EcoShell), las rebanadas se montaron en portaobjetos (Figura 8). Los cerebros se sumergieron dos veces durante 10 minutos en xilol para su desparafinación; seguido de baños de alcohol en concentraciones decreciente (100%, 96%, 80%, 50%), por 10 minutos cada una. Solo el alcohol 100% tuvo 2 baños. Posteriormente el tejido se sumergió durante 5 minutos en agua destilada seguido por una incubación en solución de violeta de cresilo al 0.1 % por 8 minutos. Los tejidos se lavaron dos veces por 10 minutos con agua destilada, etanol 100% y xilol. Finalmente, los tejidos se cubrieron con una resina de montaje y un cubreobjetos para su posterior análisis al microscopio.

La cuantificación celular se realizó con el programa de ImageJ, tomando fotografías con un aumento de 40X, se seleccionaron diferentes regiones del hipocampo de manera aleatoria y se realizó el conteo con el programa de ImageFocus clasificando las células de acuerdo a la forma de su cuerpo celular, identificando neuronas, astrocitos, microglías y oligodendrocitos.





**Figura 8.** Representación de un corte coronal de cerebro de ratón C57BL/6J (izquierda); representación de las rebanadas para las tinciones de Nissl y Golgi (centro); y aumento del hipocampo (derecha).

### 6.5 Cuantificación de TSP-1 e IL-6

Los niveles de TSP-1 se determinaron para el hipocampo completo, a través de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en el uso de un antígeno o anticuerpo que son marcados con una enzima, dando como resultado una actividad inmunológica y enzimática de los conjugados que se producen. La reacción antígeno-anticuerpo queda estable e inmóvil, esto da como resultado que sea fácil ser revelada mediante su adición a un sustrato específico, el cual, al actuar, hace que la enzima produzca un color fácilmente observable y cuantificable mediante el espectrofotómetro. La intensidad del color es proporcional a la concentración de la proteína de interés. Brevemente los hipocampos previamente disectados se homogenizaron en un buffer RIPA (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.5% Desoxicolato de Sodio, 0.1% Dodecil Sulfato de Sodio con inhibidores de proteasas). El homogenizado se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C para poder separar la fracción soluble. Los niveles de TSP-1 se determinaron mediante un kit comercial de ELISA para TSP-1 (R&D system, Cat.DTSP10-KIT), de acuerdo al manual de instrucciones. Los niveles de TSP-1 fueron obtenidos a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de TSP-1 (7.81 ng/ml, 15.6 ng/ml, 31.3 ng/ml, 62.5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml) en un lector de microplatos iMark (BioRad) a una longitud de 450-530nm y los resultados se expresan como ng/ml (García et al.,2010).

Los niveles de IL-6 también se determinaron a partir de la región completa del hipocampo a través de un kit comercial de ELISA (Mouse IL-6 RABO308- Kit, Sigma-Aldrich). La expresión de los niveles de IL-6 se determinó a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de IL-6 (600 pg/ml, 200 pg/ml, 66.7 pg/ml, 62.5 ng/ml, 22.2 pg/ml, 7.4 pg/ml, 2.5 pg/ml y 0.82 pg/ml) en un lector de microplatos iMark (BioRad) a una longitud de 450-490nm y los resultados se expresan como pg/ml.

### *6.6 Detección de microglía*

La actividad de microglía se determinó mediante un Western Blott como se describe en Baron Mendoza et al., (2018). Brevemente los hipocampos se homogenizaron en un buffer de lisis con inhibidores de proteasas (10 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotretitol, 30% glicerol, 1% Tritón X-100, 15 mM de azida de sodio, 1mM EDTA, 2g/ml leupeptina, 2 g/ml aprotinina, 1 mM PMSF). El homogenado se centrifugó a 15,000 rpm, 4 °C por 15 minutos y se conservó el sobrenadante. Posteriormente las proteínas se separaron por electroforesis y transferidas a membranas de nitrocelulosa marcadas con el anticuerpo anti-Iba-1 (WAKO 019-19741) con una dilución de 1:500, el cual es un marcador específico de microglía con un peso molecular de 18 kDa (Doyle, Eidson, Sinkiewicz, & Murphy, 2017), y reveladas con un anticuerpo secundario específico a una dilución de 1:500. (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 594, ThermoFisher Scientific) con una dilución de 1:500. Las membranas se observaron en un equipo de quimioluminiscencia (Kodak Biomax Light Film). La densidad de las bandas se realizó usando el programa ImageJ 1.45S (NIH).

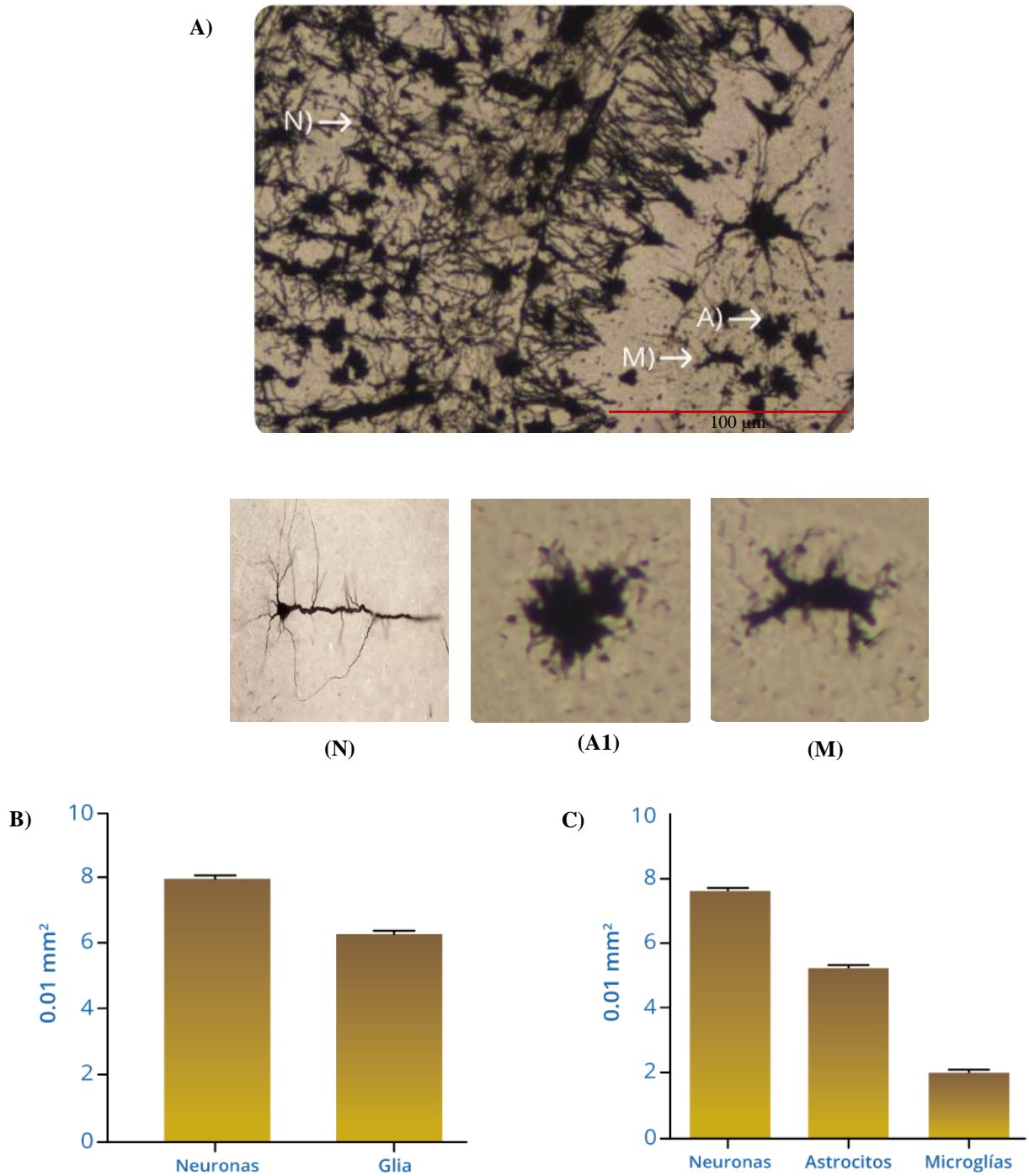
### *7.7 Análisis estadístico*

El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la aplicación estadística GraphPad Prism. Utilizando una prueba de ANOVA, para muestras no paramétricas, para el análisis comparativo entre grupos. La comparación de los grupos control y experimental se realizó con una prueba T-Student para muestras relacionadas para el análisis entre la relación de la TSP-1 y microglía. Los niveles de significancia fueron establecidos con un valor de  $p \leq 0.05$ , los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar.

## **7. Resultados**

### *7.1 Densidad celular (Golgi)*

Con el fin de identificar los diversos tipos celulares que se encontraban en el hipocampo del ratón C57BL/6J se realizó una tinción de Golgi. El método de Golgi permite identificar neuronas y células gliales (Ranjan, & Mallick, 2012) (Figura 9A). Para este análisis los cerebros de ratones de 21 días de edad fueron procesados por medio de una tinción de Golgi. Se analizaron 30 rebanadas con un grosor de 75  $\mu\text{m}$  cada una por ratón. La densidad celular se llevó a cabo contando las células a un aumento de 40X en un área de 0.01mm<sup>2</sup> con un método a ciegas para disminuir la influencia del observador sobre los resultados. Con este método se pudo comprobar que hay una mayor cantidad de células neuronales que células gliales (Figura 9B). Un análisis por tipo celular demostró que las neuronas representan el 62.90%, astrocitos el 37.09% y la microglía el 15.32% (Figura 9C). Estos datos en su conjunto demuestran que con la impregnación de Golgi las neuronas son el tipo celular con mayor presencia en las regiones del hipocampo en comparación de la glía, sin embargo, se mantiene la proporción de microglía.

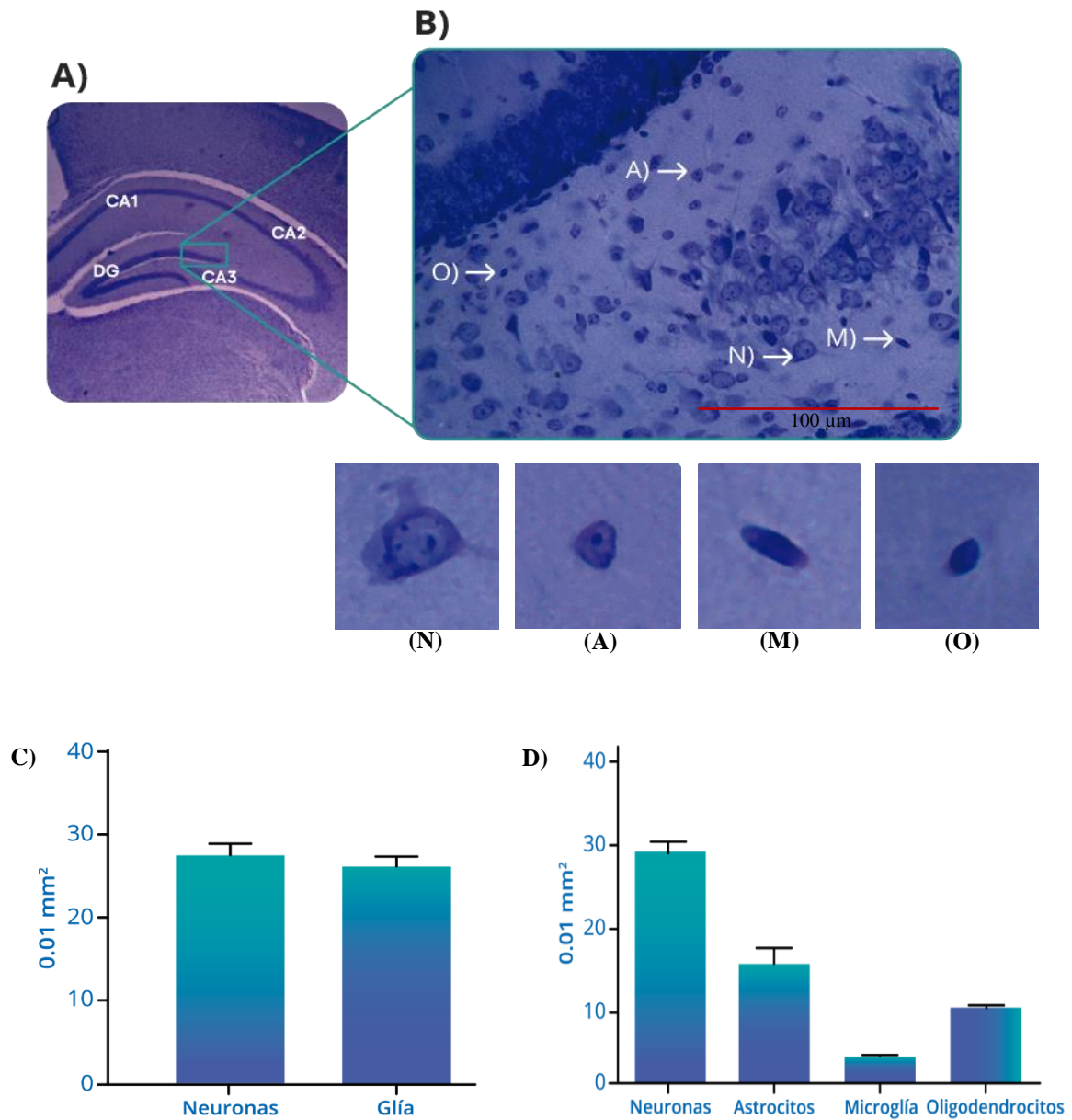


**Figura 9.** Densidad de neuronas y glía detectada con la tinción de Golgi. **A)** Corte coronal a través del eje transversal del hipocampo, donde se observan los diferentes tipos celulares con la tinción de Golgi: (N) Neurona, (A) Astrocito, (M) Microglía. Escala de la barra = 100  $\mu\text{m}$ . **B)** Total de células nerviosas, (neuronas,  $7.8 \pm 0.005$ ; astrocitos/microglía,  $6.3 \pm 0.05$ ). **C)** Tipo celular de observado en las preparaciones hipocampales (neuronas=  $7.8 \pm 0.005$ ; astrocitos=  $4.6 \pm 0.1$ ; microglía=  $1.9 \pm 0.003$ ).

## 7.2 Densidad celular (Nissl)

Con el objetivo de corroborar los diferentes tipos celulares encontrados con la impregnación de Golgi, se realizó un análisis de tipo celular a través de la tinción de Nissl. Se analizaron 30 rebanadas bien preservadas cada una por ratón (Figura 10A). Un conteo celular se llevó a cabo cuantificando las células hipocampales a un aumento de 40X en un área de  $0.01\text{mm}^2$  con un método a ciegas para disminuir la influencia del observador sobre los resultados. Las células fueron clasificadas de acuerdo a su diámetro y morfología (Figura 10B) en neuronas (N), astrocitos (A), microglía (M) y oligodendrocitos (O).

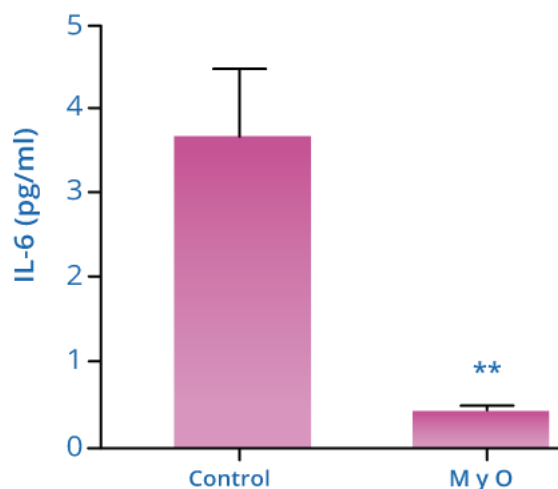
El análisis cuantitativo demostró un número similar de neuronas y glía (Figura 10C), un análisis más detallado demostró que los astrocitos, oligodendrocitos y microglía mantienen la densidad celular descrita para las células gliales, siendo la microglía la menor población celular encontrada (Figura 10D).



**Figura 10.** Densidad de neuronas y glía, detectada con la tinción de Nissl. **A)** Corte coronal a través del eje transversal del hipocampo, donde se observan las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD) con la tinción de Nissl. **B)** Amplificación del corte donde se muestran los diferentes tipos celulares analizados con la tinción de Nissl: (N) Neurona, (A) Astrocito, (M) Microglía y (O) Oligodendrocito. **C)** Total de neuronas y células gliales (neuronas=  $27.6 \pm 0.06$ ; astrocitos, microglía y oligodendrocitos=  $26.3 \pm 0.1$ ). Escala de la barra = 100  $\mu$ m. **D)** Tipo celular observado (neuronas=  $27.6 \pm 0.06$ ; astrocitos=  $14.2 \pm 0.05$ ; microglía=  $3.1 \pm 0.1$ ; oligodendrocitos =  $9.05 \pm 0.04$ ).

### 7.3. El tratamiento con minociclina disminuyó los niveles de IL-6.

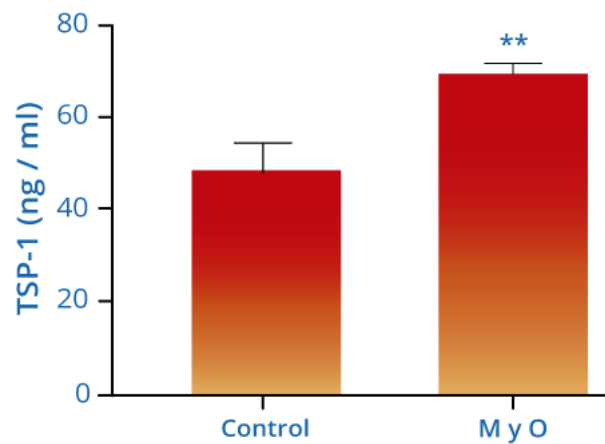
Con el fin de determinar la actividad inflamatoria de la microglía observada por la impregnación de Golgi y la tinción de Nissl, los ratones fueron inyectados con minociclina, un inhibidor de la actividad de la microglía, y se cuantificaron los niveles de IL-6 (marcador específico de la actividad microglial), con un inmunoensayo ELISA. Los resultados demostraron que la minociclina fue capaz de reducir más de un 80% la secreción de los niveles de la IL-6, en comparación con el grupo control (Control=  $4.43 \pm 1.16$  pg/ml; MyO=  $0.43 \pm 0.06$  pg/ml) (Figura 11), demostrando que la actividad microglial es inhibida con la minociclina.



**Figura 11.** Niveles de IL-6 en el hipocampo del ratón C57/BL6. Los ratones con el tratamiento de minociclina mostraron una disminución significativa en los niveles de IL-6 en comparación con el grupo control ( $p= 0.0085$ ), los datos son expresados como el promedio  $\pm$  error estándar \*\* $p<0.05$ .

#### 7.4. La inhibición de la microglía incrementó los niveles de TSP-1

Con el fin de determinar si la inhibición de la microglía podría afectar la secreción de la TSP-1, se cuantificaron los niveles de TSP-1 mediante un inmunoensayo de ELISA. Los resultados demostraron que la inhibición en la actividad de la microglía indujo un incremento significativo en los niveles de TSP-1 comparado con los grupos control (Control=  $48.65 \pm 3.08$ ; MyO=  $64.04 \pm 2.70$  ng/ml) (Figura 12). Estos resultados sugieren que la microglía podría modular la secreción de la TSP-1.

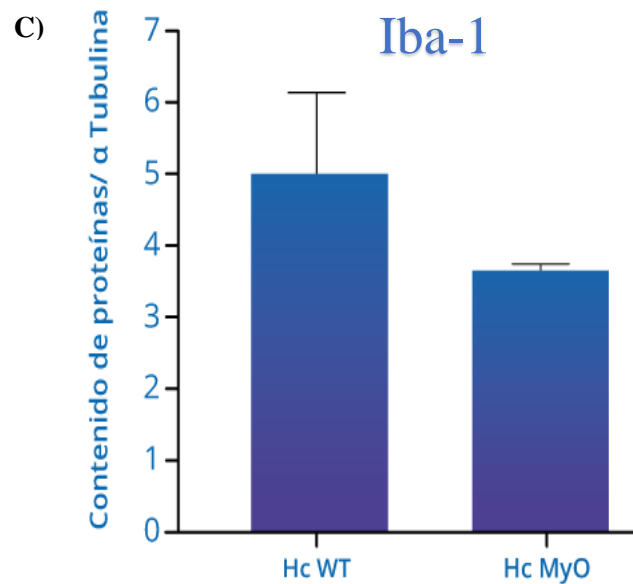
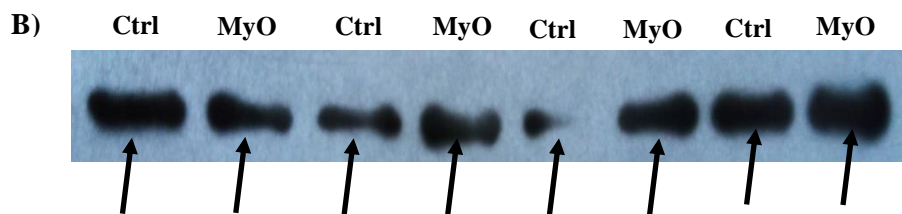
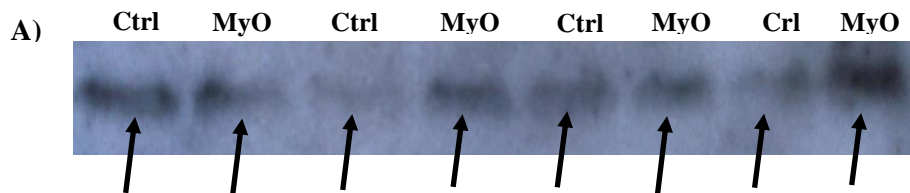


**Figura 12.** La inhibición de la microglía incrementa los niveles de TSP-1. Los ratones tratados con minociclina presentaron un aumento significativo en los niveles de TSP-1 comparados con el grupo control ( $p= 0.005$ ), los datos fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar  $**p<0.05$ .



### 7.5 El tratamiento con minociclina no alteró la expresión de Iba-1

Con el fin de demostrar indirectamente si la minociclina incide en la actividad de la microglía en el hipocampo, que se piensa, puede estar involucrada en la secreción de TSP-1, se realizó un Western Blot (WB) en el hipocampo de ratones tratados con el antibiótico. Los resultados mostraron que la minociclina produce una disminución en la expresión de Iba-1, sin embargo, esta reducción no es estadísticamente significativa sugiriendo que la microglía permanece intacta.



**Figura 13.** El tratamiento con minociclina no altera la expresión de Iba-1. A) Expresión de la proteína de Iba-1 en ratones inyectados con minociclina (MyO) y ratones control (Ctrl) el peso molecular es expresado en kDa Las flechas muestran el peso molecular de Iba-1, tanto del grupo control como el grupo de ratones tratados con MyO. B) La cuantificación de la expresión de Iba-1 en los ratones tratados con minociclina no presentó una disminución significativa en la cantidad expresada de Iba-1 comparados con el grupo control ( $p= 0.052$ ) los datos fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar \* $p<0.05$ .

	Iba-1	Tubulina	Iba-1/Tub
1 Ctrl	39550,238	53572,066	0,738262325
1 MyO	30103,116	36087,581	0,8341682974
2 Ctrl	18221,409	26694,217	0,6825976203
2 MyO	38528,459	35338,045	1,090282697
3 Ctrl	38326,288	12642,489	3,031546082
3 MyO	32266,288	38654,51	0,8347354034
4 Ctrl	29396,752	45524,167	0,6457394816
4 MyO	50477,61	53045,267	0,951594984

## 8. Discusión

En el presente trabajo se trató de ver la relación que existe entre la actividad de la microglía y la expresión de los niveles de TSP-1. Se logró identificar a la microglía en el hipocampo del ratón C57BL/6J a través de la impregnación de Golgi y la tinción de Nissl. Ambas tinciones pueden identificar el tipo celular, la técnica de Nissl en función del diámetro del núcleo de la célula, y la impregnación de Golgi por medio de la morfología, mostrando información sobre la densidad y morfología de las neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos. Los resultados mostraron que la densidad de células neuronales y células gliales en el hipocampo de ratón, es similar con la tinción de Nissl, y el número de neuronas es mayor con Golgi; resultados similares han sido publicados por Von Bartheld (2016). Sin embargo, en el caso de la tinción de Golgi, no se pudo comprobar la morfología de los oligodendrocitos, probablemente por el tiempo de exposición al que fueron sometidos los cerebros, por lo que se omitió en el conteo celular, tomando en cuenta sólo a neuronas, astrocitos y microglías. Como se muestra en la figura 9 y en la figura 10, con ambos métodos se confirmó que la microglía pertenece a la población con menor presencia de las células

gliales, lo cual coincide con datos previamente reportados (Béchade, et al., 2013). Estas técnicas fueron útiles para distinguir entre los tipos celulares y comprobar que en el hipocampo de los ratones estuviera presente la microglía.

La actividad de la microglía resulta muy relevante en regiones como el hipocampo, dado que la microglía participa activamente en la neurogénesis del hipocampo adulto y la función cognitiva y conductual (Gemma & Bachstetter, 2013). Durante la neurogénesis del hipocampo en adultos, la mayoría de las células recién nacidas se someten a apoptosis y son fagocitadas rápidamente por la microglía residente para prevenir el desbordamiento de su contenido intracelular (Gebara, Sultan, Kocher-brassant, & Toni, 2013). Sin embargo, posteriormente, la microglía fagocítica reprogramada actúa como un sensor de la muerte celular local, modulando el equilibrio entre la proliferación celular y la supervivencia celular en el nicho neurogénico, lo que apoya el mantenimiento a largo plazo de la neurogénesis del hipocampo adulto (Diaz-Aparicio et al., 2019).

Además se ha visto que, procesos de la microglía pueden experimentar cambios significativos en el número y la distribución espacial de acuerdo con los diferentes estados funcionales de las células gliales en la región del hipocampo CA1 de ratas jóvenes durante inflamación crónica (Nosi, Lana, Grazia, & Giovanni, 2016).

Con el fin de demostrar si en nuestras condiciones experimentales, la microglía sufría de cambios en su actividad, se realizó una inhibición de esta con minociclina. La minociclina es conocida por su acción inhibitoria en la actividad de la microglía, principalmente atenuando la inducción de la expresión de marcadores de microglía M1, los cuales están involucrados en funciones proinflamatorias (Kobayashi, 2013). Para mostrar la funcionalidad del fármaco, se midieron los niveles de IL-6 (Figura 11), la cual es una citocina proinflamatoria, conocida como un indicador para detectar la actividad microglial (Garner, 2018), los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de IL-6, comprobando el efecto de la minociclina sobre la actividad de la microglía. El siguiente objetivo fue tratar de demostrar si la microglía estaba implicada en la secreción de TSP-1, para lo cual se midieron los niveles de TSP-1 en presencia de minociclina. Nuestros resultados mostraron que la microglía podría estar modulando la secreción de TSP-1 (Figura 12).

En el SNC, la TSP-1 es expresada y sintetizada por los astrocitos, quienes pertenecen al grupo de células gliales, su expresión participa en diversos procesos como: la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neurales (Lu & Kipnis, 1999); la migración y adhesión neuronal (Eroglu et al., 2010); el crecimiento de neuritas (Osterhout, Frazier, & Higgins, 1991; Shea, 1990; Yu, Chung, Deo, Thompson, & Turner, 2008); la regulación de sinaptogénesis y espinogénesis (Christopherson et al., 2005; Crawford, Xiaoping Jiang, Amanda Taylor, 2013; Eroglu et al., 2010; Hughes, Elmariah, & Balice-gordon, 2011, Dorostkar, Zou, Llorca, & Herms, 2015). A pesar de la mayoría de las evidencias que señala que los astrocitos son los principales secretores de-TSP-1 en el cerebro, algunos estudios han propuesto que la TSP-1 puede ser expresada por la microglía durante los primeros estadios del desarrollo (Chamak, 1994, 1995), funcionando probablemente para inducir la sinaptogénesis y espinogénesis (Christopherson et al., 2005; García et al., 2010), así como eliminar el debris celular inducido por la poda neuronal (Verney et al., 2010; Fuentes 2016). Adicionalmente se ha observado la expresión de la TSP-1 en microglía en modelos de degeneración microvascular retiniana (Rivera et al., 2017) y en la conversión del TGF-latente en su forma activa, que se considera inhibidora inmune (Zamiri et al., 2004).

Nuestro estudio demuestra por primera vez que en el hipocampo del ratón la microglía podría estar implicada en la modulación de la secreción de TSP-1, ya que los resultados demostraron que la inhibición en la actividad de la microglía indujo un incremento significativo en los niveles de TSP-1 comparado con los grupos control (Figura 12). En este sentido otros estudios *in vivo* han señalado que los macrófagos tienen la capacidad de producir TSP-1 (Kern, 2014; Lee, Saxena, & Frunza, 2015), en respuesta de algún tipo de lesión (Kermorvant-duchemin et al., 2005), aumentando los niveles de TPS-1 en los vasos de ratas (Stenina et al., 2003) y células progenitoras endoteliales (Tie et al., 2014). La expresión de la TSP-1 es esencial para mantener este tipo de respuesta inmune, gracias a su papel en la producción de interleucinas como la IL-10, que ayudan a la regulación local de una respuesta inmunológica inflamatoria (Ng, Turpie, & Masli, 2009; Zamiri, Masli, Kitaichi, Taylor, & Streilein, 2004). Durante el desarrollo del SNC, los macrófagos en su estado activo liberan TSP-1, promoviendo el crecimiento de neuritas (Chamak, Morandi, & Mallat, 1994), y

apoyando la función antiinflamatoria (Ng et al., 2009; Zamiri et al., 2004), la microglía pudiera estar monitoreando de manera constante el estado inmunológico del cerebro, ante un evento de daño, podría mandar una señal que ayudara a mantener altos niveles de TSP-1 junto con la TSP-1 secretada por los astrocitos para evitar la pérdida de sinapsis. En este sentido las interacciones microglía-astrocitos empiezan a recibir atención por la comunidad científica (Jha, Jo, Kim, Suk, 2019; Vainchtein & Molofsky et al., 2020)

Para demostrar que el efecto de la minociclina sobre la secreción de la TSP-1, no se debía a un daño del antibiótico sobre las células microgliales se midió la expresión de la proteína Iba-1, la cual está restringida a microglía (Imai, Ibata, Ito, Ohsawa, & Kohsaka, 1996). Los resultados mostraron que, aunque los ratones que fueron inyectados con minociclina expresaron una menor cantidad de la proteína de Iba-1 esta disminución no fue estadísticamente significativa (Figura 13), sugiriendo que la microglía no sufre de cambios en su actividad y que la secreción de TSP-1 e IL-6 es un efecto de la inhibición de la microglía.

Estos resultados en su conjunto sugieren que la microglía puede estar en la modulación de la expresión y secreción de TSP-1. Estudios en curso son realizados para conocer el papel que tiene la microglía y la TSP-1 en procesos de inflamación en el cerebro.

## 9. Conclusiones

1. El número de células obtenido por la tinción de Nissl, muestra una densidad similar de neuronas y células gliales, mientras que en la tinción de Golgi se observa un mayor número de neuronas con respecto a las células gliales, lo cual coincide con la teoría previa revisada y permite identificar a la microglía entre los diferentes tipos celulares en el hipocampo.
2. Tanto la tinción de Nissl como la impregnación de Golgi demostraron que la microglía es la población celular más pequeña del hipocampo de ratón.
3. La inhibición de la microglía por minociclina produce una disminución en los niveles de IL-6 y un incremento en los niveles de TSP-1.
4. La minociclina no afecta de manera significativa la expresión de marcadores de la microglía (Iba-1)
5. Los datos en su conjunto sugieren que la microglía puede modular la expresión de los niveles de TSP-1.

## 10. Referencias

- Adams, J. C. (2001). THROMBOSPONDINS : Multifunctional Regulators of Cell Interactions. *Cell Biology*, 17(2), 25–51. <https://doi.org/1081-0706/01/1115-0025>
- Adams, J. C., & Lawler, J. (2011). The Thrombospondins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), 1–29. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009712>.
- Agah, A., Kyriakides, T. R., Lawler, J., & Bornstein, P. (2002). The Lack of Thrombospondin-1 ( TSP1 ) Dictates the Course of Wound Healing in Double-TSP1 / TSP2-Null Mice. *The American Journal of Pathology*, 161(3), 831–839. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64243-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64243-5)
- Almog, N., Henke, V., Flores, L., Hlatky, L., Kung, A. L., Wright, R. D., Folkman, J. (2006). Prolonged dormancy of human liposarcoma is associated with impaired tumor angiogenesis. *The FASEB Journal*, 20(4), 35–39. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3946fje>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2008). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163(9), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Arber, S., & Caroni, P. (1995). Thrombospondin-4, an Extracellular Matrix Protein Expressed in the Developing and Adult Nervous System Promotes Neurite Outgrowth. *The Journal of Cell Biology*, 131(4), 1083–1094. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.4.1083>
- Arcuri, C., Mecca, C., Bianchi, R., Giambanco, I., & Donato, R. (2017). The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(6), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00191>
- Asch, A. S., Leung, L. L. K., Shapirou, J., & Nachman, R. L. (1986). Human brain glial cells synthesize thrombospondin. *Cell Biology*, 83(4), 2904–2908. <https://doi.org/10.1016.fh/04s0321>
- Barón-Mendoza, I., García, O., Calvo-Ochoa, E., Rebollar-García, J. O., Garzón - Cortés, D., Haro, R., & González- Arenas, A. (2018). Alterations in neuronal cytoskeletal and astrocytic proteins content in the brain of the autistic-like mouse strain C58/J. *Neuroscience Letters*, 682(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.004>
- Bécharde, C., Cantaut-belarif, Y., & Bessis, A. (2013). Microglial control of neuronal activity. *Frontiers in Cellular Neurosciences*, 7(3), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00032>
- Binz, N., Graham, C. E., Simpson, K., Lai, Y. K. Y., Shen, W., Lai, C., Rakoczy, P. E. (2005). Long-term effect of therapeutic laser photocoagulation on gene expression in the eye. *The*

- FASEB Journal*, 21(6), 1–21. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3890fje>
- Blair, P., & Robert Flaumenhaft. (2010). Platelet  $\alpha$  – granules : Basic biology and clinical correlates. *Blood*, 23(4), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>. Platelet
- Bornstein, P. (1995). Diversity of Function Is Inherent in Matricellular Proteins : An Appraisal of Thrombospondin I ' III. *The Journal of Cell Biology*, 130(3), 503–506. <https://doi.org/10.08643-1789.23>
- Bornstein, P. (2001). Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(4), 929–934. <https://doi.org/10.1172/JCI12749>
- Bornstein, P. (2009). Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 213(6) 189–200. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0060-8>
- Bornstein, P., Agah, A., & Kyriakides, T. R. (2004). The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell – matrix interactions , collagen fibril formation , and the response to injury. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(1), 1115–1125. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.012>
- Breitkopf, K., Sawitza, I., Westhoff, J. H., Wickert, L., Dooley, S., & Gressner, A. M. (2005). Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor b effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut*, 54(5), 673–681. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.042911>
- Cavaillon, J. (2011). The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(9), 413–424. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211094>
- Chamak, B. (1995). Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience*, 69(11), 177–187. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00236-C](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00236-C)
- Chamak, B., Morandi, V., & Mallat, M. (1994). Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *Journal of Neuroscience Research*, 38(2), 221–233. <https://doi.org/10.1002/jnr.490380213>
- Chan, C. K., Pham, L. N., Zhou, J., Spee, C., Ryan, S. J., & Hinton, D. R. (2005). Differential expression of pro- and antiangiogenic factors in mouse retinal neovascularization. *Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1126(1) 721–733. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700277>
- Chavez, R., Haney, R. M., Cuadra, R. H., Ganguly, R., Adapala, R. K., Thodeti, C. K., Ohio, N. (2012). Upregulation of Thrombospondin-1 Expression by Leptin in Vascular Smooth Muscle



- Cells via JAK2 and MAPK-dependent pathways. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2(3), 179–191. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00008.2012>
- Chen, H., Herndon, M. E., & Lawler, J. (2000). The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology*, 7(12), 597–614. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00107-4)
- Cheng, C., Lau, S. K. M., & Doering, L. C. (2016). Astrocyte-secreted thrombospondin-1 modulates synapse and spine defects in the fragile X mouse model. *Molecular Brain*, 213(8) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0256-9>
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., ... Barres, B. A. (2005). Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell*, 120(2), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>
- Chu, Y., Ko, C., Wang, W., & Wang, S. (2016). Astrocytic CCAAT / Enhancer Binding Protein  $\delta$  Regulates Neuronal Viability and Spatial Learning Ability via miR-135a. *Molecular Neurobiology*, 53(7), 4173–4188. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9359-z>
- Chung, W., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Chakraborty, C., Joung, J., Barres, B. A. (2014). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7), 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>.Astrocytes
- Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2015). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews, Neuroscience*, 14(5), 311–321. <https://doi.org/10.1038/nrn3484>.Emerging
- Crawford, Xiaoping Jiang, Amanda Taylor, and S. M. (2013). Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity in vitro. *Journal of Neuroscience*, 32(3), 13100–13110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2604-12.2012>.Astrocyte-derived
- Cunningham, C. L., Martinez-Cerdeno, V., & Noctor, S. C. (2013). Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(10), 4216–4233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013>
- Dalla-torre, C. A., Yoshimoto, M., Lee, C., Joshua, A. M., Toledo, S. R. C. De, Petrilli, A. S., ... Squire, J. A. (2006). Effects of THBS3, SPARC and SPP1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer*, 10(10), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-237>
- Dardik, R., & Lahav, J. (1999). Functional Changes in the Conformation of Thrombospondin-1 during Complexation with Fibronectin or Heparin. *Experimental Cell research*, 414,(8) 407–414. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4415>
- Datta, M., Staszewski, O., Raschi, E., Frosch, M., Hagemeyer, N., Tay, T. L., Prinz, M. (2018). Histone Deacetylases 1 and 2 Regulate Microglia Function during Development, Homeostasis,

- and Neurodegeneration in a Context-Dependent Manner. *Immunity*, 48(3), 514–529.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.016>
- Dawson, D. W., Pearce, S. F. A., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A., & Bouck, N. P. (1997). CD36 Mediates the In Vitro Inhibitory Effects of Thrombospondin-1 on Endothelial Cells. *Journal of Cell Biology*, 138(3), 707–717. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.3.707>
- Diaz-Aparicio, I., Paris, I., Sierra-Torre, V., Rodríguez-Iglesias, N., Márquez-Roper, M., & Beccari, S. (2019). Microglia actively remodels adult hippocampal neurogenesis through the phagocytosis secretome. *Biorxiv*, 2(3), 23–45. <https://doi.org/10.1101/583849>.
- Dimou, L., & Gallo, V. (2016). NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*, 63(8), 1429–1451. <https://doi.org/10.1002/glia.22859>.NG2-glia
- Dipietro, L. A., & Polverini, P. J. (1993). Short Communication Angiogenic Macrophages Produce the. *The American Journal of Pathology*, 143(3), 678–684. <https://doi.org/10.1159/000319585>
- Dorostkar, M. M., Zou, C., Llorca, L. B., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer ' s disease : problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, 130(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>
- Ekman, S., Schmitz, M., Paulsson, M., & Zaucke, F. (2006). Thrombospondin-4 and Cartilage Oligomeric Matrix Protein form Heterooligomers in Equine Tendon. *Connective Tissue Research*, 45(7) 85–91. <https://doi.org/10.1080/03008200600584124>
- Eroglu, C. (2009). The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. *Journal of Cell Biology*, 1(11), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0078-y>
- Eroglu, Ç., Allen, N. J., Susman, M. W., Rourke, N. A. O., Young, C., Özkan, E., ... Barres, A. (2010). The Gabapentin Receptor  $\alpha\delta$ -1 is the Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell*, 139(2), 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.025>.
- Farfel, M., Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. E. A. T., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Lent, R. (2009). Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-Up Primate Brain. *The journal of Comparative neurology*, 541(9), 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Frangiannis, N. G. (2015). Matricellular Proteins in Cardiac Adaptation and Disease Nikolaos. *Physiological Reviews*, 92(2), 635–688. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2011>.Matricellular
- Frazier, W. A. (1987). Mini-Review Thrombospondin : A Modular Adhesive Glycoprotein of Platelets and Nucleated Cells. *The Journal of Cell Biology*, 105(8), 625–632.

<https://doi.org/10.1023305519>

- Frolova, E., Pluskota, E., Krukovets, I., Burke, T., Drumm, C., Smith, J. D., ... Stenina, O. I. (2011). Thrombospondin-4 regulates vascular inflammation and atherogenesis. *Circulation Research*, *107*(11), 1313–1325.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.232371>.Thrombospondin-4
- Fuentes, L., Lebenkoff, S., White, K., Gerdts, C., Hopkins, K., Potter, J. E., Sciences, R. (2016). HHS Public Access. *Contraception*, *93*(4), 292–297.  
<https://doi.org/10.1016/j.contraception.2015.12.017>.
- 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), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014200>
- Garner, K., Amin, R., Johnson, R., Scarlett, E., & Burton, E. (2018). Microglia priming by interleukin-6 signaling is enhanced in aged mice. *Journal of Immunology*. *15* (2), 90-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.09.002>
- Gebara, E., Sultan, S., Kocher-braissant, J., & Toni, N. (2013). Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Frontiers in neuroscience*, *7*(8), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00145>
- Gemma, C., & Bachstetter, A. D. (2013). The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(11), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00229>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., & Cuadros, M. A. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(4), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Beau, M. M. L. E., Lemons, R. S., Frazier, W. A., & Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(9), 6624–6628. <https://doi.org/10.101697685>
- Grant, M. A. (2017). Structural Basis for the Functions of Endogenous Angiogenesis Structural Basis for the Functions of Endogenous Angiogenesis Inhibitors. *Cold Spring harbor Symposia on Quantative Biology*, *213*(2), 3-21. <https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.017>
- Hankenson, K. D., Hormuzdi, S. G., Meganck, J. A., & Bornstein, P. (2005). Mice with a Disruption of the Thrombospondin 3 Gene Differ in Geometric and Biomechanical Properties

- of Bone and Have Accelerated Development of the Femoral Head. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 5599–5606. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5599>
- Henkin, J., & Volpert, O. V. (2011). Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of. *Informa Healthcare*, 12(3), 1369–1386. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.640319>
- Herculano-houzel, S., & Barton, R. (2009). The human brain in numbers : a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 3(11), 1–11. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>
- Hughes, E. G., Elmariah, S. B., & Balice-gordon, R. J. (2011). Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.10.004>.Astrocyte
- Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., & Kohsaka, S. (1996). A Novel Gene *iba1* in the Major Histocompatibility Complex Class III Region Encoding an EF Hand Protein Expressed in a Monocytic Lineage 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 862(7), 855–862. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1112>
- Iruela-arispe, M. L., Bornsteint, P., & Sage, H. (1991). Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro *Cell Biology : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 5026–5030. <https://doi.org/10.11711216>
- Isenberg, J. S., Martin-Manso, G., Maxhimer, J. B., & Roberts, D. D. (2009). Regulation of nitric oxide signaling by thrombospondin-1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 182–194. <https://doi.org/10.1038/nrc2561>.Regulation
- Jaffe, E. A., Ruggiero, J. T., Leung, L. L. K., Doylet, M. J., Mckeown-longot, P. J., & Moshert, D. F. (1983). Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix *Cell Biology : Cell Biology*, 80(2), 998–1002. <https://doi.org/10.1045029J>
- Jiménez, B. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature*, 6(1), 41–48. <https://doi.org/10.1038/71517>
- Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V., & Kosaka, T. (2007). Spatial Arrangement of Microglia in the Mouse Hippocampus : A Stereological Study in Comparison with Astrocytes. *Glía*, 1347(6), 1334–1347. <https://doi.org/10.1002/glia>
- Junggubo. (2015). Thrombospondin-1. *Korean Journal Phsy Anthropol*, 28(4), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.005>

- Kaur, S., Martin-manso, G., Pendrak, M. L., Garfield, S. H., Isenberg, J. S., & Roberts, D. D. (2010). Thrombospondin-1 Inhibits VEGF Receptor-2 Signaling by Disrupting Its Association with CD47. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 38923–38932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172304>
- Kazerounian, K. O. Yee, and J. L. (2009). Thrombospondins in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), 700–712. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7486-z>
- Kermorvant-duchemin, E., Sennlaub, F., Sirinyan, M., Brault, S., Andelfinger, G., Ong, H., ... Chemtob, S. (2005). Trans -arachidonic acids generated during nitrative stress induce a thrombospondin-1 – dependent microvascular degeneration. *Nature Medicine*, 11(12), 1339–1345. <https://doi.org/10.1038/nm1336>
- Kern, P. A. (2014). Regulation of Thrombospondin-1 expression in alternatively activated macrophages and adipocytes: role of cellular crosstalk and omega-3 fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(9), 1571–1579. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.01.007>.Regulation
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91(February), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Kizilirmak, J. M., Schott, B. H., Thuerich, H., Sweeney-reed, C. M., Richter, A., & Folta-schoofs, K. (2019). Learning of novel semantic relationships via sudden comprehension is associated with a hippocampus-independent network. *Consciousness and Cognition*, 69(2), 113–132. <https://doi.org/10.1016/j.concog.2019.01.005>
- Klenotic, P. A., Page, R. C., Li, W., Amick, J., Misra, S., & Silverstein, R. L. (2013). Molecular Basis of Antiangiogenic Thrombospondin-1 Type 1 Repeat Domain Interactions With CD36. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 13(7)1655–1662. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301523>
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Sakamoto, K., & Kadomastu, K. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death and Disease*. 23 (3) 7-4. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.54>.
- Kohsaka, S., & April, R. (2001). Microglia : System Activation and eview Their Significance in the Central Nervous Microglial activation flammation. *Journal of Microbiology Society*, 130(6), 169–175. <https://doi.org/10.2174/092986707780597961>
- Lashea, K., Alcorn, J. L., & Hecht, J. T. (2014). Pseudoachondroplasia / COMP — translating from the bench to the bedside. *Matrix Biology*, 37(6), 167–173.

<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.05.006>

- Lawler, J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and -2. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(5), 634–640. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00143-5)
- Lawler, J. (2012). Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(11), 1–13. <https://doi.org/10.jhhd8128P>
- Lawler, J., & Hynes, R. O. (1986). The Structure of Human Thrombospondin , an Adhesive Glycoprotein with Multiple Calcium-binding Sites and Homologies with Several Different Proteins. *The Journal of Cell Biology*, 103(11), 1635-48.<https://doi.org/10.1083/jcb.103.5.1635>
- Lawler, J., Miao, W., Duquette, M., Bronson, R. T., & Hynes, R. O. (2001). Thrombospondin-1 Gene Expression Affects Survival and Tumor Spectrum of p53-Deficient Mice. *The American Journal of Pathology*, 159(5), 1949–1956. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63042-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63042-8)
- Lee, D., Saxena, A., & Frunza, O. (2015). Thrombospondin-1 induction in the diabetic myocardium stabilizes the cardiac matrix, while promoting vascular rarefaction through angiotensin-2 upregulation. *Circulation Research*, 113(12), 1331–1344. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302593>.Thrombospondin-1
- Lee, J., Hyeon, S. J., Im, H., Ryu, H., Kim, Y., & Ryu, H. (2016). Astrocytes and Microglia as Non-cell Autonomous Players in the Pathogenesis of ALS. *Experimental Neurobiology*, 25(5), 233–254. <https://doi.org/10.5607/en.2016.25.5.233>
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Napier, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(1), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>.Neurotoxic
- Liddelw, S., Barres, B., & Barrier, B. (2015). ER FIBROUS SnapShot : Astrocytes in Health and Disease PO SnapShot : Astrocytes in Health. *Cell*, 162(5), 1170–1170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.029>
- Liu, X., & Quan, N. (2018). Microglia and CNS interleukin-1: Beyond immunological concepts. *Frontiers in Neurology*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00008>
- Long, J. M., Kalehua, A. N., Muth, N. J., Hengemihle, J. M., Jucker, M., Calhoun, M. E., Mouton, P. R. (1998). Stereological estimation of total microglia number in mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience Methods*, 84, 101–108.[https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(98\)00100-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(98)00100-9)
- Lopez-dee, Z., Pidcock, K., & Gutierrez, L. S. (2011). Thrombospondin-1 : Multiple Paths to Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2011(5), 10-43. <https://doi.org/10.1155/2011/296069>

- Lu, Z., Kipnis, J., & Tsp, T. (1999). Thrombospondin 1 — a key astrocyte-derived neurogenic factor. *The FASEB Journal*, *24*(6), 1925–1934. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150573>
- Lynch, J. M., Maillet, M., Vanhoutte, D., Schloemer, A., Michelle, A., Blair, N. S., ... Robbins, J. (2013). A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell*, *149*(6), 1257–1268. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.050.A>
- Ma, Y., Qu, B., Xia, X., Yang, L., Kuang, Y., Yang, T., Gu, J. (2015). Glioma-Derived Thrombospondin-1 Modulates Cd14 Cell Tolerogenic Properties. *Cancer Investigation*, *312*(3), 1–6. <https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1010089>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, *25*(12), 677-86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Martínez, A. (2014). Comunicación entre células gliales y neuronas I. Astrocitos, células de Schwann que no forman mielina y células de Schwann perisinápticas. *Revista de Medicina e investigación*, *2*(2), 75-84. [https://doi.org/10.1016/S2214-3106\(15\)30002-9](https://doi.org/10.1016/S2214-3106(15)30002-9)
- Masli, S., Turpie, B., Hecker, K. H., & Wayne, J. (2015). Thrombospondin-1-dependent immune regulation by transforming growth factor- $\beta$ 2-exposed antigen-presenting cells. *Immunology*, *146*(4), 547-56 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2264>
- Matsuo, Y., Tanaka, M., Yamakage, H., Sasaki, Y., Hata, H., Ikai, I., Arbor, A. (2016). Thrombospondin 1 as a novel biological marker of obesity and metabolic syndrome. *Metabolism*, *64*(11), 1490–1499. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.07.016.Thrombospondin>
- Mattison, J. A., Vaughan, K. L., & Branch, G. (2018). An overview of nonhuman primates in aging research. *Experimental Gerontology*, *94*(8), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.12.005.An>
- Mcmorrow, J. P., Crean, D., Gogarty, M., Smyth, A., Connolly, M., Cummins, E., Murphy, E. P. (2013). Tumor Necrosis Factor Inhibition Modulates Thrombospondin-1 Expression in Human Inflammatory Joint Disease through Altered NR4A2 Activity. *The American Journal of Pathology*, *183*(4), 1243–1257. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.029>
- Mcnelis, J. C., & Olefsky, J. M. (2014). Review Macrophages , Immunity , and Metabolic Disease. *Immunity*, *41*(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.010>
- Mcpersons, J., Sage, H., & Bornstein, P. (1981). Isolation and Characterization of a Glycoprotein Secreted Endothelial Cells in Culture. *The Journal of Biological Chemistry*, *256*(21), 11330–11336. <https://doi.org/10.092J391J1>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7), 428-35.

<https://doi.org/10.1038/nature07201>

- Medzhitov, R. (2010). Overview Essay Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 140(6),771-6771-776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Memetimin, H., Li, D., Tan, K., Zhou, C., Liang, Y., Wu, Y., & Wang, S. (2018). Myeloid Specific Deletion of Thrombospondin 1 Protects Against Inflammation and Insulin Resistance in Long-term Diet-induced Obese Male Mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2(11), 1-18.<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00273.2018>
- Michelucci, A. (2017). Cellular and Molecular Characterization of Microglia : A Unique Immune Cell Population. *Frontiers in Immunology*, 8(3), 198-3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00198>
- Miller, T. W., S., Keefe, K. I., & Roberts, D. D. (2014). Thrombospondin-1 is a CD47-dependent endogenous inhibitor of hydrogen sulfide signaling in T cell activation. *Matrix Biology*, 32(6), 316-324. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.02.009>.Thrombospondin-1
- Miron, V. E., Boyd, A., Zhao, J. W., Yuen, T. J., Ruckh, J. M., Shadrach, J. L., Ffrench-Constant, C. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nature Neuroscience*, 16(9), 1211-1218. <https://doi.org/10.1038/nn.3469>
- Mosher, D. F., Doyle, M. J., & Jaffe, E. A. (1982). Synthesis and Secretion of Thrombospondin by Cultured Human Endothelial Cells Culture of Endothelial Cells Purification and Iodination of Thrombospondin Radioimmunoassay of Thrombospondin Production and Characterization of Rabbit Antithrombospondin Thromb. *The Journal of Cell Biology*, 10021(11), 343-348. <https://doi.org/10.021-9525/82/05/0343>
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leucocyte Biological*, 73(2), 209-212. <https://doi.org/10.1189/jlb.0602325>
- Mot, A., Depp, C., & Nave, K. (2018). An emerging role of dysfunctional axon-oligodendrocyte coupling in neurodegenerative diseases. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 20(4):283-292. <https://doi.org/10.856572096dial99>
- Mumby, S. M., Abbott-brown, D., Raugi, G. J., & Bornstein, P. (1984). Regulation of Thrombospondin Secretion by Cells in Culture. *The Journal of Cellular Physiology*, 288(3), 280-288. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041200304>
- Murphy-ullrich, J. E. (2001). Matricellular proteins The de-adhesive activity of matricellular proteins : is intermediate cell adhesion an adaptive state ? *The Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 785-790. <https://doi.org/10.1172/JCI12609>
- Murphy, S. M. (2013). Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF- $\beta$ - dependent and independent mechanisms. *Matrix Biology*, 31(3), 178-186.



- <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.01.006>.Thrombospondin1
- Mustonen, E., Aro, J., Puhakka, J., Ilves, M., Soini, Y., Leskinen, H., Rysä, J. (2008). Biochemical and Biophysical Research Communications Thrombospondin-4 expression is rapidly upregulated by cardiac overload. *Europe PMC*, 373 (2), 186–191.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.164>
- Nave KA. & Werner HB. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annual review of cell and developmental biology*. 50 (3), 503–533.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
- Ng, T. F., Turpie, B., & Masli, S. (2009). Thrombospondin-1-mediated regulation of microglia activation after retinal injury. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(11), 5472–5478. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2877>
- Nguyen, P. (2005). Review: Comparative plasticity of brain synapses in inbred mouse strains. *The Journal of Experimental Biology*, 209 (2), 2293-2303. <https://doi.org/10.1242/jeb.01985>
- Nosi, D., Lana, D., Grazia, M., & Giovanni, G. (2016). Interactions between astrocytes and microglial cells in the hippocampus. *Frontiers in Human Neuroscience*, 1 (3), 20-16.<https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends of Neurosciences*, 29(10), 547-53.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>
- Osterhout, D. J., Frazier, W. A., & Higgins, D. (1991). Thrombospondin Promotes Process Outgrowth in Neurons from the Peripheral and Central Nervous Systems. *Developmental Biology*, 265(12), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.74>
- Osz, K., Ross, M., & Petrik, J. (2014). The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-21>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Gross, C. T. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, 333(9), 1456–1459.  
<https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Iii, J. R. Y., Lafaille, J. J., Gan, W. (2014). Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Cell*, 155(7), 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>.Microglia
- Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., & Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *The Journal of Biology and Aging*, 29(4), 1754–1762.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013>

- Perry, V. H. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 90(2), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00145-3)
- Perry, V. H., Newman, T. A., & Cunningham, C. (2003). The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 103–112. <https://doi.org/10.1038/nrn1032>
- Pfeiffer, T., Avignone, E., & Nägerl, U. V. (2016). Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. *Scientific Reports*, 6(2), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep32422>
- Pfrieger, F. W., & Barres, B. A. (1995). What the Fly 's Glia Tell the Fly 's Brain Minireview. *Cell*, 63(1909), 671–674. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90178-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90178-7)
- Posey, K. L., Hankenson, K., Veerisetty, A. C., Bornstein, P., Lawler, J., & Hecht, J. T. (2008). Skeletal Abnormalities in Mice Lacking Extracellular Matrix Proteins , Thrombospondin-1 , Thrombospondin-3 , Thrombospondin-5 , and Type IX Collagen. *The American Journal of Pathology*, 172(6), 1664–1674. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071094>
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), 300–312. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>
- Ranjan, A., & Mallick, B. (2012). Differential staining of glia and neurons by modified Golgi-Cox method. *Journal of Neuroscience Methods*. 11(10), 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.06.023>
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nature Neuroscience*, 19(8), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Raugi, G. J. (1987). Thrombospondin Secretion by Cultured Human Glomerular Mesangial Cells. *American Journal of Pathology*, 129(2), 12–15. <https://doi.org/10.71899722>
- Raugi, J. (2015). Microscopic Thrombospondin Immunolocalization in Human Tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 4(4), 295–302. <https://doi.org/10.1177/33.4.3884704>
- Reed, M., Puolakkainen, P., Lane, T. E., Dickerson, D., Bornstein, P., & Sage, E. H. (1993). Differential Expression of SPARC and Thrombospondin 1 in Wound Repair : Immunolocalization and In Situ Hybridization. *The American Journal of Pathology*, 41(10), 1467–1477. <https://doi.org/10.ame861632>
- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., Hol, E. M., & Nolan, Y. (2016). The Indispensable Roles

- of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10(11), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Resovi, A., Pinessi, D., Chiorino, G., & Taraboletti, G. (2014). Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biology*, 37(7), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.012>
- Risher, W. C., & Eroglu, C. (2012). Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biology*, 31(3), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.01.004>
- Rivera, J. C., Noueihed, B., Madaan, A., Lahaie, I., Pan, J., & Belik, J. (2017). Tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency is associated with augmented inflammation and microvascular degeneration in the retina. *The Journal of Neuroinflammation*, 6(9), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0955-x>
- Roberts, D. D. (2013). The Matricellular Protein Thrombospondin-1 Globally Regulates Cardiovascular Function and Responses to Stress via CD47. *Matrix Biology*, 31(3), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.01.005>.The
- Romano, M. (2011). Mecanismos inflamatorios involucrados en el daño cerebral isquémico agudo. Posibles blancos terapéuticos. Factores pronósticos. *Neurologia Argentina*, 3(3), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2011.06.004>
- Roth, P. (1993). Microsurgical anatomy of the hippocampal arteries. *Journal of Neurosurg*, 79(8), 256–265. <https://doi.org/10.3171/jns.1993.79.2.0256>
- Roudier, E., Birot, O., Slopach, D., Montelius, A., Gustafsson, T., & Haas, T. L. (2014). Endothelial FoxO1 is an intrinsic regulator of thrombospondin 1 expression that restrains angiogenesis in ischemic muscle. *Angiogenesis*, 16(4), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s10456-013-9353-x>
- Sage, H., Pritzl, P., & Bornstein, P. (1981). Secretory Phenotypes of Endothelial Cells in Culture: Comparison of Aortic, Venous, Capillary, and Corneal Endothelium. *Arteriosclerosis*, 1(6), 427–442. <https://doi.org/10.1161/01.atv.1.6.427>
- Savchenko, V. L., Mckanna, J. A., Nikonenko, I. R., & Skibo, G. G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*, 96(1), 195–203. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00538-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00538-2)
- Schafer, D., Lehrman, E., Kautzman, A., Koyama, R., Mardinly, A., Yamasaki, R., Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neuronal circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>.Microglia
- Shea, O. (1990). Deposition and Role of Thrombospondin in the Histogenesis of the Cerebellar

- Cortex. *The Journal of Cell Biology*, 1(4), 1275–1283. <https://doi.org/10.1155/2011/296064>
- Simantov, R., & Silverstein, L. (2003). CD36: a critical anti-angiogenic receptor. *Frontiers in Bioscience*, 8(9), 874–882. <https://doi.org/10.2741/1168>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2015). Astrocytes : biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119 (1) 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Starossom, S. C., Mascanfroni, I. D., Imitola, J., Cao, L., Raddassi, K., Hernandez, S. F., ... Rabinovich, G. A. (2013). Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration. *Immunity*, 37(2), 249–263. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.023>.
- Stenina-adognravi, O. (2014). Thrombospondins: Old Players, New Games. *Current Opinion Lipidol*, 24(5), 401–409. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283642912>.Thrombospondins
- Stenina-adognravi, O. (2015). Invoking the Power of Thrombospondins: Regulation of Thrombospondins Expression. *Matrix Biology*, 0(7), 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.02.001>.Invoking
- Stenina, O. I., Byzova, T. V., Adams, J. C., Mccarthy, J. J., Topol, E. J., & Plow, E. F. (2004). Coronary artery disease and the thrombospondin single nucleotide polymorphisms. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(6), 1013–1030. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.005>
- Stenina, O. I., Krukovets, I., Wang, K., Zhou, Z., Forudi, F., Penn, M. S., Plow, E. F. (2003). Increased Expression of Thrombospondin-1 in Vessel Wall of Diabetic Zucker Rat. *Circulation*, 4(3), 28–39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000074223.56882.97>
- Streit, M., Velasco, P., Riccardi, L., Spencer, L., Brown, L. F., Janes, L., Detmar, M. (2000). Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *The Embo Journal*, 19(7), 3272–3282. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3272>
- Sun, H., Ma, L., Zhang, Y., Pan, X., & Wang, C. (2018). A Purinergic P2 Receptor Family-Mediated Increase in Thrombospondin-1 Bolsters Synaptic Density and Epileptic Seizure Activity in the Amygdala-Kindling Rat Model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(10), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00302>
- Suzuma, K., Takagi, H., & Otani, A. (1999). Expression of Thrombospondin-1 in Ischemia-Induced Retinal Neovascularization. *The American Journal of Pathology*, 154(2), 343–354. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65281-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65281-9)
- Tan, K., Duquette, M., Liu, J., Dong, Y., Zhang, R., Joachimiak, A., Wang, J. (2001). Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats : a novel layered fold and its biological implication. *The*

- Journal of Cell Biology*, 159(10), 373–382. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206062>
- Tohidpour, A., Morgun, A., Malinovskaya, N. (2017). Neuroinflammation and Infection: Molecular Mechanisms Associated With Dysfunction of Neurovascular Unit. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 23(6), 7-276. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00276>
- Tie, L., Chen, L., Chen, D., Xie, H., Channon, K. M., Chen, A. F. (2014). GTP cyclohydrolase I prevents diabetic-impaired endothelial progenitor cells and wound healing by suppressing oxidative stress / thrombospondin-1. *American Journal of Physiology*, 306(5), 1120–1131. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00696.2013>
- Torres, M. D., Garcia, O., Tang, C., & Busciglio, J. (2017). Dendritic spine pathology and thrombospondin-1 deficits in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 1(9), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.025>
- Tremblay, M., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., & Nimmerjahn, A. (2011). The Role of Microglia in the Healthy Brain. *The Journal of Neuroscience*, 31(45), 16064–16069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>
- Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G., & Kolář, Z. (2005). Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: II. Genomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of University Palacky*, 149(1), 63–68. <https://doi.org/10.5507/bp.2005.006>
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience*, 16(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Varma, V., Yao-borengasser, A., Bodles, A. M., Rasouli, N., Phanavanh, B., Nolen, G. T., Kern, P. A. (2010). Thrombospondin-1 Is an Adipokine Associated With Obesity, Adipose Inflammation, and Insulin Resistance. *Diabetes*, 57(2), 432–439. <https://doi.org/10.2337/db07-0840>. Thrombospondin-1
- Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., & Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *Journal of Anatomy*, 217(4), 436–448. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x>
- Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews, Neuroscience*, 6(7), 626–640. <https://doi.org/10.1038/nrn1722>
- Wakselman, S., Bechade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., & Bessis, A. (2008). Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and

- DAP12 Immunoreceptor. *Journal of Neuroscience*, 28(3), 8138–8143.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1006-08.2008>
- Weisberg, S. P., Mccann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation. *The journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796-808. <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>.Introduction
- Wendeln, A.-C., Degenhardt, K., Kaurani, L., Gertig, M., Ulas, T., Jain, G., Neher, J. J. (2018). Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*, 556(7), 332–338. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0023-4>
- Wirenfeldt, M., Dalmau, I., & Finsen, B. (2003). Estimation of Absolute Microglial Cell Numbers in Mouse Fascia Dentata Using Unbiased and Efficient. *Glia*, 139(5), 129–139.  
<https://doi.org/10.1002/glia.10277>
- Wu, H. M., Zhang, L. F., Ding, P. S., Liu, Y. J., Wu, X., & Zhou, J. N. (2014). Microglial activation mediates host neuronal survival induced by neural stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(7), 1300–1312. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12281>
- Wu, L., & Zhuo, M. (2008). Resting Microglial Motility Is Independent of Synaptic Plasticity in Mammalian Brain. *The Journal of Neurophysiology*, 99(2), 2026–2032.  
<https://doi.org/10.1152/jn.01210.2007>.
- Xu, J., Xiao, N., & Xia, J. (2010). Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1. *Nature Neuroscience*, 13(1), 22–24.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2459>
- Yang, Z., Kyriakides, T. R., & Bornstein, P. (2000). Matricellular Proteins as Modulators of Cell – Matrix Interactions : Adhesive Defect in Thrombospondin 2- null Fibroblasts is a Consequence of Increased Levels of Matrix Metalloproteinase-2. *Molecular Biology and Cell*, 11(10), 3353–3364. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.10.3353>
- Yu, J., Chung, K., Deo, M., Thompson, R. C., & Turner, D. L. (2008). MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Science Direct*, 4(6), 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.06.002>
- Zamiri, P., Masli, S., Kitaichi, N., Taylor, A. W., & Streilein, J. W. (2004). Thrombospondin Plays a Vital Role in the Immune Privilege of the Eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43 (3), 908–919. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0362>
- Zaslavsky, A., Chen, C., Grillo, J., Baek, K., Yoon, S. S., Folkman, J., & Ryeom, S. (2011). Regional Control of Tumor Growth. *Molecular Cancer*, 8(9), 1198–1206.  
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0047>.Regional
- Zhang, S. (2001). Defining glial cells during CNS development. *Nature Reviews, Neurosciences*,

2(11), 840–843. [https://doi.org/ 10.1038/35097593](https://doi.org/10.1038/35097593)

Zhang, X., & Lawler, J. (2008). Thrombospondin-based Antiangiogenic Therapy. *Microvascular Research*, 74(7), 90–99. [https://doi.org/ 10.1016/j.mvr.2007.04.007](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.04.007)

Zhao, C., Franklin, R. J. M., Karadottir, R. T., & Fawcett, J. W. (2014). STAT3-regulated TSP-1 expression. *Nature*, 5(7), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms5294>