



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**Expresión de Trombospondina-1 (TSP-1) durante  
el desarrollo del cerebro de ratón C57BL/6**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

**PÉREZ MIGUEL ARTURO ESTEBAN**

Director de Tesis: Dr. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

Revisora de Tesis: Dra. LAURA ELISA RAMOS LANGUREN

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2021



**Facultad  
de Psicología**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 y con el apoyo del proyecto PAPIIT-IN304817 “El papel de la trombospondina-1 (TSP-1) en la plasticidad neuronal asociada al síndrome de Down”. Parte de estos resultados fueron desarrollados en el laboratorio de Neuroenergética y Metabolismo, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica de la Universidad de Salamanca, España, por medio de la Beca de Capacitación en Métodos de Investigación SEP-UNAM.

*A mi padre y a mi madre por apoyarme y ayudarme siempre en todos mis proyectos de vida.*

*A mi hermano y a mi hermana por ser un apoyo emocional incondicional en todo momento.*

*Al Dr. Octavio García por ser un gran guía y tutor durante la elaboración de este proyecto.*

*Al Dr. Juan Pedro Bolaños y a todo su equipo por acogerme y apoyarme durante mi estancia en España  
para realizar una parte importante de mi proyecto.*

*A los miembros del laboratorio (Kike Ramos, Miroslava Peralta, Omar Cadena, Jazmín Hernández, Edwin  
Ramírez y Karina Aguilar) por hacer más amena mi estancia en el laboratorio y ayudarme cuando lo  
necesitaba.*

*A Fernando Rubio especialmente, por ser mi influencia académica más importante durante la carrera y  
una de las personas más influyentes en mi vida.*

## ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>Las Trombospondinas .....</b>	<b>3</b>
<b>La Trombospondina-1 .....</b>	<b>4</b>
<b>Desarrollo del SNC .....</b>	<b>6</b>
<b>Migración celular en el desarrollo del SNC .....</b>	<b>7</b>
<b>Astrocitos .....</b>	<b>7</b>
<i>Función de los astrocitos en la actividad sináptica .....</i>	<i>8</i>
<b>Justificación .....</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>Hipótesis general .....</b>	<b>12</b>
<b>Hipótesis de trabajo .....</b>	<b>12</b>
<b>Método .....</b>	<b>14</b>
<b>Animales .....</b>	<b>14</b>
<b>Protocolo experimental .....</b>	<b>14</b>
<b>Detección de los niveles de proteínas .....</b>	<b>15</b>
<i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....</i>	<i>15</i>
<i>Western blot .....</i>	<i>15</i>
<b>Procedimientos histológicos .....</b>	<b>16</b>
<i>Tinción de Nissl .....</i>	<i>16</i>
<i>Inmunohistoquímica (IHC) .....</i>	<i>19</i>
<b>Citometría de flujo .....</b>	<b>19</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>20</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>21</b>
<b>Niveles de TSP-1 se modifican durante el desarrollo postnatal, sin afectar su expresión en regiones cerebrales .....</b>	<b>21</b>
<b>El número de astrocitos se modifica durante el desarrollo postnatal .....</b>	<b>22</b>
<b>Los niveles de expresión de TPS-1 no dependen del número de astrocitos durante el desarrollo postnatal .....</b>	<b>25</b>

<b>La expresión de proteínas sinápticas puede ser modulada por TSP-1 durante el desarrollo postnatal .....</b>	<b>28</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>29</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>33</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>34</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>43</b>

## Lista de abreviaturas

**ACSA-2:** Antígeno de Superficie de Astrocito

**BMPs:** Proteínas Morfogénicas Óseas

**EGF:** Factor de Crecimiento Epidermal

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**GFAP:** Proteína Ácida Fibrilar Glial

**IHC:** Inmunohistoquímica

**MEC:** Matriz Extracelular

**PSD-95:** Densidad Postsináptica 95

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**TSPs:** Trombospondinas

**TSP-1:** Trombospondina-1

## Resumen

La Trombospondina-1 (TSP-1) pertenece a una familia de proteínas de matriz extracelular, con una gran diversidad de funciones en los distintos órganos y sistemas de mamíferos. En el sistema nervioso central (SNC), la TSP-1 es secretada y sintetizada por los astrocitos inmaduros mostrando una notable expresión durante las primeras semanas del desarrollo prenatal y postnatal, coincidiendo con procesos de plasticidad neuronal asociados a la sinaptogénesis y espinogénesis. Sin embargo, se desconoce si el cerebro muestra una expresión diferencial de TSP-1 durante el desarrollo, por lo que en esta tesis se analizó la expresión de TSP-1 en diferentes regiones del cerebro de ratón durante el desarrollo postnatal. Nuestros resultados muestran que los niveles de TSP-1 se modifican a lo largo del tiempo en el desarrollo postnatal, pero no se ven modificados entre las regiones cerebrales, este incremento no se asocia con un cambio en el número de astrocitos. Adicionalmente, una correlación de TSP-1 y PSD-95 sugiere que el incremento en los niveles de TSP-1 podría estar modulando la expresión de proteínas sinápticas durante el desarrollo postnatal. Estos resultados contribuyen a conocer los mecanismos implicados en la formación de sinapsis durante el desarrollo postnatal.

**Palabras clave:** Trombospondina-1, desarrollo postnatal, ratón C57BL/6, células gliales, plasticidad sináptica.

## Introducción

Las Trombospondinas (TSPs) son una familia de glicoproteínas de Matriz Extracelular (MEC) dividida en dos subgrupos. El subgrupo A constituido por la TSP-1 y TSP-2; y el subgrupo B conformado por la TSP-3, TSP-4 y TSP-5 (Eroglu et al., 2009; Firlej et al., 2011; Krishna & Golledge, 2013; Diana Mendus et al., 2014; Sims & Lawler, 2015; Stein, Iwuchukwu, Maier, & Gahtan, 2014; Zhao, Isenberg, & Popel, 2018). Las TSPs han sido localizadas en el corazón (Krishna & Golledge, 2013), hígado (Y. Li, Turpin, & Wang, 2017), órganos sensoriales, dientes, estómago y cerebro (Iruela-Arispe, Liska, Sage, & Bornstein, 1993). Son secretadas por una gran variedad de tipos celulares como los gránulos alfa de las plaquetas, células endoteliales, células musculares, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos (Iruela-Arispe et al., 1993; Zhao et al., 2018) y células gliales (Asch, Leung, Shapiro, & Nachman, 1986; Iruela-Arispe et al., 1993; Zhao et al., 2018). Participan en la formación de coágulos sanguíneos, angiogénesis (Bornstein, 2009; Sims & Lawler, 2015), así como en el crecimiento, proliferación, migración y adhesión celular en distintos órganos y tejidos (Firlej et al., 2011; Iruela-Arispe et al., 1993; Stein et al., 2014; Zhao et al., 2018).

En el cerebro las TSPs son expresadas durante el desarrollo, principalmente la TSP-1, que tiene su periodo crítico de expresión en la primera semana del nacimiento (Christopherson et al., 2005; Chung, Allen, & Eroglu, 2015) y posteriormente sufre una disminución en el día postnatal 21 (Christopherson et al., 2005). La TSP-1 es sintetizada y secretada particularmente por los astrocitos (Asch et al., 1986; Christopherson et al., 2005), teniendo un papel importante en la modulación de sinaptogénesis y espinogénesis (Christopherson et al., 2005; Chung et al., 2015; Eroglu et al., 2009; Garcia, Torres, Helguera, Coskun, & Busciglio, 2010; Xu, Xiao, & Xia, 2010).

La deficiencia de TSP-1 altera la formación de sinapsis y espinas dendríticas (Christopherson et al., 2005; Chung et al., 2015; Eroglu et al., 2009; Garcia et al., 2010; Xu et al., 2010), reduce la migración y proliferación de células progenitoras neurales (Lu & Kipnis, 2010) y afecta la recuperación funcional después de una lesión (Eroglu et al., 2009; Liauw et al., 2008); mientras que la presencia de TSP-1 favorece la excitabilidad neuronal (Mendus, Rankin-Gee, Mustapha, & Porter, 2015), rescata los niveles de proteínas sinápticas alteradas por la proteína  $\beta$ -amiloide (Rama Rao, Curtis, Johnstone, & Norenberg, 2013; Son et al., 2015) y previene la pérdida sináptica en modelos de síndrome de Down (Garcia et al., 2010), síndrome de X-Fragil

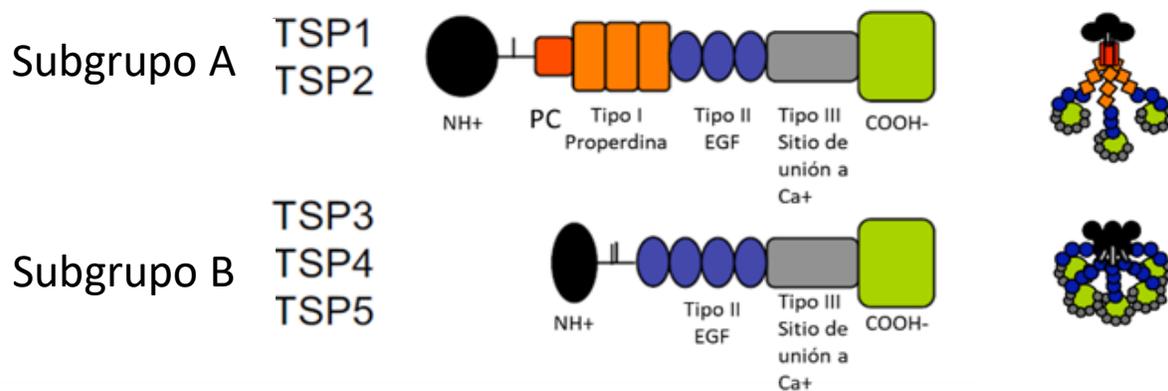
(Cheng, Lau, & Doering, 2016) y lesión de motoneuronas (Tyzack et al., 2014); sugiriendo que la TSP-1 tiene un papel importante en la formación de sinapsis y la plasticidad cerebral. Sin embargo, se desconoce si esta relación se mantiene a lo largo del desarrollo y si esta se da en todo el cerebro o es específica de algunas regiones cerebrales. Por lo que en esta tesis se realizaron experimentos para conocer cómo es la expresión de TSP-1 durante el desarrollo del cerebro de ratón

## Las Trombospondinas

Las TSPs son una familia de glicoproteínas de MEC con un peso molecular de 450 kDa total (Firlej et al., 2011; Stein et al., 2014; Zhao et al., 2018) presentan una estructura oligomérica y con múltiples dominios (~150 kDa/monómero) (Martinez, 2005; Zhao et al., 2018). De acuerdo a su dominio estructural y su modo de multimerización, las TSPs se dividen en 2 subgrupos; el subgrupo A que se constituye por la TSP-1 y TSP-2; y el subgrupo B conformado por la TSP-3, TSP-4 y TSP-5 (Eroglu et al., 2009; Krishna & Golledge, 2013; Mendus et al., 2014; Sims & Lawler, 2015) (Figura 1). Ambos grupos comparten en su estructura proteica un sitio de unión a calcio y más de una secuencia de repetición del monómero EGF (Factor de Crecimiento Epidermal, por sus siglas en inglés) o repeticiones Tipo II (Bornstein, 2009; Eroglu et al., 2009). La TSP-1 y TSP-2 se caracterizan por tener una estructura trimérica, con repeticiones de monómeros de procolágeno y de propedina (repeticiones Tipo I o dominios TRS), mientras la TSP-3, TSP-4 y TSP-5 tienen una estructura pentamérica y no contienen ninguno de los dominios mencionados (Bornstein, 2009; Eroglu et al., 2009; Sims & Lawler, 2015) (Figura 1).

La función de las TSPs incluye la formación de coágulos sanguíneos, regulación de la angiogénesis (Bornstein, 2009; Sims & Lawler, 2015), crecimiento, proliferación, migración y adhesión celular en distintos órganos y tejidos (Firlej et al., 2011; Iruela-Arispe et al., 1993; Stein et al., 2014; Zhao et al., 2018), principalmente en etapas de desarrollo embrionario (Bornstein, 2009; Iruela-Arispe et al., 1993). La diversidad de funciones de las TSPs está asociada a cada dominio estructural que actúa con receptores particulares, por ejemplo: 1) el subgrupo A tiene efectos antagónicos en la angiogénesis dependiente del dominio protéico que esté actuando (Bornstein, 2009), 2) las repeticiones Tipo I junto al dominio NH<sub>2</sub> terminal, interaccionan con diferentes integrinas y factores de crecimiento inhibiendo la migración y proliferación de células

endoteliales (Bornstein, 2009; Sims & Lawler, 2015; Zhao et al., 2018), 3) el dominio COOH terminal interacciona con factores de crecimiento y promueven la angiogénesis (Bornstein, 2009), 4) la TSP-1 y TSP-2 tienen efectos pro-apoptóticos, regulados por la acción de las repeticiones Tipo I (Bornstein, 2009; Sims & Lawler, 2015), 5) la TSP-1 también está involucrada en la insuficiencia cardíaca (condición mediante la cual el corazón deja de bombear sangre al cuerpo eficientemente), mediante su interacción con receptores a TGF- $\beta$  (Factor de Crecimiento Transformante-Beta, por sus siglas en inglés) (Krishna & Golledge, 2013; Stein et al., 2014; Zhao et al., 2018)



**Figura 1. Estructura general de las TSPs.** En el subgrupo A se encuentran incluidas la TSP-1 y TSP-2, mientras que en el subgrupo B se encuentran la TSP-3, TSP-4 y TSP-5. El subgrupo A tiene un monómero de procolágeno (PC) y 3 repeticiones del dominio TRS (propedina) y ambos subgrupos en su estructura contienen las repeticiones Tipo II y Tipo III. La estructura del subgrupo A es trimérica, mientras que la estructura del subgrupo B es pentamérica. Modificado de Eroglu (2009).

### La Trombospondina-1

La TSP-1 es una proteína de matriz extracelular que fue descubierta en 1971 en los gránulos alfa plaquetarios (Adams, 1997; Baenziger, Brodie, & Majerus, 1971), con un peso molecular de 190 kDa por monómero y de 420 kDa con su estructura intacta (Adams, 1997). Sus principales diferencias con otras TSPs son: 1) que se codifica por un gen diferente, 2) su expresión en diferentes tejidos es específica y difiere en temporalidad con otras TSPs y 3) la región promotora de la TSP-1 contiene elementos de transcripción que no tienen otras regiones promotoras del resto de TSPs (Bornstein, Armstrong, Hankenson, Kyriakides, & Yang, 2000). Estructuralmente la TSP-1 tiene una estructura casi idéntica a la TSP-2 (Figura 1), sin embargo, su

principal diferencia está en su extremo amino (NH<sub>2</sub>), puesto que la homología entre sus aminoácidos es del 28% (O'Rourke, Laherty, & Dixit, 1992).

La TSP-1 y su interacción con sus receptores y proteínas, producen distintos efectos a nivel celular. Por ejemplo: 1) la interacción con los receptores CD36 y TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral alfa, por sus siglas en inglés), tiene efectos pro apoptóticos en células endoteliales (Bornstein, 2009); también se ha reportado que la interacción de TSP-1 con el receptor CD36 tiene efectos inhibitorios en el crecimiento del cáncer ovárico y glial (Sims & Lawler, 2015), 2) tiene un papel importante en la formación tumoral (Bornstein, 2009; Firlej et al., 2011; Zhao et al., 2018) mediante su interacción con algunos receptores como el CD46 en el caso de la formación de linfomas de células T (Kamijo et al., 2019), 3) su interacción con el receptor FGF2 (Factor de crecimiento de fibroblastos 2, por sus siglas en inglés) tiene efectos angiogénicos y 4) su Interacción con el receptor VLDL (Lipoproteína de baja densidad, por sus siglas en inglés), inhibe el ciclo celular de células endoteliales, mientras que en el Sistema Nervioso Central (SNC), induce la fosforilación del gen *Dab 1* en la zona subventricular, promoviendo la migración de precursores neuronales al bulbo olfatorio (Blake et al., 2008; Bornstein, 2009).

La expresión de la TSP-1 en el cerebro se ha observado en estadios muy tempranos del desarrollo, que van desde el desarrollo embrionario (Iruela-Arispe et al., 1993), hasta periodos postnatales, en los cuales se ha estudiado su actividad sinaptogénica. Las sinapsis son complejas adhesiones célula-célula entre las neuronas que requieren una interacción entre axones y dendritas. Diversas moléculas como factores tróficos, hormonas y neurotransmisores pueden regular la formación, organización y maduración de las sinapsis (Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018; Spitzer, 2017). Particularmente, se ha observado que la TSP-1 y TSP-2 muestran un papel importante en la sinaptogénesis especialmente en estadios tempranos del desarrollo (Baldwin & Eroglu, 2017; Christopherson et al., 2005; Eroglu, 2009; Eroglu et al., 2009; Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018; Xu et al., 2010). Por ejemplo, se ha reportado que la TSP-1 tiene su mayor pico de actividad en las primeras dos semana del nacimiento, momento crítico para el mecanismo de sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Chung et al., 2015; Eroglu, 2009; Farhy-Tselnicker & Allen, 2018) y que posteriormente sufre una disminución en su expresión en el día postnatal 21 (Christopherson et al., 2005), sugiriendo una ventana de tiempo para estudiar su actividad

sinaptogénica en diferentes regiones del cerebro. A su vez, se ha observado que la TSP-1 regula el desarrollo de las terminaciones postsinápticas (Christopherson et al., 2005), mediante su interacción con receptores como el receptor a gabapentina  $\alpha 2\delta$ -1 (Baldwin & Eroglu, 2017; Dallérac, Zapata, & Rouach, 2018; Eroglu et al., 2009) y neuroligina-1 (Baldwin & Eroglu, 2017; Dallérac et al., 2018; Xu et al., 2010), así como de la actividad presináptica (Crawford, Jiang, Taylor, & Mennerick, 2012). En concordancia con estos resultados, también se ha demostrado que la TSP-1 acelera la formación de sinapsis en cultivos de hipocampo y retina de manera diferencial durante este periodo crítico (Xu et al., 2010), sin embargo, los efectos de la TSP-1 durante el desarrollo postnatal no ha sido estudiados en su totalidad.

## Desarrollo del SNC

La formación del SNC tiene lugar en momentos muy tempranos del desarrollo embrionario durante la formación de la gástrula. En este proceso llamado gastrulación, subgrupos de células forman tres diferentes capas que darán lugar al organismo completo (ectodermo, mesodermo y endodermo). Aquella capa en la que la formación de todo el sistema nervioso tiene lugar es la capa del ectodermo, la cual mediante una serie de señales bioquímicas que provienen de una estructura del mesodermo llamada notocorda, da origen a la formación de la placa neural, que contiene una serie de células conocidas como células madre neurales que posteriormente darán origen a células gliales y neuronales. La placa neural dará origen al tubo neural, en donde se formarán las diferentes partes que componen al SNC (médula espinal, rombencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo). Las proteínas que regulan esta diferenciación de células madre a precursores de células nerviosas depende de una vía de señalización dependiente de la actividad de las Proteínas Morfogenéticas Oseas (BMPs, por sus siglas en inglés), que pertenecen a la familia de proteínas TGF- $\beta$ . Estas proteínas funcionan como ligandos a proteína serina-quinasa, fosforilando una serie de factores de transcripción las cuales favorecen la transcripción de genes. En el ectodermo, esta transcripción diferencia a las células madre en células de carácter epidermal, que dan origen a la piel, sin embargo, mediante la liberación de una serie de proteínas llamadas nogina y cordina, liberados por la notocorda, esta diferenciación se inhibe, ya que funcionan como antagonistas endógenos de las BMPs promoviendo la diferenciación de estas células a precursores neurales (Purves et al., 2012).

## Migración celular en el desarrollo del SNC

En el desarrollo del SNC, se da un proceso de neurogénesis mediado por distintos tipos de migración. En la corteza cerebral, ésta migración está regulada por un tipo celular llamado glía radial por el que las células neuronales migran desde la zona subventricular formando así las distintas capas de la corteza, sin embargo, además de contribuir a que las células neuronales migren a lo largo de ésta, también tienen la capacidad de dividirse de manera asimétrica, es decir, pueden dar origen a otra glía radial o a un precursor celular (glioblasto o neuroblasto) o directamente diferenciarse en una célula astrogliar, dando origen a procesos de neurogénesis y gliogénesis, siendo la gliogénesis un proceso que ocurre posteriormente al periodo de neurogénesis en la etapa perinatal (antes y después del nacimiento) (Verkhratsky & Butt, 2013). Los astrocitos neonatales tienen capacidades proliferativas y pueden fungir como células madre, por lo que la gliogénesis se mantiene a lo largo de la vida en el SNC, sin embargo, el tipo glial producido sólo se determina de manera local (p.e. oligodendrocitos en la sustancia blanca) (Verkhratsky & Butt, 2013). Adicionalmente, se ha identificado que algunas proteínas de MEC como la TSP-1 y TSP-4 están involucradas en la migración (Girard, Eichenberger, & Celio, 2014) y en la proliferación neuronal (Lu & Kipnis, 2010). Del mismo modo, en el cerebro adulto, se ha observado que los oligodendrocitos son la población más proliferativa de células, debido a que deben contribuir constantemente a la regeneración de la vaina de mielina (Hughes, Kang, Fukaya, & Bergles, 2013), por otra parte, la microglía y los astrocitos se renuevan y proliferan generalmente ante la presencia de señales específicas asociadas a daño cerebral (Ajami, Bennett, Krieger, Tetzlaff, & Rossi, 2007; Zhan et al., 2017). Por lo que conocer el punto crítico de la gliogénesis durante el desarrollo postnatal, permitiría conocer la relación de la sinaptogénesis y plasticidad cerebral en la edad adulta.

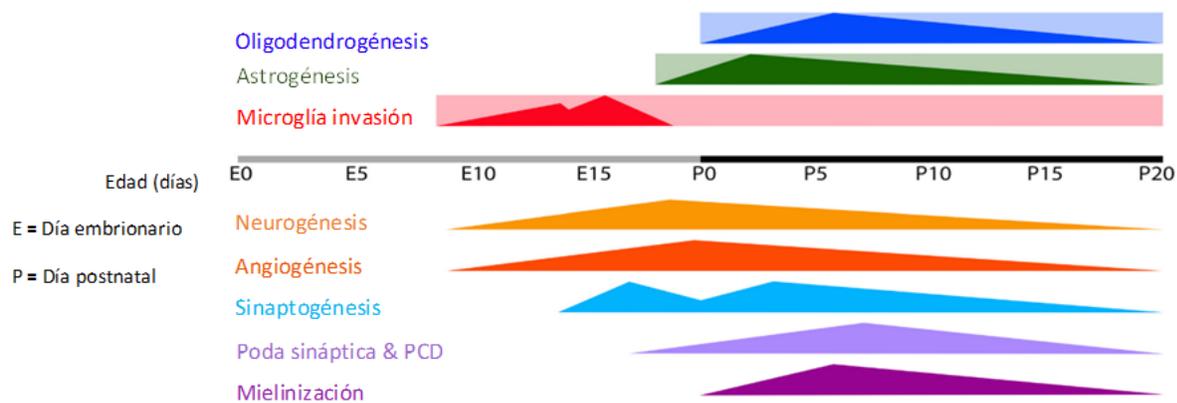
## Astrocitos

Los astrocitos, son un grupo de células gliales que constituyen parte del parénquima del SNC y que se encuentra dividido en dos subgrupos. El primero, que corresponde a las glías radiales, las cuales están involucradas en el desarrollo del cerebro contribuyendo a la migración neuronal (Farhy-Tselnicker & Allen, 2018; Kettenmann & Ransom, 2013; Verkhratsky & Butt, 2007, 2013) y el segundo, que involucra células en forma de estrella, también conocidos como

astrocitos, los cuales a su vez están divididos en astrocitos protoplasmáticos y astrocitos fibrosos (Kettenmann & Ransom, 2013; Matyash & Kettenmann, 2010; Verkhratsky & Butt, 2007, 2013). Los astrocitos protoplasmáticos están ubicados principalmente en la sustancia gris, haciendo contacto con múltiples neuronas y sinapsis (Chung et al., 2015; Dallérac et al., 2018; Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018; Kettenmann & Ransom, 2013), y con vasos sanguíneos. Su densidad en la corteza varía entre 10,000 a 30,000 células por mm<sup>3</sup> (Kettenmann & Ransom, 2013; Verkhratsky & Butt, 2007), mientras que los astrocitos fibrosos, están ubicados principalmente en la sustancia blanca, estableciendo contacto con los axones en los nodos de Ranvier (Verkhratsky & Butt, 2007). Su densidad es de aproximadamente 200,000 células por mm<sup>3</sup> (Kettenmann & Ransom, 2013; Verkhratsky & Butt, 2007). Los astrocitos tienen una gran variedad de funciones que incluyen: soporte estructural y metabólico, regulación del flujo sanguíneo, neuroprotección, remodelamiento post-lesión y el desarrollo de sinapsis (Verkhratsky & Butt, 2013).

#### *Función de los astrocitos en la actividad sináptica*

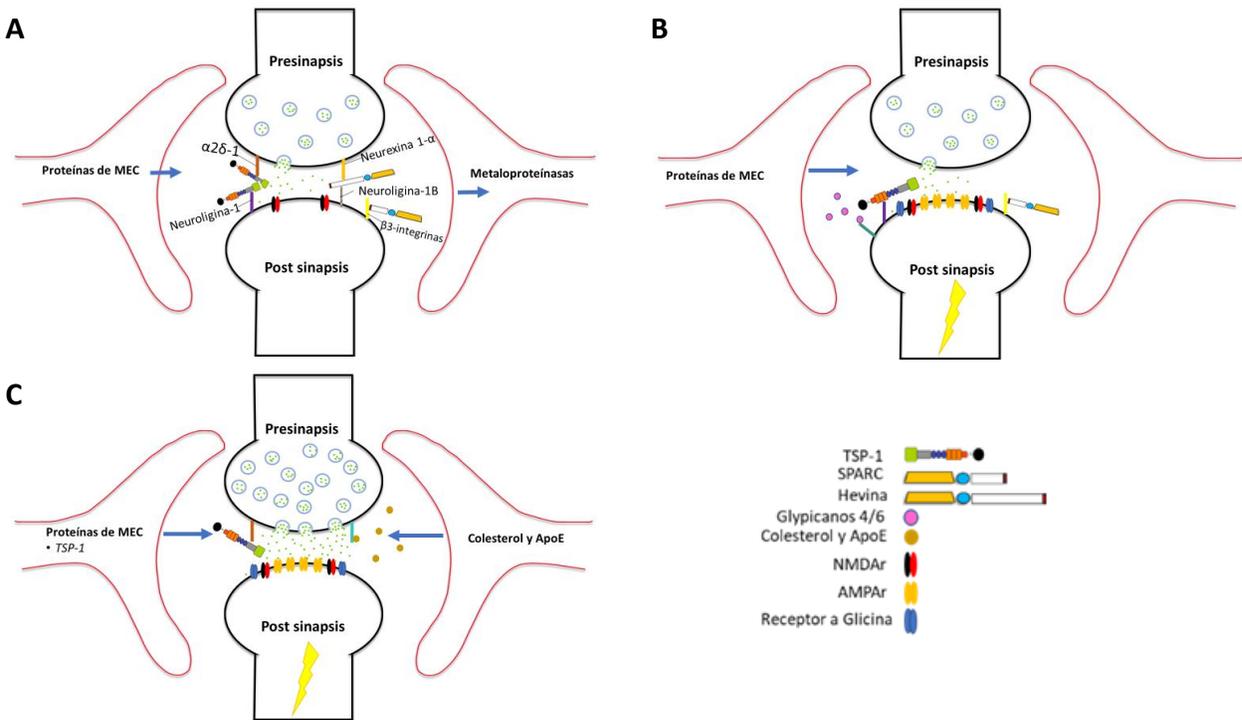
Los astrocitos tienen una proliferación tardía durante el desarrollo, ya que se presenta después del nacimiento (Farhy-Tselnicker & Allen, 2018; Verkhratsky & Butt, 2013). Sin embargo, a pesar de que la generación y expansión de los astrocitos se completa en los primeros estadios postnatales, los astrocitos continúan elaborando y refinando sus procesos después del nacimiento durante el periodo activo de la sinaptogénesis (Figura 2).



**Figura 2. Línea de tiempo de la generación de distintos tipos celulares y de sus procesos asociados en el cerebro de ratón.** PCD (Muerte celular programada). Modificado de Reemst et al. (2016).

En años recientes, se han identificado diversas familias de moléculas sintetizadas y secretadas por astrocitos que regulan diversos aspectos del desarrollo sináptico *in vivo* e *in vitro*

(Baldwin & Eroglu, 2017; Chung et al., 2015; Dallérac et al., 2018; Farhy-Tselnicker & Allen, 2018; Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018) como versicans, neurocans y metaloproteínas, así como Hevina, SPARC, colesterol y TSPs (Asch et al., 1986; Baldwin & Eroglu, 2017; Chung et al., 2015; Clarke & Barres, 2013; Dallérac et al., 2018; Eroglu, 2009; Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018); proteínas encargadas del desarrollo estructural y funcional de las sinapsis, además de otras proteínas de MEC perisináptica que facilitan la acción de los mecanismos moleculares asociados a la plasticidad sináptica altamente presente en los periodos críticos del desarrollo (Dallérac et al., 2018; Eroglu, 2009) (Figura 3A). Durante las primeras semanas del desarrollo postnatal, la liberación de Hevina, proteínas SPARC y TSP-1 y TSP-2 contribuyen al desarrollo de sinapsis estructuralmente maduras (Figura 3A) (Baldwin & Eroglu, 2017; Chung et al., 2015; Dallérac et al., 2018; Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018); posteriormente, las sinapsis adquieren su funcionalidad en el componente postsináptico, a partir de la liberación de los glypicanos 4/6 y la activación de los receptores glutamatérgicos y glicinérgicos (Baldwin & Eroglu, 2017; Chung et al., 2015; Clarke & Barres, 2013; Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018) (Figura 3B). Mientras que en el componente presináptico la funcionalidad se genera a partir de la liberación de colesterol y Apolipoproteína E (ApoE), incrementando la probabilidad de liberación de neurotransmisores y la eficacia de transmisión sináptica (Chung et al., 2015), mediante la acción de TSP-1 (Chung et al., 2015; Crawford et al., 2012) (Figura 3C). De este modo, se demuestra que existe una estrecha relación entre los factores secretados por los astrocitos y la formación y regulación de las sinapsis, por ende, de los circuitos neuronales y el procesamiento de la información en el cerebro durante el desarrollo pre y postnatal. Los resultados de esta tesis contribuyen al conocimiento de los mecanismos celulares implicados en la formación de las sinapsis y circuitos neuronales durante el desarrollo postnatal.



**Figura 3. Procesos astrocíticos en el desarrollo de la estructura y función de las sinapsis.** (A), la liberación de proteínas de MEC como la TSP-1, Hevina y proteínas SPARC se unen a sus respectivos receptores; la neurexina 1- $\alpha$ , neuroligina 1B y  $\beta 3$ -integrinas, favoreciendo la maduración y la formación estructural del componente postsináptico. Sin embargo, funcionalmente está silenciada por una ausencia de receptores AMPA. (B), la presencia de los glypicanos 4/6 favorecen el anclaje de receptores AMPA a la postsinapsis y de esta manera, responder a la presencia del neurotransmisor generando despolarizaciones postsinápticas. Esta acción está regulada por la actividad de la TSP-1 y las proteínas SPARC facilitando el anclaje de receptores de glicina. (C), la funcionalidad presináptica se adquiere por la actividad del colesterol y la ApoE que favorecen la eficacia sináptica mediante una mayor liberación del neurotransmisor. Esta actividad está regulada negativamente por la acción de la TSP-1.

## Justificación

La TSP-1 es una proteína sintetizada y secretada por los astrocitos, que juega un papel importante en la formación, mantenimiento y modulación de las sinapsis. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado *in vitro*, desconociendo si este fenómeno se mantiene *in vivo*, particularmente en estadios postnatales. Por lo tanto, en esta tesis se buscó conocer si la expresión de TSP-1 se mantiene durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebral e hipocampo de ratón y su correlación con la formación de sinapsis. Los resultados de esta tesis contribuirían a un mayor entendimiento de los mecanismos involucrados en la formación de las sinapsis durante el desarrollo postnatal temprano en un modelo *in vivo*.

## Objetivos

### Objetivo General:

- Conocer la expresión de TSP-1 en la corteza cerebral e hipocampo del ratón C57BL/6 durante el desarrollo postnatal.

### Objetivos específicos:

- Conocer la expresión de TSP-1 en las cortezas motora, somatosensorial, auditiva, visual así como en el hipocampo del cerebro de ratón.
- Establecer si los niveles de expresión de TSP-1 en las cortezas motora, somatosensorial, auditiva, visual y el hipocampo del ratón cambian con la edad.
- Correlacionar el número de células neuronales y astrogiales con los niveles de expresión de TSP-1 encontrados en las cortezas motora, somatosensorial, auditiva, visual e hipocampo.
- Explorar si los cambios en los niveles expresados de proteínas sinápticas en las cortezas motora, somatosensorial, auditiva, visual y el hipocampo son dependientes de los niveles de expresión de TSP-1 observados durante el desarrollo.

## Hipótesis general

- La TSP-1 presentará cambios en su expresión en el cerebro en función de la edad postnatal del ratón C57BL/6.

## Hipótesis de trabajo

- H<sub>1</sub>: Las cortezas motora, somatosensorial, auditiva, visual y el hipocampo del ratón C57BL/6 presentarán diferentes niveles de expresión de TSP-1.
- H<sub>2</sub>: Los niveles de expresión de TSP-1 en las cortezas motora, somatosensorial, auditiva, visual y el hipocampo del cerebro de ratón se modificarán a lo largo del desarrollo.
- H<sub>3</sub>: Cambios en los niveles de expresión de TSP-1 se asocian a modificaciones en el número de células gliales.

- H<sub>4</sub>: Los cambios en los niveles de expresión TSP-1 producen cambios en los niveles de PSD-95.

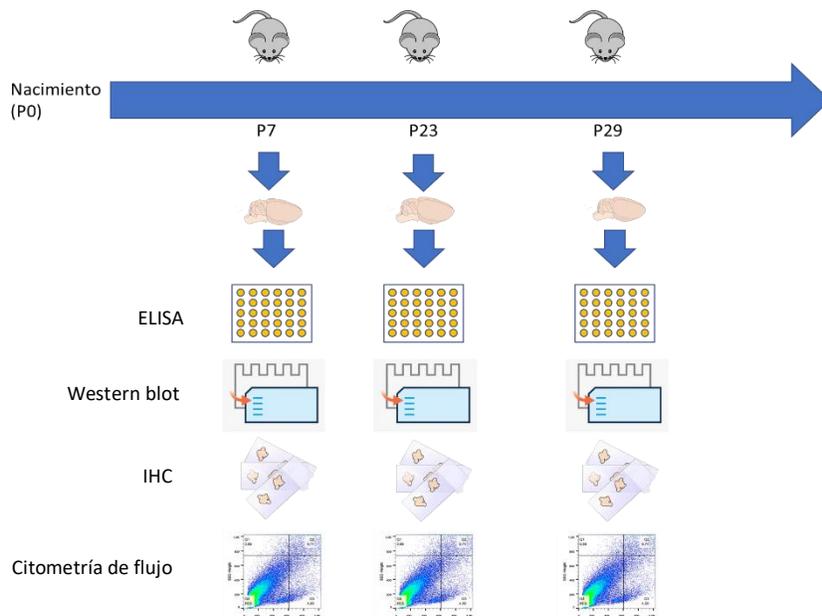
## Método

### Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6. Entre 2 y 3 ratones fueron alojados en cajas de acrílico de 16x28x13 cm en condiciones estándar de laboratorio. Durante todo el proceso experimental, los ratones se mantuvieron a una temperatura ambiente constante ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con ciclos de luz oscuridad de 12 horas (7:00 am a 7:00 pm), con alimento en pellet y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en la fase de luz siguiendo las reglas establecidas en las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). El uso de animales y el desarrollo experimental se aprobó por el Comité de Ética de la Facultad de Psicología de la UNAM (FPSI/DIP/CE/07/2015).

### Protocolo experimental

Ratones de diferente edad postnatal (P), fueron utilizados durante todo el protocolo experimental, teniendo como día cero (P0) su nacimiento. Los ratones fueron sacrificados al día P7 (Christopherson et al., 2005), P23 y P29; y los cerebros se extrajeron y procesaron para la determinación de los niveles de proteínas (TSP-1 y PSD-95), análisis histológico y conteo celular (Figura 4).

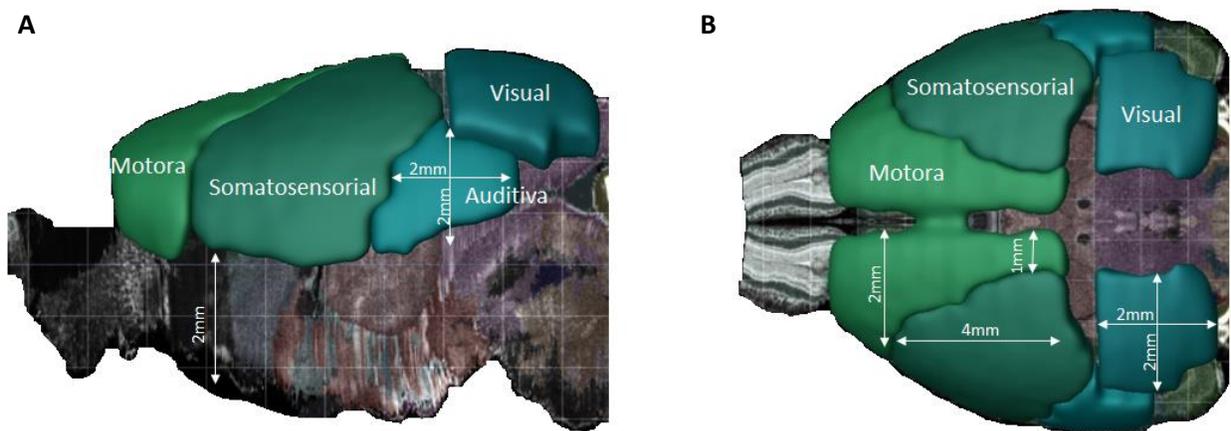


**Figura 4. Esquema del protocolo experimental y los experimentos realizados.** Extracción y procesamiento del cerebro de ratón a los días P7, P23 y P29.

## Detección de los niveles de proteínas

### *Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)*

Los cerebros completos se extrajeron y disectaron para obtener la corteza motora, corteza somatosensorial, corteza auditiva y corteza visual, utilizando como referencia el atlas del software Brain Explorer 2 (Allen Institute for Brain Science, 2018) (Figura 5), mientras que para el hipocampo la disección siguió el protocolo propuesto por Sultan (2013) y Hoey (2014). Los cerebros fueron homogenizados en buffer RIPA (Tris-HCl 50mM, pH 7.4, SDS 0.1%, NaCl 150mM, Desoxicolato sódico 0.5%, Triton X-100 1%, 5 tabletas de Complete mini EDTA free), por medio de un homogenizador Ultra-Turrox (Ika Works). Los niveles de TSP-1 fueron detectados a través de un inmunoensayo de ELISA (R&D SYSTEMS), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los niveles de TSP-1 se obtuvieron a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de TSP-1; los resultados se expresaron en ng/ml (Garcia et al., 2010).



**Figura 5. Representación de las medidas utilizadas para la extracción de las diferentes regiones de la corteza cerebral. (A),** representación de la vista sagital del cerebro de ratón. **(B),** representación de una vista coronal del cerebro de ratón. Modificado de Allen Institute for Brain Science, 2018.

### *Western blot*

Para la técnica de western blot, la corteza cerebral e hipocampo fueron extraídos y sumergidos en buffer RIPA (Tris-HCl 50mM, pH 7.4, SDS 0.1%, NaCl 150mM, Desoxicolato sódico 0.5%, Triton X-100 1%, 5 tabletas de Complete mini EDTA free). Posteriormente los tejidos fueron homogenizados para romper células y evitar la degradación de proteínas. Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos. Para determinar las cantidades de proteína a utilizar, se realizó una

curva estándar con el método BCA (ácido bicinconínico), utilizando Albúmina Sérica Bovina como la proteína estándar (BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific). 40 µg de muestra fueron colocados en geles de SDS-poliacrilamida al 8% seguido de una electroforesis a 180 V constantes. Posteriormente se realizó una transferencia en membranas de nitrocelulosa de 4.5 µm a 390 mV constantes durante tres horas y de manera inmediata se realizó el bloqueo de las membranas en una dilución del 5% de leche en TBS Tween 0.1% por una hora. Se añadieron los anticuerpos primarios para Anti-TSP 1 (1:1,000) (ab85762, abcam), Anti-PSD 95 (1:1,000) (MA1-046, Thermo Scientific) y Anti-β-Actina (1:30,000) (A5441, Sigma), y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después de este periodo, se realizó una incubación con los anticuerpos secundarios goat Anti-Rabbit IgG (1:10,000) (Pierce, Thermo Scientific) y goat Anti-Mouse IgG (1:10,000) (Bio-Rad) durante una hora. Las membranas fueron incubadas inmediatamente con el Super Signal West Femto Maximum Sensitive Substrate (Thermo Scientific) durante 2 minutos previo a una exposición de 5 segundos hasta 10 minutos en películas Kodak XAR-5 dependiendo de la intensidad de la luz emitida y de la abundancia de la proteína. La cuantificación de la intensidad de las bandas en las autoradiografías escaneadas fue realizada mediante el uso del software ImageJ.

## Procedimientos histológicos

### *Tinción de Nissl*

Para los estudios histológicos, los cerebros fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% y divididos por la mitad a partir de la fisura central del cerebro y posteriormente fueron sometidos a un proceso de deshidratación por medio de su inmersión en concentraciones crecientes de alcohol (75%, 80%, 95% y 100%). Un proceso de aclaramiento se realizó a través de concentraciones crecientes de Xilol [50% Xilol y 50% alcohol, Xilol 1 (puro) y Xilol 2 (puro)]. Al final del proceso, los cerebros fueron inmersos en parafina. Los bloques obtenidos fueron rebanados a 10 µm con un micrótopo (ECOSHEL) y montados en portaobjetos cubiertos con gelatina. Las rebanadas fueron inmersas en una tinción de Nissl con violeta de cresilo (FD NeuroTechnologies, Inc.), para teñir los núcleos celulares siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas por medio de un microscopio de campo claro utilizando un objetivo de inmersión a 100x (U.S MICROS IV, Holanda) acoplado a una cámara digital (EUROMEX – HOLLAND

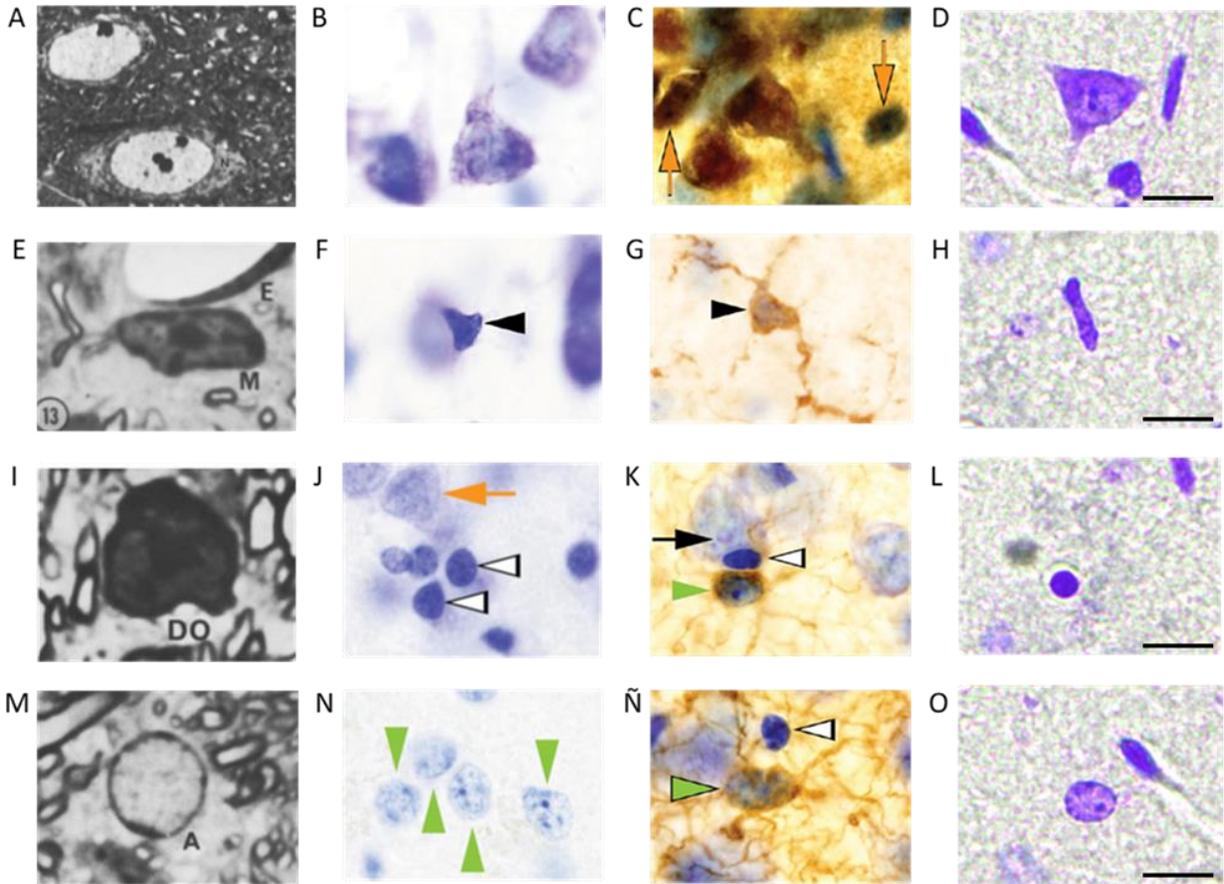
CMEX DC 5000). El conteo celular en la tinción de Nissl se realizó a través del programa Imagefocus (v3.0). El conteo del número de células fue realizado en las capas II/III y V para la corteza cerebral. Los tipos celulares se clasificaron en Oligodendrocitos, Astrocitos, Microglías y Neuronas a partir de las características físicas que presenta el núcleo de cada tipo celular (García-Cabezas, John, Barbas, & Zikopoulos, 2016; Hilton & Shivane, 2015; Ling, Paterson, Privat, Mori, & Leblond, 1973) (Tabla 1, Figura 6). Los perfiles celulares se contabilizaron y expresaron como células/0.01mm<sup>2</sup>.

Tabla 1.

*Características de la tinción de Nissl en cada tipo celular del SNC*

<i>Tipo de célula</i>	<i>Forma usual</i>	<i>Tinción del nucleoplasma</i>	<i>Cromatina</i>	<i>Nucleolos</i>	<i>Citoplasma</i>
<b><i>Neurona</i></b>	Redonda u ovoide.	Débil o moderado.	Algunos gránulos de heterocromatina. Muy poca eucromatina visible.	De 1 hasta 4 nucleolos bien definidos.	Teñido fuertemente. El soma es claramente visible.
<b><i>Microglía</i></b>	Irregular (redonda, elongada, ameboide, etc.)	Moderado	Gránulos de cromatina del mismo tamaño que contrastan con el nucleoplasma.	No visible	No visible
<b><i>Oligodendrocito</i></b>	Redonda	Fuerte	No visible	No visible	No visible
<b><i>Astrocito</i></b>	Redonda u ovalada.	Débil	Gránulos de heterocromatina formados alrededor de la capa nuclear.	Un nucleolo definido o ninguno.	No visible

*Nota:* Elaborado con información de “Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features” por M. Á. García Cabezas, Y. J. John, H. Barbas, & B. Zikopoulos, 2016, *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(107), 1–28 e “Investigation of glial cells in semithin sections I. identification of glial cells in the brain of young rats” por E. A. Ling, J. A. Paterson, A. Privat, S. Mori, & C. P. Leblond, 1973, *J Comp Neurol*, 149, 43–72.



**Figura 6. Características de la tinción de Nissl en cada tipo celular del SNC.** A-D, representación de la neurona en la tinción de Nissl (flechas naranjas, C, J). Vista desde microscopía electrónica de transmisión (A), desde la tinción de Nissl en corteza de primates (B), mediante una contra tinción de Nissl e inmunohistoquímica positiva a NeuN (C), desde la tinción de Nissl obtenida del hipocampo de ratón (D). E-H, representación de la microglía en la tinción de Nissl (puntas de flecha negras, F, G). Vista de microscopía electrónica de transmisión (E), desde la tinción de Nissl en corteza de primates (F), mediante una contra tinción de Nissl e inmunohistoquímica positiva a Iba-1 (G), desde la tinción de Nissl obtenida del hipocampo de ratón (H). I-L, representación del oligodendrocito en la tinción de Nissl (puntas de flecha blancas, J, K, Ñ). Vista de microscopía electrónica de transmisión (I), desde la tinción de Nissl en corteza de primates (J-K), desde la tinción de Nissl obtenida del hipocampo de ratón (L). M-O, representación del astrocito en la tinción de Nissl (puntas de flecha verdes K, N, Ñ). Vista desde microscopía electrónica de transmisión (M), desde la tinción de Nissl en corteza de primates (N), mediante una contra tinción de Nissl e inmunohistoquímica positiva a GFAP (Ñ), desde la tinción de Nissl obtenida del hipocampo de ratón (O). Escala de la barra: 10  $\mu$ m. Generado con información de García-Cabezas et al. (2016) & Ling et al. (1973).

### *Inmunohistoquímica (IHC)*

Los cerebros fueron extraídos y fijados con PFA 4% y ácido pícrico (fijador Somogyi) durante tres días. Posteriormente se hicieron una serie de lavados en agitación de PB al 0.1M (6 de 15 minutos, 2 de 30 minutos, 2 de 1 hora, 1 de 2 horas y 1 lavado toda la noche). Seguidos de 3 inmersiones de los tejidos en concentraciones crecientes de sacarosa diluida en PB al 0.1M (10%, 20% y 30%). Después de este proceso, se formaron los bloques en OCT (Optimal Cutting Temperature compound), con los cerebros posicionados sagitalmente y fueron congelados en nitrógeno líquido. Los bloques se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante al menos una noche. Los cerebros fueron rebanados a  $20\ \mu\text{m}$  con un criostato Leica y montados en portaobjetos. Las preparaciones fueron lavadas 6 veces en PB al 0.1M en agitación (10 minutos por lavado). Posteriormente se realizó un pretratamiento de  $\text{NaBH}_4$  al 0.005% ( $\text{NaBH}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ) durante 30 minutos sobre los cortes para eliminar los grupos aldehídos libres presentes tras la fijación. Los anticuerpos primarios anti-TSP-1 (1:500) (ab85762, abcam) y anti-GFAP (1:500) (G6171, Sigma) fueron incubados en PB al 0.1M, 0.2% de Triton X-100 y 5% de suero de cabra durante 48 horas. La detección de los anticuerpos primarios fue realizada mediante la incubación de los anticuerpos secundarios Cy2 goat anti-rabbit (1:500) (111-225-144) y Cy3 goat anti-mouse (1:500) (115-165-003) en PB al 0.1M. Las imágenes de IHC fueron obtenidas mediante un microscopio confocal High Content Analysis System Operetta CLS y la correlación entre la intensidad de los niveles de GFAP y TSP-1 fue realizada utilizando el software ImageJ.

### *Citometría de flujo*

La corteza cerebral e hipocampo de ratones de P7, P23 Y P29 fueron extraídos y procesados para obtener una suspensión de células individuales en  $200\ \mu\text{l}$  de PBS. La suspensión celular fue incubada con Anti-ACSA-2 (Astrocyte Cell Surface Antigen) (130-102-365, Miltenyi Biotec) un marcador específico para astrocitos, en una dilución 1:10 durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Controles negativos fueron realizados en  $100\ \mu\text{l}$  de cada muestra en PBS sin anticuerpo. Cada muestra de tejido analizada se realizó por triplicado. El número de células se determinó inmediatamente después de realizar el marcaje utilizando el citómetro (BD FACSAria IIu Becton Dickinson). El número de astrocitos fue expresado como porcentaje de eventos positivos a ACSA-2

y de la intensidad de la fluorescencia emitida respecto a un total de  $1 \times 10^5$  eventos (Vicente-Gutierrez et al., 2019).

### Análisis estadístico

Los resultados se reportaron con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M). El análisis de datos se realizó mediante el uso del programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, USA). Para la comparación entre grupos se realizaron pruebas de Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y para las asociaciones se utilizó la correlación de Pearson. Finalmente se utilizaron las pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos. Se consideró el nivel de probabilidad  $\leq 0.05$  como estadísticamente significativo.

## Resultados

### Niveles de TSP-1 se modifican durante el desarrollo postnatal, sin afectar su expresión en regiones cerebrales

Para determinar si los niveles de TSP-1 variaban en diferentes regiones del cerebro a lo largo del desarrollo, se realizó una disección de la corteza motora, somatosensorial, auditiva y visual, así como del hipocampo y se midieron los niveles de TSP-1 mediante una ELISA (Figura 7A). Los resultados obtenidos demostraron que los niveles de TSP-1 no presentan diferencias significativas entre las cortezas cerebrales en las diferentes edades estudiadas. Tampoco se observó alguna diferencia significativa entre las cortezas cerebrales e hipocampo (Tabla 2;  $p=0.9284$ ). Sin embargo, en una comparación entre las edades estudiadas, se observó que los niveles de TSP-1 presentan diferencias significativas entre el día P7 y P23 (Figura 7B;  $F_{2,30}=6.824$ ,  $p=0.0036$ ). Este comportamiento fue similar en la corteza y el hipocampo. Sin embargo, un análisis de la expresión de TSP-1 mediante western blot demostró una expresión significativa de TSP-1 durante el día P7 pero no en los días P23 y P29, sugiriendo diferencias en la síntesis y secreción de TSP-1 durante el desarrollo (Figura 7C;  $F_{2,12}=18.22$ ,  $p=0.0002$ ).

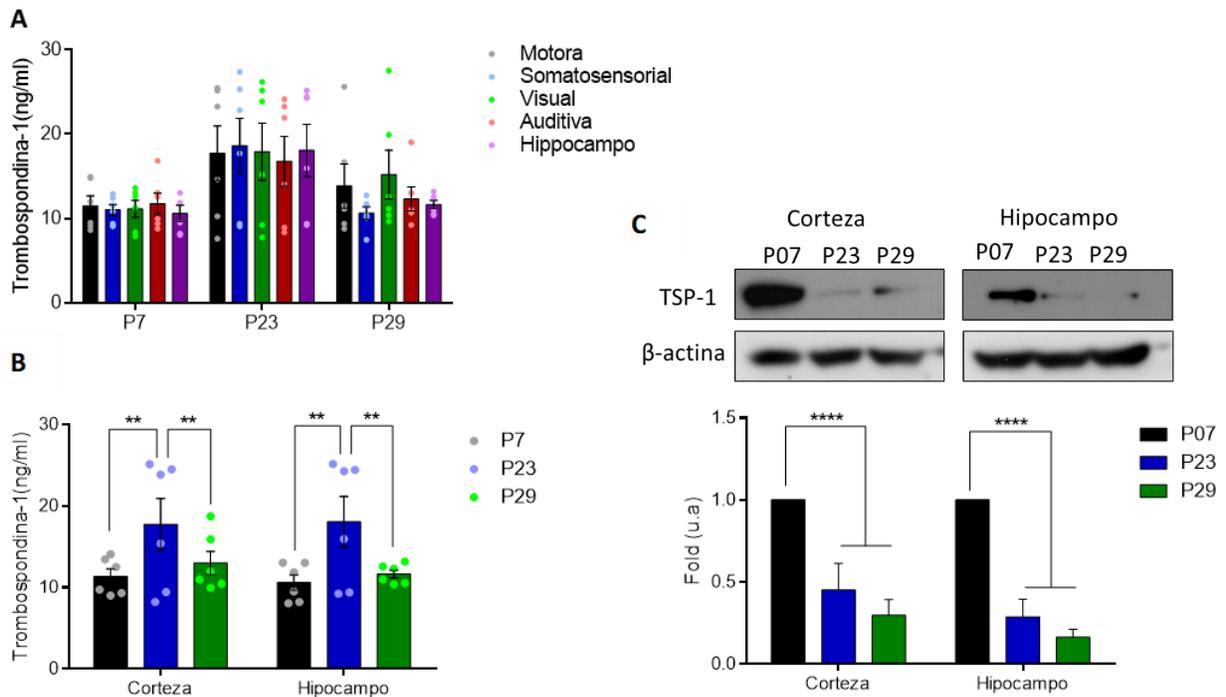
Tabla 2.

Niveles de TSP-1 en diferentes regiones cerebrales con la técnica de ELISA.

<i>Día</i>	<i>Motora</i>	<i>Somatosensorial</i>	<i>Visual</i>	<i>Auditiva</i>	<i>Hipocampo</i>	<i>(p &lt; 0.05)</i>
<i>posnatal</i>						
<i>P7</i>	11.5 ± 2.854	11.03 ± 1.568	11.13 ± 2.45	11.76 ± 3.026	10.62 ± 2.313	n.s
<i>P23</i>	17.73 ± 7.916	18.61 ± 7.951	17.90 ± 8.269	16.78 ± 7.252	18.08 ± 7.586	n.s
<i>P29</i>	13.86 ± 6.394	10.64 ± 1.818	15.20 ± 7.079	12.32 ± 3.5	11.67 ± 1.172	n.s

*Nota:* Se muestran las medias y desviaciones estándar de cada una de las regiones cerebrales. n.s no significativo utilizando ANOVA de dos vías y análisis post hoc de Tukey.

## Niveles de TPS-1 en diferentes edades y regiones de la corteza cerebral

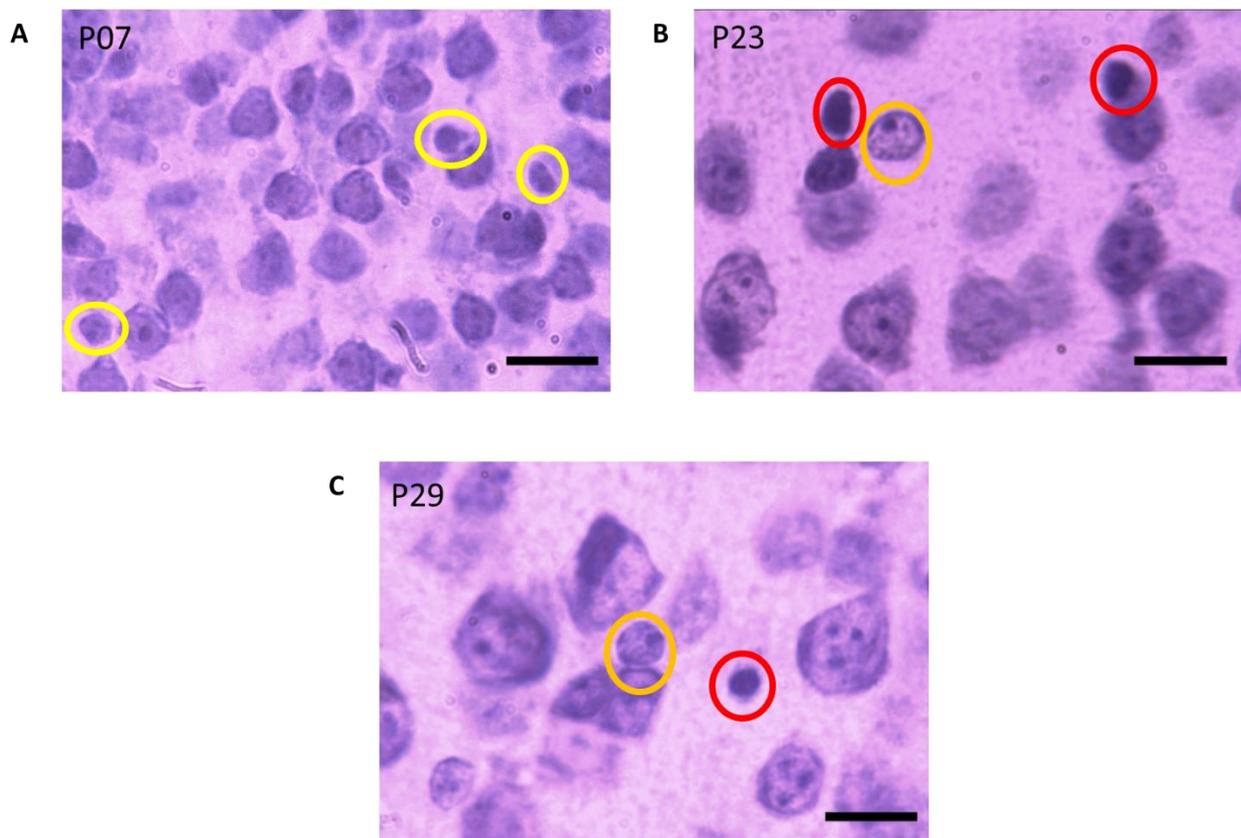


**Figura 7. Niveles de TPS-1 en diferentes edades y regiones de la corteza cerebral.** (A), Niveles de TSP-1 determinadas con la técnica de ELISA en diferentes regiones de la corteza cerebral del ratón. (B), Niveles de TSP-1 determinadas con la técnica de ELISA en diferentes edades del desarrollo del ratón (P7, P23 Y P29). (C), expresión de TSP-1 determinada mediante Western Blot. Media  $\pm$  E.E.M, ANOVA de dos vías,  $n=6$  por edad, excepto en C) donde  $n=3$  por edad. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

## El número de astrocitos se modifica durante el desarrollo postnatal

Con el fin de conocer si los cambios en los niveles de expresión TSP-1 observados durante el desarrollo estaban asociados a un incremento de células cerebrales, se realizó un conteo de células gliales utilizando la tinción de Nissl. Los distintos tipos celulares fueron identificados de acuerdo a las características del núcleo celular (García-Cabezas et al., 2016; Ling et al., 1973) (Tabla 1). Acorde con estos protocolos, las neuronas fueron identificadas por tener un núcleo grande, entre uno o más nucleolos definidos y por una tinción intensa del retículo endoplasmático que permite distinguir al soma de la neurona de otros tipos celulares (Figura 6A-D). Las microglías fueron distinguidas por tener un núcleo de forma muy irregular teñido de forma relativamente oscura y por tener en ocasiones formas del tipo ameboide, distinguiendo algunos gránulos de cromatina distribuidos a lo largo del núcleo y con presencia o ausencia de nucleolo (Figura 6E-H).

Los oligodendrocitos fueron visualizados por tener un núcleo generalmente redondo y fuertemente teñido (Figura 6I-L). Finalmente, los astrocitos fueron identificados por tener un núcleo débilmente teñido y generalmente de forma redonda u ovalada, con pequeños gránulos de heterocromatina formados alrededor de la capa nuclear y con la posibilidad de tener un pequeño nucleolo o carecer de él (Figura 6M-O). Debido a que, en estadios muy tempranos del desarrollo, los astrocitos y los oligodendrocitos adquieren características muy similares (Figura 8), se decidió contabilizar el número de macroglías (oligodendrocitos y astrocitos) en los sujetos del día P7.



**Figura 8. Características de la tinción de Nissl en el día P7 vs P23 y P29. (A)**, representación de las células gliales mediante la tinción de Nissl en el día P7, los círculos amarillos representan la similitud entre este tipo de células. **(B)**, representación de las células gliales mediante la tinción de Nissl en el día P23, el círculo naranja representa un astrocyto y los círculos rojos representan oligodendrocitos. **(C)**, representación de las células gliales en el día P29. Escala de la barra: 10  $\mu$ m.

Nuestros resultados mostraron que la proporción del número de astrocitos en función del número total de células no cambia entre las cortezas (Figura 9A, Tabla 3;  $p=0.2431$ ). Sin embargo, el número de astrocitos disminuye de manera estadísticamente significativa conforme incrementa la edad del desarrollo (Figura 9B;  $F_{2,60}=23.11$ ,  $p<0.0001$ ).

Tabla 3.

Proporción de células gliales en diferentes regiones cerebrales con la técnica de Nissl.

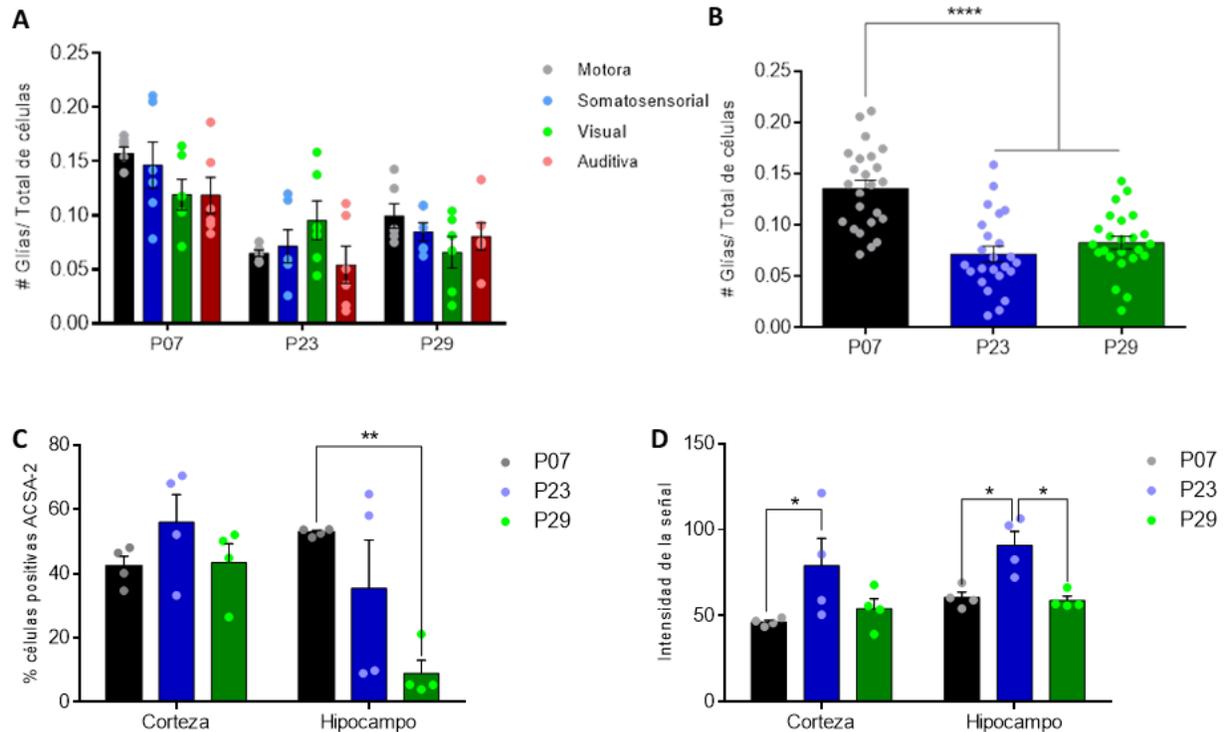
<i>Día posnatal</i>	<i>Motora</i>	<i>Somatosensorial</i>	<i>Visual</i>	<i>Auditiva</i>	<i>(p &lt; 0.05)</i>
<i>P7</i>	0.1573 ± 0.0153	0.1416 ± 0.0524	0.1193 ± 0.0352	0.1188 ± 0.0403	n.s
<i>P23</i>	0.0651 ± 0.0073	0.0715 ± 0.0373	0.0956 ± 0.0442	0.0543 ± 0.0421	n.s
<i>P29</i>	0.0996 ± 0.0275	0.0715 ± 0.0373	0.0659 ± 0.0357	0.0807 ± 0.0313	n.s

*Nota:* Se muestran las medias y desviaciones estándar de cada una de las regiones corticales. n.s no significativo utilizando ANOVA de dos vías y análisis post hoc de Tukey.

Con el fin de identificar cambios en el número de astrocitos durante el día P7, un análisis por medio de citometría de flujo fue realizado utilizando ACSA-2 (Astrocyte Cell Surface Antigen), un marcador mayoritario de astrocitos (Kantzer et al., 2017). Previamente, los criterios de detección fueron establecidos para diferenciar las marcadas con ACSA-2 de las células no marcadas. El umbral y el número de células positivas a ACSA-2 se muestra en el anexo 1.

Un análisis del número de células positivas a ACSA-2 (Figura 9C) muestra que al día P7 hay un mayor número de astrocitos en el hipocampo respecto a la corteza cerebral (corteza P7:  $42.35 \pm 6.140$  vs hipocampo P7:  $52.84 \pm 1.170$ , n.s). Adicionalmente, se pudo observar que al día P23 el número de astrocitos incrementa en la corteza cerebral (P7:  $42.35 \pm 6.140$  vs P23:  $56.01 \pm 17.25$  vs P29:  $43.43 \pm 11.68$ , n.s), pero disminuye en el hipocampo ( $F_{1,18}=5.471$ ,  $p=0.0311$ ). Sin embargo, el análisis de la intensidad de la fluorescencia indica un pico de intensidad en el día P23, tanto para corteza como para hipocampo (Figura 9D;  $F_{2,18}=9.833$ ,  $p=0.0013$ ).

## Densidad de células gliales en la corteza y el hipocampo en diferentes edades



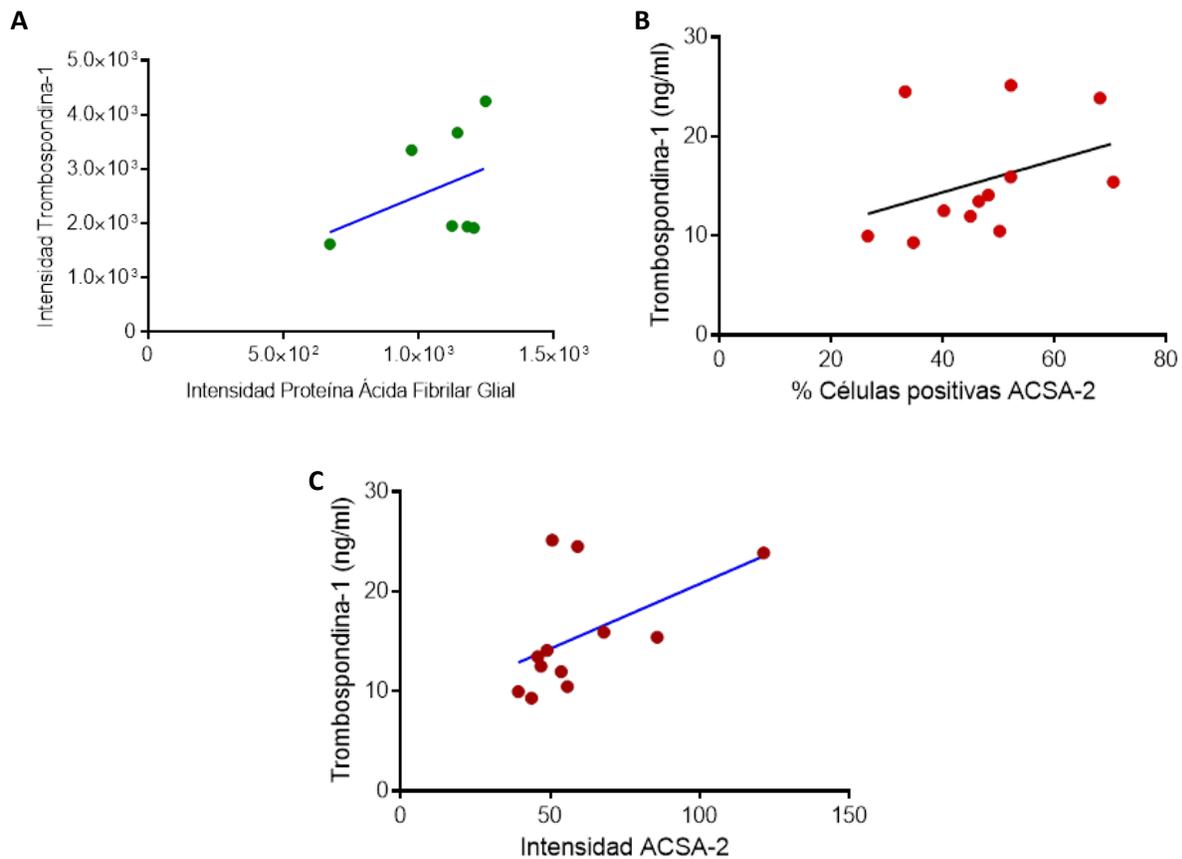
**Figura 9. Densidad de astrocitos en la corteza y el hipocampo en diferentes edades.** (A), número de células astrogliales en las distintas cortezas cerebrales. (B), ratio de células astrogliales en diferentes edades de la corteza cerebral de ratón. (C), porcentaje de células positivas a ACSA-2 en la corteza cerebral y el hipocampo. (D), Intensidad de la fluorescencia emitida por células positivas a ACSA-2. Media  $\pm$  E.E.M, ANOVA de dos vías,  $n=3$  por edad, excepto en C y D) donde  $n=4$  por edad. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

## Los niveles de expresión de TPS-1 no dependen del número de astrocitos durante el desarrollo postnatal

Con el fin de evaluar si existía una correlación entre el número de células astrogliales y los niveles de TSP-1 expresados durante el desarrollo, se realizó una doble inmunolocalización marcando a los astrocitos con la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), un marcador específico para astrocitos involucrado en procesos de Astroglisis reactiva (Bondan, Cardoso, Martins, & Otton, 2019; Kamphuis et al., 2012) y un anticuerpo contra TSP-1 (Figura 10). Un análisis de correlación entre los niveles de la fluorescencia emitida por los marcadores de GFAP y TSP-1 en la corteza cerebral no encontró alguna asociación significativa (Figura 10A;  $p=0.3919$ ), sugiriendo que los niveles de TSP-1 no dependían del número de células positivas a GFAP. Resultados similares

fueron obtenidos cuando la correlación se realizó con el marcador ACSA-2 (Figura 10B-C;  $p=0.2424$ ;  $p=0.0834$ ).

#### Niveles de TSP-1 y su relación con el número de células gliales en la corteza cerebral

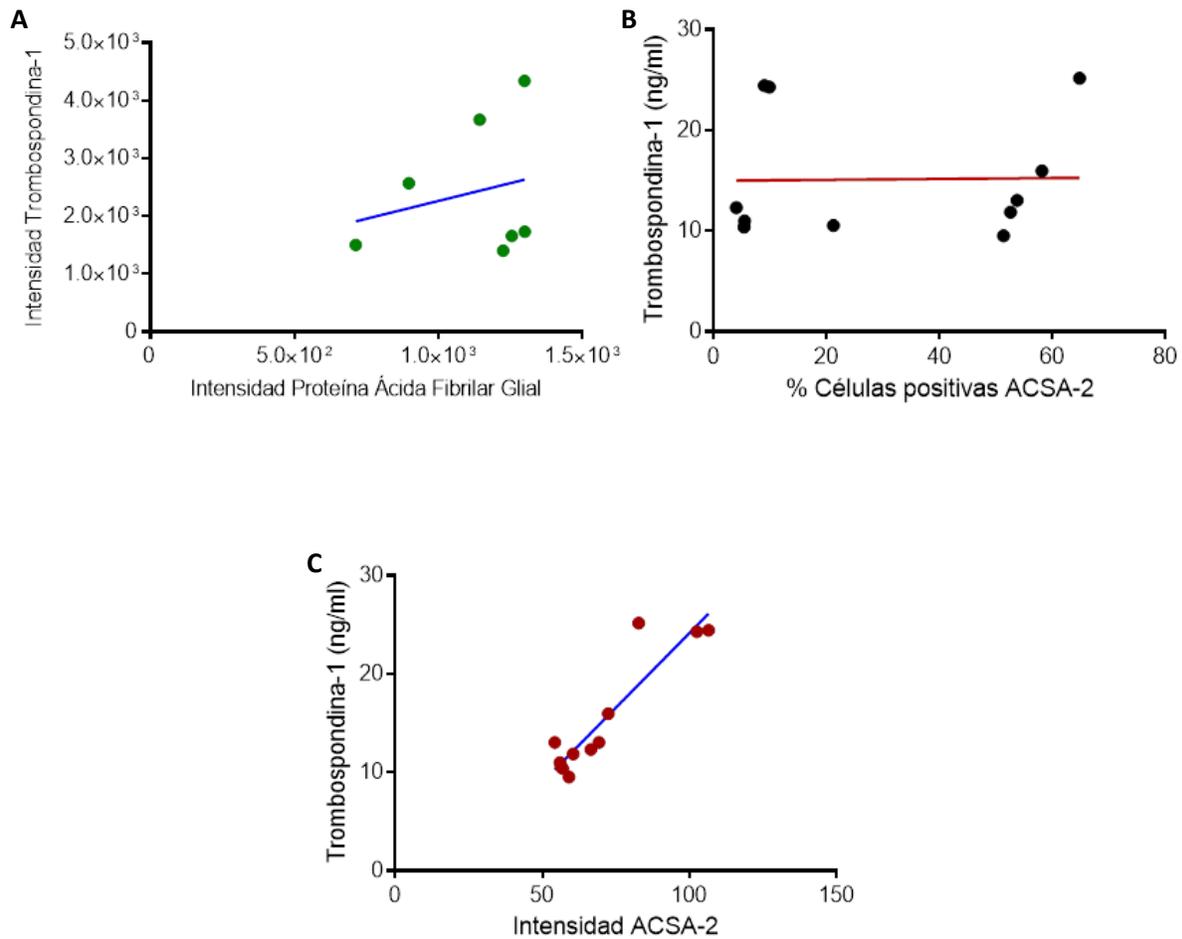


**Figura 10. Niveles de TSP-1 y su relación con el número de células gliales en la corteza cerebral.** (A) Análisis de correlación entre la inmunofluorescencia de GFAP y TSP-1 ( $r=0.3864$ , n.s). (B), correlación entre el porcentaje de células positivas a ACSA-2 y la expresión de TSP-1 ( $r=0.3657$ , n.s). (C), correlación entre la intensidad de la señal ACSA-2 y la expresión de TSP-1 ( $r=0.5195$ , n.s). Correlación de Pearson,  $n=7$ , excepto en B y C) donde  $n=12$ .

Del mismo modo, la relación entre los niveles de TSP-1 vs GFAP y TSP-1 vs el número de astrocitos marcados con ACSA-2 en el hipocampo tampoco resultó significativa (Figura 11A-B;  $p=0.6057$ ;  $p=0.9531$ ). Sin embargo, cuando esta relación se realizó utilizando la intensidad de la

fluorescencia de ACSA-2, se observó una correlación positiva entre ACSA-2 y TSP-1 (Figura 11D;  $r=0.9177$ ,  $p<0.0001$ ) sugiriendo una relación entre la expresión de este marcador y los niveles de TSP-1.

### Niveles de TSP-1 y su relación con el número de células gliales en el hipocampo



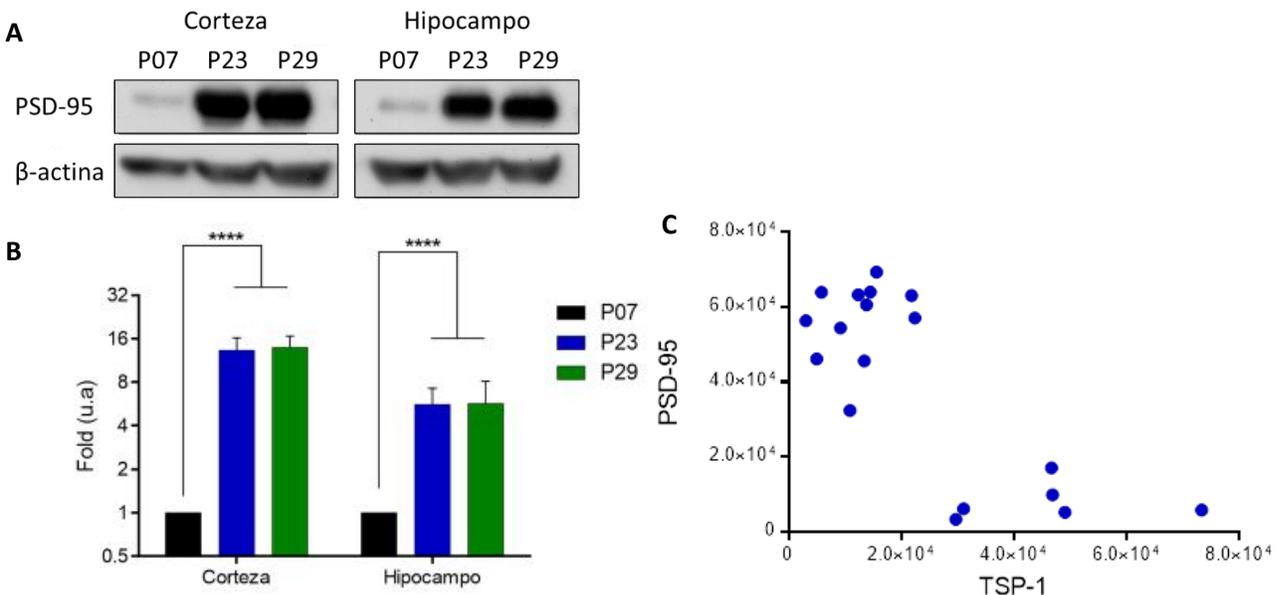
**Figura 11. Niveles de TSP-1 y su relación con el número de células gliales en el hipocampo.** (A), Análisis de correlación entre la inmunofluorescencia de GFAP y TSP-1 ( $r=0.2390$ , n.s). (B), correlación entre el porcentaje de células positivas a ACSA-2 y la expresión de TSP-1 ( $r=0.019$ , n.s). (C), correlación entre la intensidad de la señal ACSA-2 y la expresión de TSP-1 ( $r=0.9177$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ). Correlación de Pearson,  $n=7$ , excepto en B y C) donde  $n=12$ .

## La expresión de proteínas sinápticas puede ser modulada por TSP-1 durante el desarrollo postnatal

Con el fin de determinar si la expresión de TSP-1 se relacionaba con el desarrollo de las sinapsis excitatorias y de espinas dendríticas, se analizó la expresión de PSD-95, una proteína localizada principalmente en las sinapsis excitadoras e involucrada en el anclaje de receptores glutamatérgicos en la postsinapsis (El-Husseini, Schnell, Chetkovich, Nicoll, & Bredt, 2000).

Los resultados mostraron que la expresión de PSD-95 es baja al día P7, sin embargo, conforme avanza el desarrollo del cerebro, la expresión de PSD-95 incrementa significativamente tanto en corteza como en hipocampo (Figura 12A;  $F_{2, 12}=104.8$ ,  $p<0.0001$ ). El incremento en la expresión de PSD-95 se mantiene desde el día P23 al día P29 (Figura 12A). Con el fin de determinar si la TSP-1 podría tener una influencia sobre PSD-95, se realizó una correlación de Pearson. Nuestros datos muestran una correlación negativa entre los niveles de PSD-95 y los niveles de TSP-1 (Figura 12B;  $r=-0.7740$ ,  $p=0.0002$ ).

### Expresión de PSD-95 en corteza e hipocampo de ratón durante el desarrollo



**Figura 12. Expresión de PSD-95 en corteza e hipocampo de ratón durante el desarrollo.** (A), imagen representativa de Western Blot. (B), Cuantificación de la expresión de PSD-95. (C), Correlación entre la expresión de TSP-1 y PSD-95 ( $r=-0.7740$ ,  $*** p=0.0002$ ). Media  $\pm$  E.E.M, ANOVA de dos vías,  $n=3$  por edad.  $**** p\leq 0.0001$ . Correlación de Pearson,  $n=18$ .

## Discusión

La formación y maduración del SNC implica la activación de diversos genes, moléculas y vías de señalización a lo largo del desarrollo prenatal y postnatal. La activación de cada uno de estos mecanismos o de su conjunto durante un periodo particular dentro de una región específica del cerebro es necesaria para la maduración y refinamiento de las sinapsis, así como de la formación y optimización de los circuitos neuronales. En los últimos años se ha demostrado que muchas de las moléculas involucradas en el desarrollo del SNC son sintetizadas y secretadas por las células gliales, particularmente por los astrocitos. Entre las moléculas involucradas en estos mecanismos se encuentran factores tróficos, aminoácidos, colesterol, hevinas y TSPs (Baldwin & Eroglu, 2017; Chung et al., 2015; Dallérac et al., 2018). Particularmente, durante el desarrollo prenatal, se ha reportado una actividad intensa de estas moléculas durante periodos críticos mientras que en el periodo postnatal se ha observado una actividad discreta pero continua. Sin embargo, no es del todo claro cómo se desarrolla el refinamiento de los circuitos neuronales y plasticidad cerebral en etapas posteriores al nacimiento. Este punto es importante ya que a partir del nacimiento el cerebro se vuelve sensible al ambiente y a procesos dependientes de la experiencia siendo los primeros cinco años de vida las ventanas de tiempo durante el cual el cerebro es especialmente susceptible a estas influencias (Luby, Baram, Rogers, & Barch, 2020).

En este trabajo se comprobó de manera sistemática que la TSP-1, una proteína sintetizada y secretada por los astrocitos tiene una expresión y secreción diferencial a lo largo del desarrollo tanto en la corteza como en hipocampo en un modelo *in vivo* (ver Figura 7). Particularmente se observaron mayores niveles de expresión de TSP-1 al día postnatal 23, y menores niveles de expresión de TSP-1 entre los días postnatales 7 y 29 (Figura 7B). Por otro lado, trabajos han demostrado que durante el periodo embrionario la expresión de TSP-1 tiene una curva de expresión de unos pocos días (Iruela-Arispe et al., 1993), posteriormente su expresión se incrementa durante los primeros periodos postnatales y vuelve a disminuir en la edad adulta (Christopherson et al., 2005; Farhy-Tselnicker & Allen, 2018). Por lo tanto, los cambios tanto en la síntesis como en la secreción de TSP-1 durante el desarrollo del cerebro podrían estar involucrados con los mecanismos de proliferación y diferenciación de progenitores neuronales (Lu & Kipnis, 2010); migración neuronal (Blake et al., 2008), crecimiento de neuritas (DeFreitas et

al., 1995; O'Shea, Liu, & Dixita, 1991; Osterhout, Frazier, & Higgins, 1992; Yu, Chung, Deo, Thompson, & Turner, 2008), sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Crawford et al., 2012; Eroglu et al., 2009) y formación de circuitos corticales en ventanas específicas de tiempo (Kim et al., 2016).

También se encontró que el número de células gliales disminuye en las diferentes cortezas cerebrales conforme incrementa la edad cronológica de los ratones (Figura 9B). Al igual que la expresión de proteínas, la heterogeneidad celular durante el desarrollo del cerebro es dinámica (Q. Li et al., 2019), lo cual podría explicar los cambios en el número de células gliales, particularmente de los astrocitos. También se han reportado cambios en la morfología de los astrocitos durante el desarrollo del hipocampo y la corteza cerebral como un mecanismo involucrado en la maduración de la sinapsis (Testen et al., 2019). Sin embargo, la disminución en el número de células gliales difiere al número de células positivas a ACSA-2 (Figura 9B-C) a pesar de que la intensidad de la fluorescencia emitida por las células positivas a ACSA-2 resultó ser mayor en el día postnatal 23 tanto en corteza como en hipocampo (Figura 9D). Esto podría deberse a una mayor presencia de este antígeno como se ha encontrado en otros trabajos (Rosiewicz et al., 2020), sugiriendo mayor sensibilidad de ACSA-2 a antígenos glicosilados de astrocitos (Kantzer et al., 2017). Por otro lado, este incremento de la sensibilidad a ACSA-2 podría estar asociado a una subpoblación de astrocitos que expresan principalmente este antígeno, recientemente se ha demostrado que los astrocitos de la corteza cerebral presentan una gran heterogeneidad (Bayraktar et al., 2020), por lo que diversas subpoblaciones de astrocitos podrían intervenir en los mecanismos de maduración y transmisión sináptica. Las diversas subpoblaciones de astrocitos en la corteza podrían explicar porque no se observa una relación directa entre niveles de TSP-1 y el número de astrocitos (Figura 10B). Un proceso similar podría estar sucediendo en el hipocampo donde subpoblaciones de astrocitos correlacionarían los niveles de TSP-1 con los niveles de la intensidad de la fluorescencia emitida por ACSA-2 (Figura 11C). Estos resultados sugieren que durante el desarrollo postnatal los niveles de TSP-1 podrían depender de subpoblaciones de astrocitos que no pueden ser detectados por marcadores como GFAP o ACSA-2. Estas subpoblaciones también podrían explicar porque se observa una contradicción entre la secreción de TSP-1 determinada por ELISA y la expresión de esta proteína determinada por WB

(Figura 7B-C); un análisis de la expresión de TSP-1 con algún marcador de astrocitos inmaduros como GLAST (Deneen et al., 2006), con marcadores específicos de astrocitos en corteza como Nupr1 o Nnat (Bayraktar et al., 2020), isoformas de la GFAP (Kamphuis et al., 2012) o vimentina (Luo et al., 2017) podrían ayudar a identificar las subpoblaciones de astrocitos que participan en las diferentes etapas del desarrollo postnatal de la corteza e hipocampo.

Del mismo modo, Bayraktar et al. (2020) encontraron que los astrocitos se diferencian molecularmente y además tienen una distribución laminar en la corteza cerebral que depende principalmente de la profundidad cortical y edad del sujeto, con algunas variaciones en función de la región cortical analizada. Ellos, en contraste con nuestro estudio, realizaron y clasificaron los perfiles de expresión molecular de los astrocitos para encontrar esta distribución laminar de subpoblaciones de astrocitos, encontrando diferencias en la expresión de ciertos genes en función de la profundidad cortical y cómo esta expresión va cambiando, dependiendo de la región de la corteza que se esté analizando. Sin embargo, de forma similar a nosotros, ellos encontraron que existen ciertos genes que se expresan en edades tempranas (P14) pero que en la edad adulta su expresión disminuye (P56), muy similar a la expresión de TSP-1 que nosotros encontramos en el día P7 y que decrece en el día P23 y P29. Esto refuerza la idea de analizar genes de expresión temprana asociados a diferentes subpoblaciones de astrocitos que podrían estar regulando la traducción de diferentes proteínas entre las que podría estar la TSP-1 y así poder determinar de qué dependen los niveles de TSP-1 en la corteza cerebral y el hipocampo durante el desarrollo. Además, en concordancia con estos resultados Buosi, Matias, Araujo, Batista & Gómez (2017) encontraron que los astrocitos de distintas regiones cerebrales tenían potenciales sinaptogénicos diferentes debido a la expresión diferencial de proteínas sinaptogénicas como SPARC, Hevina y Glipicano 4. Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias en la expresión de TSP-1. La diferencia entre este estudio y el nuestro se debe principalmente a que los experimentos fueron realizados utilizando cultivos de astrocitos provenientes de diferentes regiones cerebrales de ratones neonatos, por lo que el factor de la edad no era determinante en el estudio.

La TSP-1 tiene una participación importante en los procesos de sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Eroglu et al., 2009), modulando la actividad presináptica (Crawford et al., 2012) o estimulando la formación de espinas dendríticas (Garcia et al., 2010), con el fin de

conocer más acerca de la TSP-1 en la formación de las sinapsis excitadoras durante el desarrollo postnatal, se trató de establecer una correlación entre los niveles de TSP-1 y la expresión de PSD95 (ver Figura 12). En este trabajo se observó un incremento de la expresión de PSD95 en el día postnatal 23 y 29 tanto en corteza como en hipocampo, sin embargo, a pesar de que este incremento está relacionado negativamente con los niveles de TSP-1 (Figura 12C), la evidencia señala que no hay mecanismos asociados entre la TSP-1 y la expresión de PSD95, pero si a los procesos sinaptogénicos (Christopherson et al., 2005; Eroglu et al., 2009), por lo que únicamente se podría considerar a la PSD-95 como un indicador de sinapsis maduras producto de la actividad de la TSP-1. El incremento de la expresión de PSD95 durante el desarrollo postnatal podría estar asociado a una maduración del astrocito que implica cambios en su morfología y no a la secreción de moléculas sinaptogénicas (Testen et al., 2019). El contacto físico entre la neurona y el astrocito a través de los procesos secundarios o pies gliales estimula la actividad sináptica excitatoria en edades tempranas del desarrollo, principalmente entre las edades P14 y P26 (Molofsky & Deneen, 2015). Adicionalmente, otras moléculas con actividad sinaptogénica como el colesterol, la hevína, factores tróficos u otras TSPs, podrían estar involucradas en la expresión de PSD95 y sinapsis excitatorias (Chung et al., 2015; Ferrer-Ferrer & Dityatev, 2018; Petrelli et al., 2020; Sakers & Eroglu, 2019)

En resumen, en este trabajo se confirmó de manera sistemática y utilizando un modelo *in vivo* que la TSP-1, una proteína con actividad sinaptogénica, muestra incrementos y decrementos en su síntesis y secreción en diversos estadios del desarrollo postnatal. Estos cambios podrían estar asociados a subpoblaciones de astrocitos que estén presentes durante el desarrollo. Del mismo modo, se observaron los efectos de la TSP-1 en la formación de sinapsis maduras a través de la evaluación de marcadores como la PSD-95. Alteraciones durante los periodos críticos del desarrollo postnatal pueden afectar la conectividad sináptica, produciendo alteraciones cognitivas y del comportamiento.

## Conclusiones

- Los niveles de expresión de la TSP-1 cambian durante el desarrollo postnatal según la edad.
- La corteza cerebral no presenta diferencias significativas de expresión de TSP-1 con el hipocampo.
- El número de células gliales disminuye durante el desarrollo postnatal según la edad.
- Los niveles de TSP-1 no dependen del número de astrocitos durante el desarrollo postnatal
- Los niveles de PSD-95 no parecen depender directamente de la expresión de TSP-1

Estos resultados en conjunto sugieren que la expresión de TSP-1 podría tener su origen en diferentes subpoblaciones de astrocitos y que estos a su vez puedan modular la plasticidad sináptica en periodos postnatales, principalmente en los periodos críticos de sinaptogénesis y gliogénesis temprana.

## Referencias

- Allen Institute for Brain Science. (2018). Brain Explorer (Versión 2) [Software de computación]. Recuperado de <http://mouse.brain-map.org/static/brainexplorer>
- Adams, J. C. (1997). Thrombospondin-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(6), 861–865. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00171-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00171-9)
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1538–1543. <https://doi.org/10.1038/nn2014>
- Asch, A. S., Leung, L. L., Shapiro, J., & Nachman, R. L. (1986). Human brain glial cells synthesize thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2904–2908. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2904>
- Baenziger, N. L., Brodie, G. N., & Majerus, P. W. (1971). A Thrombin-Sensitive Protein of Human Platelet Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(1), 240–243. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.1.240>
- Baldwin, K. T., & Eroglu, C. (2017). Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.006>
- Bayraktar, O. A., Bartels, T., Holmqvist, S., Kleshchevnikov, V., Martirosyan, A., Polioudakis, D., ... Rowitch, D. H. (2020). Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. *Nature Neuroscience*, 23(4), 500–509. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0602-1>
- Blake, S. M., Strasser, V., Andrade, N., Duit, S., Hofbauer, R., Schneider, W. J., & Nimpf, J. (2008). Thrombospondin-1 binds to ApoER2 and VLDL receptor and functions in postnatal neuronal migration. *The EMBO Journal*, 27(22), 3069–3080. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.223>
- Bondan, E. F., Cardoso, C. V., Martins, M. D. F. M., & Otton, R. (2019). Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats.

*Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 77(9), 601–608. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20190091>

- Bornstein, P. (2009). Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3–4), 189–200. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0060-8>
- Bornstein, P., Armstrong, L. C., Hankenson, K. D., Kyriakides, T. R., & Yang, Z. (2000). Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biology*, 19(7), 557–568. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00104-9)
- Buosi, A. S., Matias, I., Araujo, A. P. B., Batista, C., & Gomes, F. C. A. (2017). Heterogeneity in Synaptogenic Profile of Astrocytes from Different Brain Regions. *Molecular Neurobiology*, 55(1), 751–762. doi:10.1007/s12035-016-0343-z
- 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*, 9(1), 74. <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(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>
- Chung, W., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a020370. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>
- Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(5), 311–321. <https://doi.org/10.1038/nrn3484>
- Crawford, D. C., Jiang, X., Taylor, A., & Mennerick, S. (2012). Astrocyte-Derived Thrombospondins Mediate the Development of Hippocampal Presynaptic Plasticity In Vitro. *Journal of Neuroscience*, 32(38), 13100–13110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2604-12.2012>

- Dallérac, G., Zapata, J., & Rouach, N. (2018). Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: where, when and how? *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(12), 729–743.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0080-6>
- DeFreitas, M. F., Yoshida, C. K., Frazier, W. A., Mendrick, D. L., Kypta, R. M., & Reichard, L. F. (1995). Identification of integrin  $\alpha\beta 1$  as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron*, *15*(2), 333–343. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90038-1)
- Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C. J., Gronostajski, R. M., & Anderson, D. J. (2006). The Transcription Factor NFIA Controls the Onset of Gliogenesis in the Developing Spinal Cord. *Neuron*, *52*(6), 953–968. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.019>
- El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A., & Bredt, D. S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5495), 1364–1368. <https://doi.org/10.1126/science.290.5495.1364>
- Eroglu, C. (2009). The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *1*, 167–176.  
<https://doi.org/10.1007/s12079-009-0078-y>
- Eroglu, C., Allen, N. J., Susman, M. W., O'Rourke, N. A., Park, C. Y., Özkan, E., ... Barres, B. A. (2009). Gabapentin Receptor  $\alpha 2\delta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell*, *139*(2), 380–392.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.025>
- Farhy-Tselnicker, I., & Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: A tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development*, *13*(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1186/s13064-018-0104-y>
- Ferrer-Ferrer, M., & Dityatev, A. (2018). Shaping Synapses by the Neural Extracellular Matrix. *Frontiers in Neuroanatomy*, *12*(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00040>
- Firlej, V., Mathieu, J. R. R., Gilbert, C., Lemonnier, L., Nakhlé, J., Gallou-Kabani, C., ... Cabon, F. (2011). Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate

tumors. *Cancer Research*, 71(24), 7649–7658. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0833>

García-Cabezas, M. Á., John, Y. J., Barbas, H., & Zikopoulos, B. (2016). Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(107), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00107>

Garcia, 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), 0–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014200>

Girard, F., Eichenberger, S., & Celio, M. R. (2014). Thrombospondin 4 deficiency in mouse impairs neuronal migration in the early postnatal and adult brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 61, 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.06.010>

Hilton, D. A., & Shivane, A. G. (2015). *Neuropathology Simplified. A guide for Clinicians and Neuroscientists*. Switzerland: Cham: Springer, 2015. [https://doi.org/DOI 10.1007/978-3-319-14605-8](https://doi.org/DOI%2010.1007/978-3-319-14605-8)

Hoey, S. [EJNeuroscience]. (2014, May 19). *Isolation of adult brain hippocampus* [Video file]. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=Upf15CB29V4>

Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M., & Bergles, D. E. (2013). Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Neuroscience*, 16(6), 668–676. <https://doi.org/10.1038/nn.3390>

Iruela-Arispe, M. L., Liska, D. J., Sage, E. H., & Bornstein, P. (1993). Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 197(1), 40–56. <https://doi.org/10.1002/aja.1001970105>

Kamijo, H., Miyagaki, T., Takahashi-Shishido, N., Nakajima, R., Oka, T., Suga, H., ... Sato, S. (2019). Thrombospondin-1 promotes tumor progression in cutaneous T-cell lymphoma via CD47. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0622-6>

- Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Jansen, A. H. P., ... Hol, E. M. (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS ONE*, 7(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042823>
- Kantzer, C. G., Boutin, C., Herzig, I. D., Wittwer, C., Reiß, S., Tiveron, M. C., ... Bosio, A. (2017). Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia*, 65(6), 990–1004. <https://doi.org/10.1002/glia.23140>
- Kettenmann, H., & Ransom, B. R. (2013). *Neuroglia*. (H. Kettenmann & B. R. Ransom, Eds.) (3rd ed.). New York, NY: Oxford University Press.
- Kim, S. K., Hayashi, H., Ishikawa, T., Shibata, K., Shigetomi, E., Shinozaki, Y., ... Nabekura, J. (2016). Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *Journal of Clinical Investigation*, 126(5), 1983–1997.  
<https://doi.org/10.1172/JCI82859>
- Krishna, S. M., & Golledge, J. (2013). Review: The role of thrombospondin-1 in cardiovascular health and pathology. *International Journal of Cardiology*, 168(2), 692–706.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.139>
- Li, Q., Cheng, Z., Zhou, L., Darmanis, S., Neff, N. F., Okamoto, J., ... Barres, B. A. (2019). Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron*, 101(2), 207–223.e10.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.006>
- Li, Y., Turpin, C. P., & Wang, S. (2017). Role of thrombospondin 1 in liver diseases. *Hepatology Research*, 47(2), 186–193. <https://doi.org/10.1111/hepr.12787>
- Liau, J., Hoang, S., Choi, M., Eroglu, C., Choi, M., Sun, G. H., ... Steinberg, G. K. (2008). Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(10), 1722–1732.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.65>
- Ling, E. A., Paterson, J. A., Privat, A., Mori, S., & Leblond, C. P. (1973). Investigation of glial cells

- in semithin sections I. identification of glial cells in the brain of young rats. *J Comp Neurol*, 149, 43–72. <https://doi.org/10.1002/cne.901490104View/save>
- Lu, Z., & Kipnis, J. (2010). Thrombospondin 1--a key astrocyte-derived neurogenic factor. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(6), 1925–1934. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150573>
- Luby, J. L., Baram, T. Z., Rogers, C. E., & Barch, D. M. (2020). Neurodevelopmental Optimization after Early-Life Adversity: Cross-Species Studies to Elucidate Sensitive Periods and Brain Mechanisms to Inform Early Intervention. *Trends in Neurosciences*, 43(10), 744–751. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.08.001>
- Luo, H., Wu, X.-Q., Zhao, M., Wang, Q., Jiang, G.-P., Cai, W.-J., & Luo, M.-Y. (2017). Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in central nervous system development of rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1185–1189. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.027>
- Martinez, J. (2005). Trombospondina : ¿ un nuevo mediador de las estatinas en el endotelio ? *Clin Invest Arterioscl*, 17(6), 283–285.
- Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001>
- Mendus, D, Rankin-Gee, E. K., Mustapha, M., & Porter, B. E. (2015). Increased sensitivity to kindling in mice lacking TSP1. *Neuroscience*, 305, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.075>
- Mendus, Diana, Sundaresan, S., Grillet, N., Wangsawihardja, F., Leu, R., Müller, U., ... Mustapha, M. (2014). Thrombospondins 1 and 2 are important for afferent synapse formation and function in the inner ear. *European Journal of Neuroscience*, 39(8), 1256–1267. <https://doi.org/10.1111/ejn.12486>
- Molofsky, A. V., & Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*, 63(8), 1320–1329. <https://doi.org/10.1002/glia.22836>

- O'Rourke, K. M., Laherty, C. D., & Dixit, V. M. (1992). Thrombospondin 1 and thrombospondin 2 are expressed as both homo- and heterotrimers. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(35), 24921–24924.
- O'Shea, K. S., Liu, L. H. J., & Dixit, V. M. (1991). Thrombospondin and a 140 kd fragment promote adhesion and neurite outgrowth from embryonic central and peripheral neurons and from PC12 cells. *Neuron*, *7*(2), 231–237. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90261-W](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90261-W)
- Osterhout, D. J., Frazier, W. A., & Higgins, D. (1992). Thrombospondin promotes process outgrowth in neurons from the peripheral and central nervous systems. *Developmental Biology*, *150*(2), 256–265. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90240-H](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90240-H)
- Petrelli, F., Dall'érac, G., Pucci, L., Calì, C., Zehnder, T., Sultan, S., ... Bezzi, P. (2020). Dysfunction of homeostatic control of dopamine by astrocytes in the developing prefrontal cortex leads to cognitive impairments. *Molecular Psychiatry*, *25*(4), 732–749. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0226-y>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., & White, L. E. (2012). *Neuroscience*. (D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A.-S. LaMantia, L. E. White, ... M. L. Platt, Eds.) (Fifth). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Rama Rao, K. V., Curtis, K. M., Johnstone, J. T., & Norenberg, M. D. (2013). Amyloid- $\beta$  inhibits thrombospondin 1 release from cultured astrocytes: effects on synaptic protein expression. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *72*(8), 735–744. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31829bd082>
- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in Human Neuroscience*, *10*. [doi:10.3389/fnhum.2016.00566](https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566)
- Rosiewicz, K. S., Crowley, T., Saher, G., Kerkerling, J., Alisch, M., & Siffrin, V. (2020). Comparison of RNA isolation procedures for analysis of adult murine brain and spinal cord astrocytes. *Journal of Neuroscience Methods*, *333*, 108545.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108545>

Sakers, K., & Eroglu, C. (2019). Control of neural development and function by glial neuroligins. *Current Opinion in Neurobiology*, 57, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.03.007>

Sims, J. N., & Lawler, J. (2015). Thrombospondin-1-Based Antiangiogenic Therapy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 31(7), 366–370. <https://doi.org/10.1089/jop.2015.0018>

Son, S. M., Nam, D. W., Cha, M.-Y., Kim, K. H., Byun, J., Ryu, H., & Mook-Jung, I. (2015). Thrombospondin-1 prevents amyloid beta-mediated synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(12), 3214–3227. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.005>

Spitzer, N. C. (2017). Neurotransmitter Switching in the Developing and Adult Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 40(1), 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031204>

Stein, J. J., Iwuchukwu, C., Maier, K. G., & Gahtan, V. (2014). Thrombospondin-1-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation are functionally dependent on microRNA-21. *Surgery*, 155(2), 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2013.08.003>

Sultan, F. A. (2013). Dissection of Different Areas from Mouse Hippocampus. *Bio-protocol*, 3(21): e955. doi:10.21769/BioProtoc.955

Testen, A., Ali, M., Sexton, H. G., Hodges, S., Dubester, K., Reissner, K. J., ... Risher, M.-L. (2019). Region-Specific Differences in Morphometric Features and Synaptic Colocalization of Astrocytes During Development. *Neuroscience*, 400, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.044>

Tyzack, G. E., Sitnikov, S., Barson, D., Adams-Carr, K. L., Lau, N. K., Kwok, J. C., ... Lakatos, A. (2014). Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression. *Nature Communications*, 5(1), 4294. <https://doi.org/10.1038/ncomms5294>

- Verkhatsky, A., & Butt, A. (2007). *Glial Neurobiology. Glial Neurobiology: A Textbook*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470517796>
- Verkhatsky, A., & Butt, A. (2013). *Glial Physiology and Pathophysiology. Glial Physiology and Pathophysiology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118402061>
- Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Bobo-Jimenez, V., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., ... Bolaños, J. P. (2019). Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nature Metabolism*, 1(2), 201–211. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0031-6>
- 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>
- Yu, J.-Y., Chung, K.-H., Deo, M., Thompson, R. C., & Turner, D. L. (2008). MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Experimental Cell Research*, 314(14), 2618–2633. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.06.002>
- Zhan, J. S., Gao, K., Chai, R. C., Jia, X. H., Luo, D. P., Ge, G., ... Yu, A. C. H. (2017). Astrocytes in Migration. *Neurochemical Research*, 42(1), 272–282. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2089-4>
- Zhao, C., Isenberg, J. S., & Popel, A. S. (2018). Human expression patterns: qualitative and quantitative analysis of thrombospondin-1 under physiological and pathological conditions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(4), 2086–2097. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13565>

# Anexos

Anexo 1. Criterios de detección para la citometría de flujo. **A**, umbral establecido para diferenciar controles negativos. **B**, criterio establecido para determinar eventos positivos a ACSA-2.

