



Efectos de la proteína SPARC sobre la maduración de las sinapsis autápticas colinérgicas

David Albrecht

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de doctorado en Biomedicina

**Efectos de la proteína SPARC sobre la
maduración de las sinapsis
autápticas colinérgicas**

Tesis doctoral

David Albrecht

Laboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Director de Tesis: Artur Llobet Berenguer

Barcelona, 2012

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona, 2012

DAVID EUGENIO ALBRECHT

El interesado,

David Eugenio Albrecht

El director de la tesis,

Artur Llobet Berenguer

Barcelona, diciembre de 2012

A mis padres,
A mi familia,
A Fabi.

ÍNDICE

*“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo”
Benjamín Franklin*

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	I
Índice de tablas	IV
Abreviaturas y nomenclatura	V
Introducción	1
1 Aspectos funcionales de la interacción neurona-glía	6
2 Actividad sinaptogénica de las células gliales	10
3 Red perineuronal y plasticidad sináptica	18
3.1 Estructura y composición de la MEC en el sistema nervioso	18
3.2 Efectos de la red perineuronal sobre la plasticidad sináptica	24
4 Proteínas matricelulares	28
4.1 Función de las proteínas matricelulares en el sistema nervioso	31
4.2 La familia SPARC de proteínas matricelulares	36
4.2.1 Papel funcional de SPARC en el sistema nervioso	37
4.2.2 Función de los otros miembros de la familia SPARC en el sistema nervioso	42
5 Organización de los depósitos de vesículas en el terminal presináptico	45
5.1 Aspectos funcionales de los depósitos de vesículas sinápticas	47
5.2 Neurotransmisión y depósitos de vesículas sinápticas: una discusión vigente	51
6 Maduración sináptica	55
6.1 Desarrollo y maduración de los depósitos de vesículas	56
6.2 Moléculas de adhesión celular, red perineuronal y maduración sináptica	58
Objetivos	67
Materiales y Métodos	71
1 Microcultivo de neuronas del ganglio cervical superior	73
2 Cultivo celular masivo	78
2.1 Cultivo primario de células de glía periférica	78
2.2 Obtención de medios condicionados por células gliales	79
2.3 Cultivo de líneas celulares	80
3 Técnica de inmunofluorescencia	81
4 Cuantificación del número de contactos axosómicos en un microcultivo	82
5 Electrofisiología	83

5.1	Experimentos de <i>Patch Clamp</i>	83
5.2	Análisis de registros de la respuesta evocada	85
5.3	Análisis de registros de la respuesta espontánea	85
6	Microscopía electrónica de transmisión correlativa con la electrofisiología	86
7	Modificación genética de células en cultivo	89
8	Análisis de proteínas en los medios condicionados	90
9	Detección y cuantificación de proteínas en los medios condicionados	93
9.1	Técnica de <i>Western blot</i>	93
9.2	Técnica de <i>Dot blot</i>	93
9.3	Técnica de ELISA	94
10	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	96
11	Soluciones	97
	Resultados	103
1	Fenotipos de la glía periférica del ganglio cervical superior en cultivo	105
2	Identificación de productos secretados por las células de Schwann en cultivo	109
3	Purificación de SPARC	115
4	Efecto de SPARC sobre la neurotransmisión evocada y espontánea	124
5	Efecto de SPARC sobre la organización funcional de los depósitos de vesículas sinápticas	129
5.1	Estudio electrofisiológico	129
5.2	Estudio de electrofisiología y microscopía confocal correlativa	131
6	Efecto de SPARC sobre la ultraestructura del terminal presináptico	137
7	Efecto de la aplicación local de SPARC sobre la plasticidad sináptica	141
8	Expresión de SPARC durante la maduración de las sinapsis del Ganglio Cervical Superior <i>in vivo</i>	148
9	Producción de SPARC y maduración de las células gliales	150
	Discusión	155
	Conclusiones	169
	Bibliografía	173
	Anexo I: Protocolos detallados	i
	Preparación de colágeno	iii
	Protocolo de Elisa indirecto	vi
	Protocolo de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	vii
	Protocolo general de inmunofluorescencia	x

Protocolo de elaboración de geles de una dimensión	xii
Protocolo de elaboración de geles de dos dimensiones	xiii
Tinción de proteínas con solución Coomassie	xiv
Tinción de proteínas por tinción de plata	xiv
Protocolo de <i>Western blot</i>	xiv
Protocolo de <i>Dot blot</i>	xv
Anexo II: Artículos publicados	xvii
Agradecimientos	

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Interacción neurona-glia	6
Figura 2. Modelo de sinapsis tripartita	8
Figura 3. Modelo de sinapsis tetrapartita	9
Figura 4. Regulación del desarrollo de la sinapsis por las células gliales	14
Figura 5. Matriz extracelular en el sistema nervioso central	22
Figura 6. Modelo de las etapas de la adhesión celular e inducción al estado de adhesión intermedio por las proteínas matricelulares	30
Figura 7. Estructura modular de los miembros de la familia de trombospondinas	31
Figura 8. Representación esquemática de la estructura de un monómero de Tenascina-C	34
Figura 9. Proteínas de la familia de SPARC	36
Figura 10. Estructura de SPARC humana	39
Figura 11. Las vesículas se liberan de forma espontánea y evocada	46
Figura 12. Caracterización de los depósitos de vesículas mediante microscopía electrónica	49
Figura 13. Modelos de los depósitos de vesículas	50
Figura 14. Modelos de segregación de las vesículas que participan en la neurotransmisión espontánea y evocada	55
Figura 15. Modelo de la formación de los depósitos de vesículas durante el desarrollo de la sinapsis	58
Figura 16. Modelo de maduración sináptica mediada por las moléculas de adhesión celular	64
Figura 17. Representación esquemática de la expresión postnatal de la red perineuronal, TSPs, Hevin y SPARC	66

Materiales y Métodos

Figura 18. Material quirúrgico usado en la disección.	74
Figura 19. Jeringa de tres cuerpo y frasco atomizador	75
Figura 20. Imágenes de microcultivos SCM representativos	78
Figura 21. Registro electrofisiológico	83
Figura 22. Trazo representativo de un registro de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura	85

Figura 23: Esquematización de la formación del bloque de resina con la muestra	87
Figura 24. Identificación de la muestra en el protocolo de microscopía electrónica correlativa	88
Figura 25. Representación esquemática de varios métodos de transfección	89
Figura 26. Gel de dos dimensiones: isoelectroenfoco (primera dimensión)	91
Figura 27. Gel de dos dimensiones: gel de poliacrilamida (segunda dimensión)	92
Figura 28. Representación esquemática de un protocolo de ELISA	95
 Resultados	
Figura 29. Esquema de diferenciación de las células de Schwann y los marcadores presentes durante el proceso	106
Figura 30. Caracterización de las células gliales en cultivo	107
Figura 31. Las células gliales en cultivo corresponden a células de Schwann inmaduras	108
Figura 32. Visualización de proteínas presentes en medios condicionados por células gliales en cultivo	110
Figura 33. Perfil proteico de medios condicionados por células de Schwann	110
Figura 34. Las células de Schwann del SCG producen trombospondina 2	111
Figura 35. Gel de dos dimensiones de un MC-Sc	112
Figura 36. Cuantificación de SPARC en medios condicionados por células de Schwann	115
Figura 37. Análisis de medio condicionado por células PYS-2	116
Figura 38. Purificación de SPARC	117
Figura 39. Cromatograma de intercambio iónico de medio enriquecido en SPARC (I)	118
Figura 40. Cromatograma de intercambio iónico de medio enriquecido en SPARC (II)	119
Figura 41. Cromatografía de exclusión	120
Figura 42. Cromatograma de intercambio iónico de medio enriquecido en SPARC (III)	121
Figura 43. Dot blot contra SPARC	121
Figura 44. Cromatografía de exclusión	122
Figura 45. Identificación de las fracciones que contienen SPARC en cromatografía de exclusión	122
Figura 46. Gel de acrilamida con tinción de plata	123

Figura 47. Acción de 0,24 nM SPARC sobre la neurotransmisión	126
Figura 48. Efecto de SPARC sobre la actividad espontánea	126
Figura 49. Acción de 2,4 nM SPARC sobre la neurotransmisión	128
Figura 50. Relación entre recuperación frente a pulso pareado y frecuencia de la actividad espontánea	128
Figura 51. Estudio del agotamiento vesicular	130
Figura 52 Cálculo del tamaño del RRP mediante la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia	132
Figura 53 Cálculo del tamaño del número de terminales presinápticos	134
Figura 54. Distribución de sinápsis axosomáticas	135
Figura 55. SPARC reduce el tamaño de RRP, medido electrofisiológicamente	136
Figura 56. Electrofisiología y Microscopía electrónica correlativa	139
Figura 57. Resumen de los efectos de SPARC en el botón sináptico	140
Figura 58. Resumen de los efectos de SPARC en el número de vesículas del botón sináptico	141
Figura 59. Efecto de la aplicación local de SPARC	142
Figura 60. Secreción de SPARC por células COS7 transfectadas	144
Figura 61. Imágenes de SCM con células COS7	145
Figura 62. Neurotransmisión en SCM con células COS7	146
Figura 63. Efecto sobre la de la liberación local de SPARC por células COS7 sobre la neurotransmisión en SCM	147
Figura 64. Expresión de SPARC Y NICD en el Ganglio Cervical Superior	149
Figura 65. Cuantificación de la expresión de SPARC	149
Figura 66. Efecto de DAPT en la morfología de las células de Schwann	151
Figura 67. Concentraciones nanomolares de DAPT inducen la diferenciación de las células de Schwann	152
Figura 68. DAPT disminuye la secreción de SPARC	152
Discusión	
Figura 69. Efecto de las células de Schwann y de SPARC sobre la neurotransmisión	161
Figura 70. Terminales presinápticos desarrollados con SPARC muestran un fenotipo inmaduro	163

Anexo I

Figura 72. Esquema del método de transferencia <i>sándwich</i>	vX
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Moléculas identificadas en medios condicionados de astrocitos, con una acción sinaptogénica potencial	17
Tabla 2. Proteoglicanos de la matriz extracelular del SNC	21
Tabla 3. Ratones KO generados para distintas moléculas de la matriz extracelular	27
Tabla 4. Características de los distintos depósitos de vesículas	49

Materiales y Métodos

Tabla 5. Materiales empleados en el cultivo primario de neuronas	74
--	----

Resultados

Tabla 6. Cuadro resumen con los marcajes realizados a las células de Schwann en cultivo	109
Tabla 7. Proteínas observadas en los geles 2D e identificadas por espectrometría de masa	113
Tabla 8. Identificación de SPARC/Osteonectina	114
Tabla 9. Estimación de la cantidad de SPARC purificado	123

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AMPA:** α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiónico
- ARN:** ácido ribonucleico
- ATP:** adenosita trifosfato
- CAM:** moléculas de adhesión celular (acrónimo del inglés *cellular adhesion molecules*)
- CNTF:** factor neurotrófico ciliar (acrónimo del inglés *ciliary neurotrophic factor*)
- DIV:** Días *In Vitro*
- ELISA:** por su acrónimo del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- EPSC:** corriente postsináptica excitatoria (acrónimo del inglés *Excitatory Postsynaptic Current*)
- FBS:** suero fetal bovino
- GABA:** ácido gamma-butírico
- GFP:** proteína fluorescente verde (acrónimo el inglés *Green Fluorescence Protein*)
- GM:** acrónimo del inglés *Glial Microculture*
- Hz:** Hercios
- LTD:** depresión a largo plazo (acrónimo del inglés *Long-Term Depression*)
- LTP:** potenciación a largo plazo (acrónimo del inglés *Long-Term Potentiation*)
- mA:** miliamperios
- MC-Sc:** medio condicionado por células de Schwann
- MEC:** matriz extracelular
- mEPSC:** corriente postsináptica excitatoria en miniatura
- ms:** milisegundos
- mV:** milivoltios
- NGF:** factor de crecimiento nervioso (acrónimo del inglés *nerve growth factor*)
- NICD:** acrónimo del inglés *NOTCH intracelular domain*
- NMDA:** N-metil-D-aspartato
- NX:** neurexinas
- pA:** picoamperios
- PBS:** Tampón fosfato salino
- RRP:** depósito de vesículas de liberación rápida
- RS:** suero de rata
- s:** segundos

SCG: ganglio cervical superior (acrónimo del inglés *Superior Cervical Ganglion*)

SCM: acrónimo del inglés *Single-Cell Microculture*

SDS-PAGE: acrónimo del inglés Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel
Electrophoresis)

SF: medio de cultivo sin suero (acrónimo del inglés *Serum Free*)

SMOC: acrónimo del inglés *Secreted Modular Calcium Binding Proteins*

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

SPARC: acrónimo del inglés *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*

TN: tenascina

TSP: Trombospondina

INTRODUCCIÓN

“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes

INTRODUCCIÓN

El estudio de los principios que rigen el funcionamiento del cuerpo humano se remonta desde la antigüedad hasta la actualidad, alcanzándose la comprensión de la composición de los organismos con la invención del microscopio y con los trabajos realizados en forma independiente por los anatomistas Matthias Jakob Schleiden (1838) y Theodor Schwann (1839), quienes propusieron a la célula como la unidad estructural de toda materia viva. A pesar de la aceptación de esta teoría, se siguió considerando al cerebro como un tejido formado por una estructura continua como una red, debido a la dificultad de observar una unidad individual en las preparaciones del tejido nervioso. La teoría celular del sistema nervioso fue propuesta por Ramón y Cajal, quien mediante la tinción argéntica demostró que las neuronas no formaban una red de fibras interconectadas, como aseguraba la teoría reticular, sino que se encontraban separadas en unidades.

Las células del sistema nervioso están divididas principalmente en dos grupos: las células nerviosas (neuronas) y las células gliales (glía). Las neuronas tienen la capacidad de transmitir señales eléctricas rápidas, en la forma de un potencial de acción, y comunicarse entre ellas o con el tejido que inervan mediante la neurotransmisión. Las células del sistema nervioso que no poseen la capacidad de transmitir señales eléctricas son clasificadas como células gliales o neuroglia.

Las neuronas crecen formando circuitos y comunicándose unas con otras mediante una unión intercelular especializada llamada sinapsis. La señalización neuronal involucra el desarrollo de un potencial de acción, que se propaga por el axón hasta el terminal presináptico; donde despolariza el terminal y libera los neurotransmisores, que se unen a los receptores ubicados en la membrana postsináptica. Las células gliales no generan potenciales de acción, pero rodean y engloban los cuerpos neuronales, axones y sinapsis a lo largo de todo el sistema nervioso.

La neuroglia fue descrita por primera vez en 1858 por Rudolf Virchow, quien la caracterizó como un tejido conectivo cuya función era la unión de los elementos del sistema nervioso. La naturaleza celular de la glía fue descrita en la década de 1870 por Camillo Golgi. Los astrocitos fueron nombrados por Michael von Lenhossek en 1891, para luego ser

subclasificados en astrocitos protoplasmáticos o astrocitos fibrosos (ver a continuación), por Rudolf Albert von Kölliker (1889) y William Lloyd Andriezen (1893), según su ubicación en la sustancia blanca o en la sustancia gris, respectivamente (Parpura et al., 2012).

Las células gliales se clasifican en base a su morfología, función y localización en el sistema nervioso, por lo que hay distintas clases de glía. En los mamíferos se clasifican en microglía y macroglía, compuesta esta última por astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann (Allen and Barres, 2009). En contra a la macroglía y a las neuronas, que derivan del neuroectodermo, la microglía proviene del tejido mesodérmico periférico y corresponde a fagocitos mononucleares residentes del sistema nervioso. Adicionalmente, las células endodiales, la glía de Bergmann en el cerebelo y las células de Müller en la retina se clasifican como glía

Los astrocitos o astrogliá, son el tipo celular más abundante en el sistema nervioso central (SNC). Si bien a principios del siglo 20, Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal describieron distintas morfologías para este tipo celular, tradicionalmente han sido estudiadas como un grupo celular homogéneo. Este grupo celular tienen en común la presencia de múltiples procesos y prolongaciones, algunos de los cuales forman procesos pediculares o podocitos, que están en contacto con vasos sanguíneos, con neuronas o con la pía madre. Además de la subclasificación original de acuerdo a su ubicación, los astrocitos íntimamente ligados al soma neuronal reciben el nombre de astrocitos protoplasmáticos, y aquellos que se encuentran directamente relacionados con los axones, se les denomina astrocitos fibrosos. Los últimos estudios señalan la existencia de una mayor heterogeneidad de la astrogliá, tanto en diversas partes del cerebro como en una misma región del cerebro. Existen diferentes poblaciones de astrocitos que, además de diferir en su morfología, se distinguen por el origen de los precursores, el potencial de proliferación, la expresión génica, el potencial de membrana de reposo y la capacidad para recaptar glutamato. (revisado en (Zhang and Barres, 2010).

Los oligodendrocitos y las células de Schwann son células que se encuentran en el SNC y en el sistema nervioso periférico (SNP) respectivamente, las cuales poseen escasas prolongaciones. En el SNP, las células de Schwann derivan de la cresta neural, dando origen a células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes (revisado en (Jessen and Mirsky, 2005; Mirsky et al., 2008).

Los oligodendrocitos, en el SNC, y las células de Schwann mielinizantes en el SNP, emiten prolongaciones membranosas que se enrollan en una espiral compacta en torno a los axones, formando la vaina de mielina. Las zonas del axón que se encuentran mielinizadas se les denomina internodos, y las zonas no mielinizadas que se encuentran entre los internodos, se les denomina nodos de Ranvier. La mielinización de los axones asegura una conducción del potencial de acción rápida y saltatoria (Sherman and Brophy, 2005; Hartline and Colman, 2007; Nave and Trapp, 2008).

Tradicionalmente, a la macroglía se le han atribuido las siguientes funciones:

1. Actuar como soporte físico para las neuronas, dando estructura al encéfalo.
2. Producir la vaina de mielina, la cual aísla los axones, permitiendo así un incremento en la velocidad de la neurotransmisión. La mielina es sintetizada por los oligodendrocitos y células de Schwann.
3. Mantener el entorno sináptico, mediante la eliminación de detritos tras las lesiones ó la eliminación de transmisores químicos liberados por las neuronas, para sustentar las condiciones óptimas para una neurotransmisión eficiente.
4. Favorecer la migración y el crecimiento de los axones.
5. Formar la barrera hematoencefálica (por los astrocitos), un revestimiento impermeable de los capilares y vénulas del encéfalo que evita que las sustancias tóxicas de la sangre entren en el cerebro.
6. Producir factores de crecimiento.

En las últimas décadas se han obtenido evidencias experimentales que plantean que las células gliales, junto con las funciones clásicas que le han sido atribuidas, poseen un papel más activo durante el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso, debido a que podrían actuar coordinadamente con las funciones neuronales. En el siguiente apartado se explicarán las evidencias experimentales que sustentan el planteamiento de las nuevas funciones asignadas a las células gliales.

1 Aspectos funcionales de la interacción neurona-glia.

En las pasadas décadas el interés por la función de las células gliales se ha visto incrementado, principalmente por una posible implicación de este tipo celular tanto en la formación de la sinapsis como en el procesamiento de la neurotransmisión. Este interés viene dado principalmente por la proximidad característica de la neuroglia con la sinapsis (Ventura and Harris, 1999). La idea de que la glía estaría participando en la formación de la sinapsis, se deriva de la observación de que en roedores existe una correlación temporal entre la formación de sinapsis y el desarrollo de los astrocitos. Por ejemplo, los axones de las células ganglionares de la retina alcanzan el colículo superior en torno al día embrionario 16 (E16), pero estas células, así como otras neuronas del SNC, comienzan a formar sus sinapsis dentro de las tres primeras semanas postnatales, después de que se ha completado la diferenciación de los astrocitos y cuando ha comenzado la generación de los oligodendrocitos en el SNC (Pfrieger and Barres, 1996; Ullian et al., 2001). Esta coincidencia temporal se observa sólo en las sinapsis glutamatérgicas, ya que las sinapsis gabaérgicas establecen conexiones funcionales durante el desarrollo embrionario antes de la generación de los astrocitos. En el caso de la glía periférica, se observa que su diferenciación comienza tras el parto (Mirsky et al., 2008), y en el caso particular del ganglio cervical superior, este período de maduración glial coincide con el desarrollo del árbol dendrítico de las neuronas ganglionares y con el incremento de las conexiones axodendríticas (Rubin, 1985a, b, c).

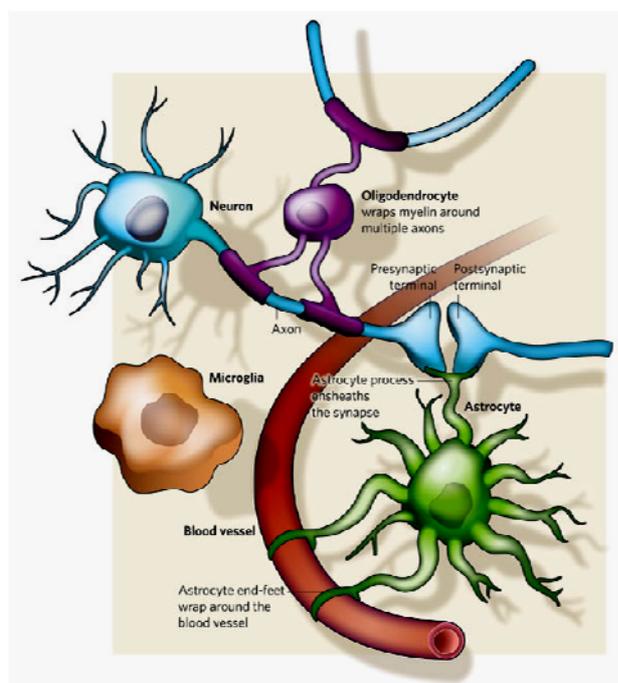


Figura 1. Interacción neurona-glia. Diferentes tipos de glía interaccionando con neuronas y los vasos sanguíneos circundantes. Oligodendrocitos envuelven los axones con mielina para aumentar la velocidad de transmisión. Astrocitos extienden procesos que están en contactos con vasos sanguíneos y sinapsis. La microglía reacciona frente a daños o infección en el cerebro. Adaptada de Allen y Barres, 2009 (Allen and Barres, 2009).

La ubicación de las células gliales en torno a los contactos sinápticos (figura 2A), también ha llevado a plantear una participación más activa de las células gliales en la transmisión sináptica. El desarrollo de indicadores fluorescentes de calcio permeables a la membrana celular, permitió estudiar las señales de calcio intracelulares en células intactas. Empleando estos compuestos, Cornell-Bell y colaboradores (Cornell-Bell et al., 1990) observaron que la activación de los receptores de glutamato en el astrocito, generaba un incremento en los niveles de calcio intracelular, observación que fue ampliada por el trabajo realizado por Dani y colaboradores (Dani et al., 1992) quienes plantearon que los astrocitos pueden detectar la transmisión sináptica glutamatérgica, incrementando el interés sobre el papel que poseen la astrogliá en la neurotransmisión. Un estudio posterior señaló que tras el incremento intracelular de calcio, los astrocitos liberan glutamato al medio extracelular induciendo un incremento del calcio intracelular de las neuronas adyacentes (Parpura et al., 1994). Adicionalmente, un estudio realizado por Araque y colaboradores, demostró que la liberación de glutamato por parte del astrocito induce una corriente de entrada lenta en las neuronas adyacentes, señalando que las células gliales podrían modular la actividad sináptica (Araque et al., 1998b), planteándose que la sinapsis estaría compuesta por el terminal presináptico, el terminal postsináptico y las células gliales, dando origen al modelo de la sinapsis tripartita (Araque et al., 1999). Una de las evidencias que sustenta la participación de los astrocitos en la denominada sinapsis tripartita, es que la astrogliá puede liberar diversas moléculas neuroactivas, tales como glutamato, D-serina, ATP, adenosina, GABA, TNF- α , prostaglandinas, proteínas y péptidos que pueden tener una actividad potencial sobre la actividad neuronal y la plasticidad sináptica (Perea et al., 2009). El efecto modulador del glutamato sobre la actividad sináptica fue demostrado inicialmente en cultivos de neuronas hipocampales, en donde se observaba un incremento en la frecuencia de la neurotransmisión espontánea y una depresión en la neurotransmisión evocada (Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b) . El efecto de los astrocitos sobre la plasticidad sináptica ha sido revisado recientemente (Zorec et al., 2012), por lo que a continuación mencionaremos brevemente los argumentos señalados en esta revisión, los cuales respaldan este modelo.

Evidencias experimentales señalan que el glutamato liberado por los astrocitos incrementan la amplitud de las corrientes asociadas a la neurotransmisión evocada y la frecuencia de la neurotransmisión espontánea a través de la activación de los receptores de glutamato presinápticos, en las sinapsis hipocampales. La liberación de glutamato también induciría una potenciación en las sinapsis inhibitorias. Junto con el glutamato, la liberación de ATP, o su producto metabólico adenosina, podrían modular la transmisión sináptica, incrementando la

depresión sináptica en las sinapsis hipocampales a través de la activación de los receptores presinápticos A_1 . El hecho de que el astrocito pueda regular la transmisión sináptica a través de la liberación de más de un factor, evidencia un alto grado de complejidad en la interacción entre las neuronas y las células gliales (figura 2)

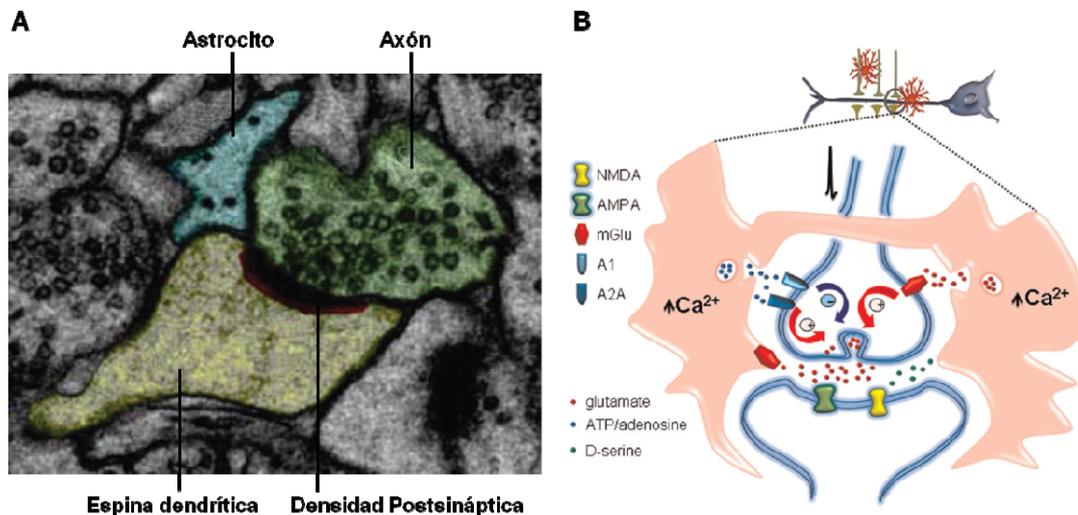


Figura 2. Modelo de sinapsis tripartita. Este modelo de sinapsis plantea que los astrocitos forman parte integral de la sinapsis, existiendo una relación tanto funcional como estructural entre las células gliales y las neuronas. **A)** imagen de microscopía electrónica mostrando una sinapsis tripartita del hipocampo. El proceso astrocitario (en azul) envuelve el área perisináptica. El axón de la neurona se muestra en verde, con las espinas dendríticas en amarillo y la densidad postsináptica en rojo y negro. Adaptado de Eroglu y Barres 2010 (Eroglu and Barres, 2010). **B)** Representación esquemática de una sinapsis tripartita, en donde el astrocito modula la transmisión sináptica. La actividad neuronal incrementa el calcio intracelular, generando la liberación de diversas moléculas desde el astrocito, tales como glutamato, ATP/adenosina o D-serina, las cuales actuarían sobre los receptores específicos AMPA, NMDA, mGluR y receptores de adenosina (A_1 y A_{2A}), localizados en el terminal presináptico o postsináptico. La activación de las señales intracelulares de estos receptores se traduciría en una potenciación o depresión de la transmisión sináptica. Modificado de Zorec y colaboradores, 2012 (Zorec et al., 2012).

No obstante las evidencias experimentales que apoyan el planteamiento de la sinapsis tripartita, este modelo permanece controvertido debido a las evidencias que indican que el astrocito no participaría activamente en la transmisión sináptica. El primer argumento contrario al modelo de la sinapsis tripartita deriva de la observación de que las células gliales no ejercen un efecto sobre una neurona en particular, porque la liberación de los moduladores gliales afectan a todas la neuronas cercanas y probablemente a las neuronas que se encuentran a mayor distancia. La ausencia de una estructura organizada en donde ocurra la liberación y que se encuentre yuxtapuesta a la densidad postsináptica, equivalente a las zonas activas del terminal presináptico, sustenta esta observación. Adicionalmente, evidencias experimentales apuntan a que la concentración de glutamato contenido en las vesículas en los astrocitos es insuficiente para activar los receptores neuronales (Bramham 1990). Además, las metodologías aplicadas para

demostrar el efecto de los astrocitos sobre la transmisión sináptica no son del todo específicas (Hamilton and Attwell, 2010). Por ejemplo, a) el uso de neurotoxinas para bloquear la exocitosis vesicular también podrían bloquear otros mecanismos de liberación dependientes de calcio; b) el uso de fármacos para estimular a los astrocitos es un mecanismo inespecífico porque estas drogas también actúan directamente sobre las neuronas, dificultando el estudio de la acción de los astrocitos sobre las neuronas; c) la estimulación mecánica de las células gliales para inducir un incremento del calcio intracelular, posee el mismo efecto sobre las neuronas adyacentes; d) las maniobras empleadas para incrementar el calcio intracelular de la glía, podrían activar los canales de potasio dependientes de calcio, liberando potasio al medio extracelular y activando a las neuronas cercanas. Por último, los ratones transgénicos desarrollados para controlar el calcio intracelular en los astrocitos, no muestran ningún efecto modulador en la actividad neuronal (Agulhon 2010).

Estudios recientes sugieren que los componentes del modelo de la sinapsis tripartita emplean moléculas solubles para interactuar directa o indirectamente con la red perineuronal, la matriz extracelular del sistema nervioso central, que se distribuye por el soma neuronal y las dendritas proximales (Dityatev and Schachner, 2003; Galtrey and Fawcett, 2007; Faissner et al., 2010; Gundelfinger et al., 2010). La red perineuronal interactuaría con los componentes de la sinapsis mediante la limitación de la difusión de neurotransmisores, iones calcio y de proteínas; actuando como un tampón o reservorio para estas proteínas, planteando la intervención de la red perineuronal en la homeostasis extracelular y en la plasticidad sináptica (Dityatev et al., 2010b; Gundelfinger et al., 2010). Estas observaciones sugieren que la red perineuronal participaría como un cuarto elemento de la sinapsis, en un modelo denominado *synaptic quadriga* (Dityatev et al., 2006) o sinapsis tetrapartita (Dityatev et al., 2010a), representada en la figura 3.

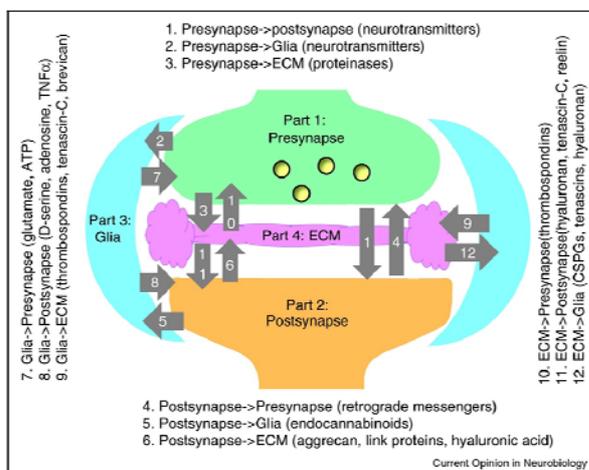


Figura 3. Modelo de sinapsis tetrapartita. Representación esquemática de la sinapsis tetrapartita, en donde los componentes de la sinapsis interactuarían a través de 12 vías de señalización posibles. Los ejemplos de moléculas de señalización se indican entre paréntesis. Abreviaciones ECM: matriz extracelular, CSPGs, proteoglicanos condroitina sulfato. Adaptada de Dityatev y Rusakov, 2011 (Dityatev and Rusakov, 2011)

Resultados previos obtenidos en el laboratorio de Neurobiología, demostraron que las células gliales periféricas incrementan la frecuencia de la actividad espontánea así como la depresión a corto plazo, determinadas en sinapsis autápticas de neuronas colinérgicas en cultivo, en donde la glía periférica modifica la neurotransmisión espontánea mediante la alteración en la cinética de liberación de las vesículas sinápticas (Perez-Gonzalez et al., 2008; Pérez González, 2011). Un estudio inicial de los mecanismos por los cuales la glía estaría ejerciendo esta acción, determinó que las células gliales en cultivo secretan factores que modifican la neurotransmisión espontánea (Pérez González, 2011). A su vez, se observó que la glía modifica la plasticidad a corto plazo en neuronas desarrolladas, para lo cual se requiere una proximidad entre las células gliales y los procesos neuronales específico, ya que el contacto inespecífico entre las neuronas y células no neuronales (COS-7) no modifica la plasticidad sináptica.

Considerando estos antecedentes, uno de los objetivos planteados para el desarrollo de esta tesis era la identificación de los factores solubles secretados por las células gliales y su efecto sobre la plasticidad sináptica, determinando que la glía periférica en cultivo secreta la proteína matricelular SPARC, la cual modifica la plasticidad sináptica a corto plazo y define la maduración de los terminales presinápticos. Para contextualizar estos resultados, en la introducción se describirán: 1) las moléculas secretadas por las células gliales que participan en la formación de los contactos sinápticos o sobre la plasticidad sináptica; 2) la red perineuronal y las proteínas matricelulares, en función de los efectos que poseen en el sistema nervioso; 3) La organización de los depósitos de vesículas en el terminal presináptico y; 4) el proceso de la maduración sináptica.

2 Actividad sinaptogénica de las células gliales

La correspondencia entre el desarrollo de las sinapsis y la glía nos sugiere una relación causal entre ellas, las cuales han sido estudiadas en diversas preparaciones *in vitro*. Por ejemplo, las neuronas ganglionares de la retina cultivadas en ausencia de células gliales muestran una baja neurotransmisión espontánea, incluso tras varias semanas de cultivo o cuando se co-cultivan con neuronas purificadas del colículo superior; sin embargo, la actividad espontánea se ve incrementada cuando estas neuronas se cultivan en presencia de una mono-capa de astrocitos o en presencia de medio condicionado por astrocitos (Pfrieger and Barres, 1997). Estudios realizados en microcultivos de neuronas ganglionares de la retina muestran que la glía incrementa tanto el

número de sinapsis como la frecuencia de la actividad espontánea y la eficacia de la neurotransmisión, mediante la secreción de factores solubles (Nägler et al., 2001). Asimismo, motoneuronas purificadas de la espina dorsal presentan una baja actividad sináptica, a menos que estén presentes los astrocitos ó las células de Schwann (Ullian et al., 2004b). Estudios realizados en neuronas del hipocampo en cultivo muestran que tanto los astrocitos como los factores solubles que secretan, incrementan el número total de sinapsis (Elmariah et al., 2005; Hughes et al., 2010; Pyka et al., 2011). Un estudio reciente ha demostrado que la aplicación de medios condicionados por astrocitos incrementa el número de terminales presinápticos y promueve la maduración de las sinapsis inhibitorias en cultivos organotípicos del sistema auditivo embrionario de pollo (Korn et al., 2012).

La capacidad sinaptogénica de las células gliales no sería exclusivas para la glía central, ya que en el SNP se ha demostrado que las células de Schwann inducen la formación de sinapsis glutamatérgicas funcionales entre motoneuronas espinales en cultivo (Ullian et al., 2004b); y que los medios condicionados por las células de Schwann aumentan el número de uniones neuromusculares de *Xenopus*, en cultivo (Peng et al., 2003). Tomados en conjunto, estos resultados muestran que tanto los astrocitos como las células de Schwann secretan factores solubles que incrementan tanto el número de sinapsis como la actividad sináptica.

El efecto de las células gliales sobre el incremento del número de sinapsis, se puede deber tanto a la inducción de la formación de nuevas sinapsis como a la estabilización de las sinapsis ya formadas. El trabajo realizado por Ullian y colaboradores (Ullian et al., 2001) demuestra que los astrocitos estabilizan el número de sinapsis formadas mediante la secreción de factores, ya que la sustracción de los astrocitos del cultivo genera una disminución en el número de sinapsis, cuantificadas por inmunofluorescencia. Sin embargo, la función de la astrogliá no se limitaría solamente a este mecanismo porque, tomados en conjunto, los trabajos anteriormente mencionados sugieren que los astrocitos también participan en la formación de nuevas sinapsis, por lo que este tipo glial incrementaría la sinaptogénesis mediante el establecimiento y la estabilización de las sinapsis, siendo necesario más investigaciones para una mejor comprensión de estos mecanismos.

Diversas moléculas han sido identificadas como las mediadoras del efecto de las células gliales sobre el desarrollo de las sinapsis ó sinaptogénesis, proceso que involucra varios pasos, como la extensión de las neuritas, el reconocimiento de los sitios de contacto, la especialización sináptica, maduración y mantenimiento de la sinapsis (Garner et al., 2006).

El TGF β -1 (*transforming growth factor beta 1*) ha sido identificado como uno de los factores mediante el cual las células de Schwann promueven la formación de sinapsis *in vitro* en la unión neuromuscular (Feng and Ko, 2008), aunque de una forma indirecta. Los autores muestran que este factor incrementa los niveles neuronales de agrina, la cual regula la expresión y la acumulación de los receptores nicotínicos (Peng et al., 2003). Sin embargo, la aplicación de TGF β -1 no reproduce la potenciación de la actividad espontánea observada al aplicar medios condicionados por células de Schwann (Cao and Ko, 2007), indicando que la acción de las células de Schwann implica otros factores, además de TGF β -1.

La proteína trombospondina (TSP) ha sido identificada como el componente por el cual los astrocitos promueven la formación de sinapsis en las neuronas ganglionares de la retina, en donde la aplicación de TSP-1 y TSP-2 sobre estas neuronas en cultivo produce un incremento en el número de sinapsis glutamatérgicas, simulando el efecto obtenido al aplicar los medios condicionados de astrocitos (Christopherson et al., 2005). La acción específica de esta proteína se corroboró al emplear anticuerpos contra TSP-2, para eliminarla del medio condicionado de astrocitos, observándose que los medios empobrecidos en TSP-2 no inducían sinaptogénesis. Las sinapsis inducidas por la TSP presentan un terminal presináptico funcional y con una ultraestructura normal, en el cual se observa liberación y reciclado de vesículas sinápticas, sin embargo, no se evidencia un incremento en la frecuencia de la actividad espontánea. La falta de respuesta postsináptica, a pesar de tener un terminal presináptico funcional, se debe a la falta de receptores de glutamato de tipo AMPA, por lo que a estas sinapsis se les ha denominado sinapsis silentes (Christopherson et al., 2005).

Por el contrario, en neuronas hipocampales en cultivo, tras la aplicación de TSP-1 en las mismas condiciones que en el cultivo de neuronas ganglionares de la retina, se observa un incremento en la formación de sinapsis entre los 5-8 días de cultivo. Este efecto no se traduce en un aumento en la densidad sináptica después de 14-17 días en cultivo (DIV o Días *In Vitro*) respecto a las neuronas no tratadas (Xu et al., 2010). Estos resultados nos indican que en las

neuronas hipocampales, la TSP-1 aceleraría la sinaptogénesis en las neuronas inmaduras, sin una repercusión posterior en el número final de sinapsis en las neuronas maduras.

En el cerebro de ratón, la expresión de TSP-1 y -2 es máxima durante el período sinaptogénico, entre los días postnatales 5-10, observándose una disminución de la expresión en el cerebro adulto, lo que concordaría con la función sinaptogénica descrita *in vitro*. Estas observaciones se confirman en los ratones *Knock Out (KO)* para TSP-1 y -2, los cuales muestran un menor número de sinapsis en la corteza, identificadas mediante inmunofluorescencia (Christopherson et al., 2005).

Si consideramos que los astrocitos y los medios condicionados por éstos pueden inducir tanto una actividad presináptica como postsináptica (Nägler et al., 2001), y que la trombospondina sólo puede inducir un aumento de sinapsis silentes, se refuerza la observación de que el efecto de la neuroglia sobre el desarrollo de la sinapsis se debe a más de un factor (figura 4).

Estudios paralelos, realizados en las neuronas ganglionares de la retina, han identificado al colesterol derivado de la glía, como un componente que promueve diversos aspectos del desarrollo de la sinapsis (Mauch et al., 2001), que incluyen la diferenciación de las dendritas, así como la estabilidad y eficacia de la liberación de neurotransmisores (Goritz et al., 2005). Esta observación se vio reforzada al demostrar que las neuronas producían una menor cantidad de colesterol respecto a la neuroglia, y que las neuronas dependen del colesterol producido por la glía para formar sinapsis eficientes (Pfrieger, 2003; Nieweg et al., 2009). Como podemos apreciar, se han descrito diversos factores secretados por la glía que poseen una actividad sinaptogénica, los cuales, no obstante, no pueden reproducir los efectos observados al emplear los medios condicionados por las células gliales, por lo que estudios enfocados en la identificación de los factores secretados por los astrocitos (Lafon-Cazal et al., 2003; Cahoy et al., 2008; Dowell et al., 2009), podrían facilitar la identificación de nuevas vías de señalización sinaptogénicas mediadas por la glía.

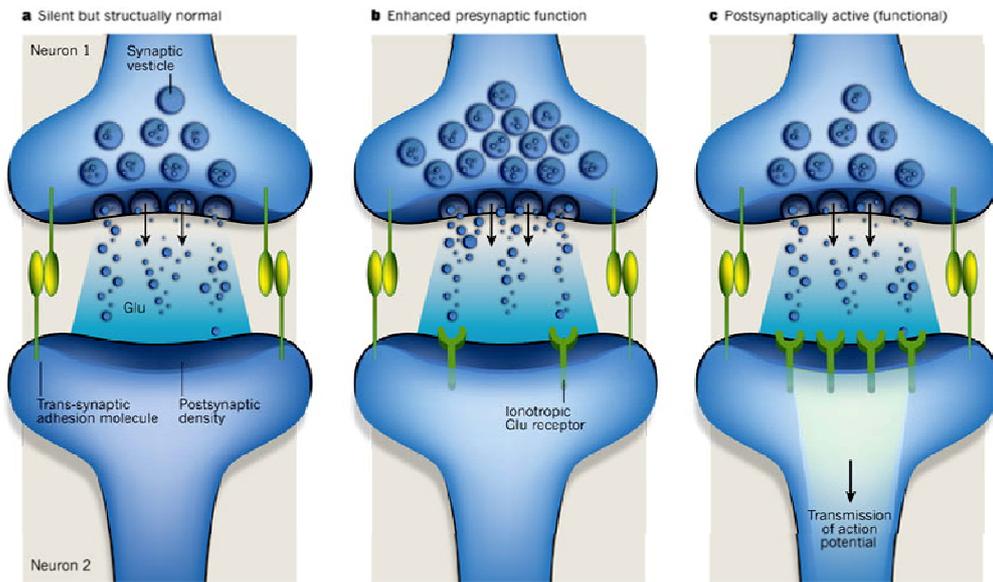


Figura 4. Regulación del desarrollo de la sinapsis por las células gliales. Distintos estudios realizados en las células ganglionares de la retina en cultivo, muestran que existen al menos tres clases de factores secretados por los astrocitos, que controlarían distintos aspectos del desarrollo de las sinapsis glutamatérgicas. A) El tipo uno induce una formación estructural normal de la sinapsis, pero con un componente postsináptico silencioso. La trombospondina es un ejemplo para este tipo de factores B) Un segundo tipo facilita la actividad presináptica e incrementa la probabilidad de liberación del neurotransmisor, siendo el colesterol un ejemplo para este caso. C) Un tercer tipo que induce la formación de sinapsis funcionales o convierte las sinapsis silenciosas en sinapsis activas mediante la facilitación de la inserción de receptores glutamato en el sitio postsináptico. Adaptado de Eroglu y Barres, 2010 (Eroglu and Barres, 2010).

Como podemos observar, el efecto de la glía ha sido estudiado mayoritariamente en las sinapsis excitatorias, pero poco se sabe del mecanismo por el cual la glía ejerce su acción en las sinapsis inhibitorias. Estudios iniciales demostraron que los astrocitos incrementaban la corriente asociada a los receptores del ácido gamma-butírico (GABA), efecto que fue asociado inicialmente al contacto entre las neuronas y los astrocitos (Liu et al., 1996), para luego determinar que la interacción física entre la neurona y el astrocito no era primordial para la acción de los astrocitos sobre las sinapsis inhibitorias (Liu et al., 1997). Posteriormente se ha demostrado que tanto los astrocitos como los medios condicionados por los astrocitos, incrementan el número de sinapsis gabaérgicas, la agrupación de los receptores GABA_A en la membrana celular, la frecuencia de la neurotransmisión inhibitoria y, finalmente, la arborización y extensión del axón (Elmariah et al., 2005; Hughes et al., 2010). A diferencia de los resultados obtenidos con las neuronas excitatorias, el tratamiento de las neuronas gabaérgicas con colesterol o con TSP no reproduce los efectos observados con el co-cultivo de los astrocitos o con la aplicación de los medios condicionados por este tipo celular, indicándonos que estos efectos estarían mediados por otros factores secretados (Elmariah et al., 2005; Hughes et al., 2010).

Los resultados obtenidos por los trabajos expuestos, han despertado el interés de los investigadores en la comprensión de los mecanismos por el cual la glía, y los factores que estas secretan, tienen sobre la sinaptogénesis. Este interés se ve reflejado en el hecho de que en el último año se han publicado diversos trabajos que describen nuevas moléculas con actividad sinaptogénica que son secretadas por los astrocitos. Kucukdereli y colaboradores (Kucukdereli et al., 2011), describieron las proteínas matricelulares hevin y SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*) como reguladoras de la sinaptogénesis de las neuronas ganglionares de la retina. En este estudio, los autores muestran que hevin es una proteína secretada por los astrocitos, la cual incrementa el número de sinapsis glutamatérgicas cuantificadas en las neuronas ganglionares de la retina. Las sinapsis inducidas por hevin presentan una ultraestructura, un tamaño de terminal presináptico y un número de vesículas presinápticas comparables con las observadas en los controles, a pesar de lo cual no se observa un incremento en la actividad espontánea, concluyendo que tanto hevin como las TSP forman sinapsis silentes. Adicionalmente, este estudio sugiere que hevin es responsable de la actividad sinaptogénica remanente que se observa en las neuronas tratadas con medios condicionados que no expresan TSP -1 y -2, ya que las neuronas tratadas con medios condicionados de astrocitos obtenidos de ratones *KO* para TSP-1 y -2, y en los cuales se han eliminado hevin del sobrenadante, presentan una actividad sinaptogénica comparable a la de las neuronas no tratadas.

Como consecuencia de la observación de que hevin no induce unos efectos sinaptogénicos que compensen la falta de las TSP en el medio condicionado de astrocitos, los investigadores estudiaron el efecto de la proteína SPARC, la cual es estructuralmente similar a hevin y que también es secretada por los astrocitos, observando que si bien ambas proteínas promovieron el crecimiento y la arborización de las neuritas, SPARC no promueve la formación de sinapsis en las neuronas. Al contrario, los autores proponen que SPARC antagonizaría el efecto sinaptogénico de hevin (Kucukdereli et al., 2011).

A razón de que tanto las TSPs como hevin incrementan sólo el número de sinapsis silentes, el grupo de Ben Barres ha continuado con la búsqueda de moléculas que induzcan la formación de sinapsis funcionales o conviertan las sinapsis silentes en sinapsis activas; es así como en un estudio reciente han identificado una serie de nuevas moléculas secretadas por los astrocitos que poseen actividad sinaptogénica (Allen et al., 2012). En este trabajo, los autores señalan 25 moléculas candidatas, referidas en la tabla 1, dentro de las cuales identificaron los glicanos -4 y -6, que pertenecen a la familia de los proteoglicanos heparán sulfato. Los

glipicano-4 y -6 incrementaron la frecuencia y la amplitud de los mEPSC de las neuronas ganglionares de la retina y aumentaron el número de sinapsis en aproximadamente tres veces, respecto a las neuronas no tratadas. Adicionalmente, estas proteínas incrementaron la expresión de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA en la membrana neuronal. La eliminación de los glipicanos-4 y -6 del medio condicionado se tradujo en que no se observara un incremento en la amplitud de los mEPSC ni de la expresión de GluA1 en la membrana neuronal. Sin embargo, la reducción de estas proteínas no alteró la capacidad del medio condicionado para incrementar la actividad sináptica ni la formación de sinapsis, probablemente debido a la presencia de otros factores tales como la trombospondina y hevin (Kucukdereli et al., 2011). Este estudio, además, demostró que el glipicano-4 ejerce sus efectos cuando está presente en una concentración entre 0,1 y 10 nM, sin que se observen efectos a mayores concentraciones. Los efectos de esta proteína están espaciadas temporalmente: tras 18 horas de tratamiento se observó un incremento en la expresión de GluA1 en las membranas neuronales, y tras 3 días de tratamiento se observó un incremento en el número de sinapsis. De estos resultados se desprende que el glipicano-4 induce la formación de nuevas sinapsis tras el incremento de GluA1, ejerciendo una acción complementaria a la observada para la TSP, que induce la formación de sinapsis silentes.

In vivo, los glipicanos-4 y -6 se expresan en todo el cerebro durante el desarrollo postnatal. El glipicano-4 es expresado mayoritariamente en el hipocampo y el glipicano-6 en el cerebelo, decreciendo sus niveles de expresión con la maduración del cerebro. Las funciones observadas *in vitro* para el glipicano-4, se estudiaron en un ratón *KO* para esta proteína, específicamente en el área CA1 del hipocampo, en donde se pudo apreciar una disminución de la amplitud de los minis y del número de sinapsis a los 12 días postnatales, diferencias que no se observaron una vez maduras las sinapsis. No obstante, se apreció una disminución en la expresión de GluA1 en la membrana. Estos resultados estarían señalando que el efecto de los astrocitos sobre la maduración sináptica, se debería a la liberación de distintas moléculas a escalas temporales diferentes, como serían las trombospondinas y los glipicanos.

Proteína	Gen	PM (Da)	PI
Biglicano	Bgn	41696	6,83
Proteína precursora de amieloide	App	86649	4,73
Apolipoproteína E	ApoE	38302	5,89
Carboxipeptidasa E (CPH)	Cpe	53275	5,07
Clusterin/ApoJ	Clu	51342	5,47
Glipicano-4	Gpc4	62522	5,73
<i>Milk fat globule EGF factor 8</i>	Mfge8	47382	6,74
Neurocano (CSPG3)	Ncan	135460	5,29
Brevican (CSPG7)	Bcan	95997	4,85
Ceruloplasmina	Cp	120588	5,39
Alfa-2 macroglobulina	A2m	163598	5,87
Hevin	Sparcl1	70590	4,59
<i>Lectin, galactosidase binding, 3</i>	Lgals3	63731	5,14
Perlecano	Hspg2	398039	5,88
Fibromodulina	Fmod	43192	5,67
<i>Amyloid like protein 2</i>	Aplp2	86661	4,68
Glipicano-1	Gpc1	61695	6,86
Glipicano-6	Gpc6	64299	5,52
<i>Immunoglobulin superfamily receptor 8</i>	Igsf8	65069	8,40
<i>Retinoic acid receptor responder 1</i>	Rarres1	31932	6,01
Glicoproteína m6b	Gpm6b	36186	5,76
Osteomodulina	Omd	49751	5,12
<i>Tweety homolog 1</i>	Ttyh1	48913	4,96
<i>Prostaglandin F2 receptor negative regulator</i>	Ptgfrm	98669	6,16
<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta 1</i>	Ptprz1	255183	4,75
Fibulina 2	Fbln2	131874	4,53

Tabla 1. Moléculas identificadas en medios condicionados de astrocitos, con una acción sinaptogénica potencial. PM: peso molecular, PI: punto isoeléctrico. Adaptado de Allen y colaboradores, 2012 (Allen et al., 2012).

Como podemos observar, la mayoría de las proteínas que afectan la sinaptogénesis tienen en común que interactúan o forman parte de la matriz extracelular, ya porque sean factores de crecimiento como el TGF β -1, porque formen parte de la matriz extracelular, como es el caso de los proteoglicanos glipicanos -4 y -6, o porque pertenezcan a la familia de las proteínas matricelulares, como las proteínas trombospondinas, hevin y SPARC. Por este motivo, a continuación se describen las principales características de la matriz extracelular en el sistema nervioso.

3 Red perineuronal y plasticidad sináptica

En este apartado se inicia con una breve descripción de la matriz extracelular, para luego detallar las características de la matriz extracelular del sistema nervioso central y como influencia la plasticidad sináptica.

3.1 Estructura y composición de la MEC en el sistema nervioso

La matriz extracelular (MEC) corresponde al componente no celular presente en todos los tejidos y órganos, consistente en un entramado complejo de moléculas que se dispone en el espacio intercelular. Esta matriz tiene 3 funciones: 1) permitir la migración celular y la formación de los tejidos; 2) proveer un anclaje físico y estructural a los componentes celulares y; 3) aportar propiedades mecánicas a los tejidos. Adicionalmente, la MEC interactúa con factores de crecimiento (Frantz et al., 2010; Rozario and DeSimone, 2010; Schaefer and Schaefer, 2010).

La MEC está compuesta principalmente por proteínas fibrosas, en donde las principales proteínas son colágeno, elastina, fibronectina y lamininas, y por proteínas interfibrilares, tales como proteoglicanos y glicoproteínas (Alberts et al., 2008; Järveläinen et al., 2009; Schaefer and Schaefer, 2010). Adicionalmente, en la MEC se encuentran factores de crecimiento, citoquinas y enzimas remodeladoras de MEC que colaboran en la señalización celular (Mott and Werb, 2004; Hynes, 2009).

Brevemente, los proteoglicanos están compuestos por cadenas de glicosaminoglicanos unidos covalentemente a un núcleo proteico, con la excepción del ácido hialurónico (Iozzo and Murdoch, 1996; Schaefer and Schaefer, 2010). Los proteoglicanos se pueden encontrar en el medio extracelular, como en el caso del versicano o agrecano, incorporados en las membranas basales, como en el caso del perlecano o agrina (Bi et al., 2005; Bix and Iozzo, 2008), o asociados a la membrana celular, como por ejemplo el sindecano (Couchman, 2003; Alexopoulou et al., 2007; Choi et al., 2011). Los proteoglicanos se pueden expresar ampliamente en diferentes tejidos, como es el caso de decorina o versicano, o pueden tener una expresión específica en un determinado tejido, como es el caso de brevicano, neurocano, neuroglicano C y fosfacano, que se expresan mayoritariamente en el sistema nervioso central (Haddock et al., 2007; Sugahara and Mikami, 2007; Kwok et al., 2008).

El colágeno es la proteína fibrosa mayoritaria y el elemento estructural principal de la MEC, siendo la proteína más abundante en los mamíferos. El colágeno está formado por tres cadenas polipeptídicas α (Myllyharju and Kivirikko, 2004; Ricard-Blum and Ruggiero, 2005), siendo sus funciones primordiales: 1) limitar la distensibilidad de los tejidos, otorgándoles resistencia a las fuerzas de tensión mecánicas (Kadler et al., 2007) y, 2) participar en la regulación de la adhesión, en la quimiotaxis y en la migración celular (Kadler et al., 2007; Rozario and DeSimone, 2010). La elastina es otro tipo de proteína fibrosa que forma la MEC, la que junto con las miofibrillas forman las fibras elásticas, las cuales frente a una tensión mecánica poseen la capacidad de estirarse y de contraerse hasta la longitud inicial, otorgándole elasticidad a los tejidos en donde se encuentran (Wise and Weiss, 2009; Frantz et al., 2010). Dentro de las proteínas fibrosas también encontramos la fibronectina, una glicoproteína con múltiples dominios, los cuales se unen a diversas moléculas (tales como fibrina, colágeno y heparina) e interaccionan con receptores celulares, principalmente de la familia de las integrinas, participando en la formación y en la organización de la MEC (White et al., 2008; Singh et al., 2010; White and Muro, 2011).

Como se mencionó con anterioridad, en la MEC también se encuentra la proteína laminina, que corresponde a una familia de glicoproteínas formadas por tres cadenas polipeptídicas (alfa, beta y gamma), que es sintetizada y secretada por las células (Colognato and Yurchenco, 2000). En ratón y humano se han caracterizado diferentes moléculas de laminina, las cuales contribuyen a la formación de la lámina basal presentes en los tejidos epiteliales, endoteliales y muscular, entre otros tejidos (Miner and Yurchenco, 2004; Aumailley et al., 2005; Miner, 2008).

En el cerebro adulto se estima que el espacio extracelular corresponde aproximadamente al 20% de su volumen (Nicholson and Sykova, 1998), no obstante, la existencia de una matriz extracelular en el sistema nervioso central no fue aceptada hasta en las últimas décadas del siglo XX. Las primeras evidencias de la existencia de una MEC en el SNC se obtuvieron con el trabajo realizado por Camillo Golgi entre 1882 y 1898, quien describió una estructura reticular que rodeaba el soma neuronal, la cual se extendía por las dendritas en distintos tipos neuronales y que correspondería a un tipo de sostén de neuroqueratina (Celio et al., 1998). La investigación de esta red fue considerada de bajo interés, tras la publicación de los trabajos de Ramón y Cajal en los años 1897 y 1898, en los cuales él argumentaba que la estructura descrita por Golgi correspondía a un artefacto de la tinción empleada, asociando así el estudio de esta estructura a los seguidores

de la teoría reticular del sistema nervioso (Celio et al., 1998). No fue hasta la década de 1970 que se reconoció la existencia de una MEC en el SNC, cuando mediante el uso del rojo de rutenio, un reactivo catiónico empleado para la visualización de polisacáridos en el espacio extracelular (Fassel and Edmiston, 1999; Waller et al., 2004), se caracterizó una tinción positiva para este reactivo, en el espacio extracelular del cerebro de ratas (Tani and Ametani, 1971). Tras esta caracterización inicial, en el SNC se identificaron moléculas que componen la MEC, tales como ácido hialurónico, condroitina sulfato, fibronectina y colágeno (Margolis et al., 1975; Carbonetto, 1984; Rutka et al., 1988; Sanes, 1989).

Una vez asumida la existencia de una matriz extracelular en el SNC, la visualización de esta matriz se realizó mediante el uso de técnicas histoquímicas, con las cuales se perseguía la identificación de las moléculas de la matriz, que poseen una carga negativa. Para la visualización de estas moléculas, se utilizaron extractos de las plantas *Vicia villosa* y *Wisteria floribunda*, ricos en aglutinina, un lectinano que posee afinidad por las N-acetilgalactosaminas (Nakagawa et al., 1986; Brückner et al., 1993; Schweizer et al., 1993). Esta matriz extracelular también fue visualizada mediante tinción con hidróxido de oro coloidal, para la detección de componentes polianiónicos (Seeger et al., 1994) y mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra proteoglicanos condroitina sulfato (Watanabe et al., 1989; Bertolotto et al., 1990; Guimarães et al., 1990; Asher et al., 1995).

La caracterización de la matriz extracelular del cerebro continuó con el trabajo efectuado por Deepa y colaboradores (Deepa et al., 2006), quienes realizaron un estudio sistemático de la composición de la MEC por extracción de las moléculas mediante el empleo de tampones de distintas composición, describiendo que los proteoglicanos que componen la MEC del cerebro y médula espinal de ratas adultas, se encuentran como componentes solubles en la matriz extracelular, y también como moléculas asociadas a la membrana celular. Las moléculas asociadas a la membrana celular correspondieron a proteoglicanos del tipo condroitina sulfato, que incluyen brevicano, neurocano, versicano V2 y agrecano.

Los resultados de estos trabajos llevaron a deducir que la matriz extracelular descrita en el SNC se encuentra recubriendo principalmente el soma neuronal y las dendritas proximales, en donde establecen una estructura en forma de malla confinada al espacio existente entre las neuronas y las células gliales, y que esta estructura posee espacios abiertos en los lugares donde se encuentran los contactos sinápticos. Por estas características, a esta MEC del SNC se le

denominó **red perineuronal**, considerándola una matriz extracelular especializada (Brückner et al., 1993; Seeger et al., 1994; Asher et al., 1995; Deepa et al., 2006; Kwok et al., 2011).

La red perineuronal está formada por moléculas de la MEC descritas anteriormente, siguiendo una estructura similar a la encontrada en los cartílagos (Morawski et al., 2012). Sus principales componentes son el ácido hialurónico, proteoglicanos del tipo condroitina sulfato, indicados en la tabla 2 (Matsui et al., 1998; Deepa et al., 2006; Kwok et al., 2011; Kwok et al., 2012), tenascina-R (Köppe et al., 1997; Carulli et al., 2006; Carulli et al., 2007) y las proteínas de unión entre el ácido hialurónico y los proteoglicanos (HAPLNs por el acrónimo en inglés *hyaluronan and proteoglycan link proteins*, (Hirakawa et al., 2000; Bekku et al., 2003; Galtrey et al., 2008; Carulli et al., 2010; Kwok et al., 2010)). Las moléculas de la red perineuronal forman agregados estables en la superficie del soma y de las dendritas proximales, en donde los proteoglicanos condroitina sulfatos interaccionan con las cadenas de ácido hialurónico en la superficie celular, interacción que es estabilizada por las proteínas de unión HAPLNs. Finalmente, los proteoglicanos condroitina sulfato interaccionan con trímeros de tenascina-R, formando la estructura de la red perineuronal, en donde el ácido hialurónico es el eje troncal de la red formada, como se puede apreciar en la figura 5 (Kwok et al., 2010; Kwok et al., 2011; Wang and Fawcett, 2012).

Nombre	Tipo	Especificidad del SNC
Agrecano	Condroitina sulfato	No
Versicano V0	Condroitina sulfato	No
Versicano V1	Condroitina sulfato	No
Versicano V2	Condroitina sulfato	Si
Neurocano	Condroitina sulfato	Si
Brevicano	Condroitina sulfato	Si
Fosfacano	Condroitina sulfato/ Queratán sulfato	Si

Tabla 2. Proteoglicanos de la matriz extracelular del SNC. Listado de los proteoglicanos descritos en el sistema nervioso central, en el cual para cada molécula se indica el tipo de proteoglicano y la especificidad de éste en el sistema nervioso central. Modificado de Zimmermann y Dours-Zimmermann, 2008 (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008).

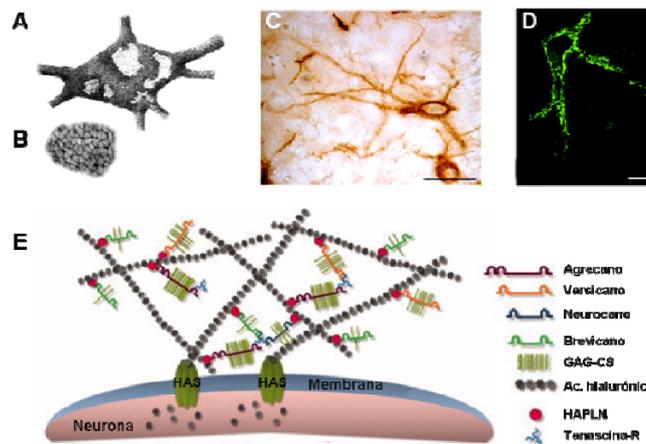


Figura 5. Matriz extracelular en el sistema nervioso central. **A)** Dibujo de la red perineuronal de Camillo Golgi, adaptado de (Celio et al., 1998). **B)** Detalle ampliado de A. **C)** Imagen de la red perineuronal observada en el soma y en las dendritas proximales de neuronas de cerebros de rata, visualizada mediante tinción con *Wisteria floribunda agglutinin*, barra de calibración: 50 µm; adaptado de (Kwok et al., 2011). **D)** red perineuronal visualizada mediante el uso anticuerpo monoclonal contra la proteína de unión CRTLI/HAPLN1, barra de calibración: 20 µm; adaptado de (Brückner et al., 2008). **E)** Modelo hipotético de la matriz extracelular del cerebro. Las enzimas ácido hialurónico sintetasa (HAS) presentes en la superficie neuronal, sintetizan el ácido hialurónico y lo secretan en el área de la red perineuronal. Moléculas de la familia de las lectinas de los proteoglicanos condroitina sulfato, que incluyen agrecano, neurocano, versicano y brevicano, se unen al esqueleto de ácido hialurónico formado. Esta unión se consolida por la presencia de las proteínas de unión ó HAPLN. Las lectinas poseen un dominio de unión a ácido hialurónico en la región N-terminal el centro de la molécula poseen una región que une glucosaminoglicanos (GAG) como los del tipo condroitina sulfato (GAG-CS). La región C-terminal de las lectinas, se unen a trímeros de tenascina-R, formando un agregado supramolecular en la superficie de las neuronas. Adaptado de Kwok y colaboradores, 2011 (Kwok et al., 2011).

Los componentes de la red perineuronal pueden ser producidos conjuntamente por las neuronas y las células gliales, como es el caso del brevicano y el ácido hialurónico (John et al., 2006; Giamanco and Matthews, 2012); pueden ser producidos específicamente por las células gliales, que sintetizan versicano, tenascina-R y las proteínas de unión HAPLN-1 (Carulli et al., 2006; Carulli et al., 2007; Giamanco and Matthews, 2012); o ser producidos específicamente por las neuronas, como es el caso del agrecano (Giamanco and Matthews, 2012).

La red perineuronal se localiza en distintas áreas del SNC, observándose principalmente en las interneuronas gabaérgicas de la corteza cerebral (Nakagawa et al., 1987; Naegele et al., 1988; Mulligan et al., 1989; Brückner et al., 1994), muchas de las cuales expresan la proteína queladora de calcio parvalbúmina (Kosaka and Heizmann, 1989; Härtig et al., 1992; Morino-Wannier et al., 1992). También se encuentra en las neuronas piramidales de la corteza cerebral, en neuronas de la sustancia gris intrínseca del tronco encefálico, en neuronas de la sustancia negra, del hipocampo y de la médula espinal (Brauer et al., 1993; Takahashi-Iwanaga et al., 1998; Morris and Henderson, 2000; Härtig et al., 2001; Matthews et al., 2002; Pizzorusso et al., 2002;

Wegner et al., 2003; Alpár et al., 2006; Carulli et al., 2006; Deepa et al., 2006; McRae et al., 2007; Brückner et al., 2008; Galtrey et al., 2008).

En modelos animales murinos, la composición de la red perineuronal varía a lo largo del desarrollo del sistema nervioso, la cual podemos dividir en dos etapas. En la primera, que comprende el período de las últimas etapas del desarrollo embrionario y los primeros días postnatales, se pueden detectar diversos componentes de la MEC, tales como el ácido hialurónico, tenascina-C y los proteoglicanos versicano V0 y V1. En este período no se observa la estructura característica de la red perineuronal (Delpech et al., 1989; Steindler et al., 1989; Watanabe et al., 1989; Bignami et al., 1993; Oohira et al., 1994; Maeda et al., 1995; Meyer-Puttlitz et al., 1995; Meyer-Puttlitz et al., 1996; Milev et al., 1998; Rauch, 2004; Deepa et al., 2006; Carulli et al., 2007). La segunda etapa comienza aproximadamente en la segunda semana de vida, durante la cual ocurren esencialmente dos procesos: 1) los componentes tempranos de la red perineuronal son reemplazados por moléculas homólogas, es así como la tenascina-C es reemplazada por la tenascina-R y los proteoglicanos versicano V0 y V1 por el versicano V2 (Pesheva et al., 1989; Meyer-Puttlitz et al., 1995; Milev et al., 1998; Hirakawa et al., 2000; Bekku et al., 2003), y 2) comienza la formación de la red perineuronal propiamente dicha, pudiéndose encontrar algunos de sus componentes asociados a la membrana celular (Deepa et al., 2006; Carulli et al., 2007). Una vez formada la red perineuronal, ésta exhibe una composición diferenciada en distintas áreas del SNC, en donde el agregano se halla presente en casi todas las redes perineuronales estudiadas, existiendo diferencias en la composición de los otros proteoglicanos (Deepa et al., 2006; Galtrey et al., 2008).

La estructura de la red perineuronal también se puede observar en los cultivos primarios de neuronas de distintas zonas del cerebro, siendo las neuronas gabaérgicas las que presentan una acumulación temprana del material que forma la MEC (Dityatev et al., 2007). En otros tipos neuronales, la red perineuronal se puede apreciar tras 3 semanas de cultivo (Miyata et al., 2005; John et al., 2006; Dityatev et al., 2007; Giamanco and Matthews, 2012). Las neuronas en cultivo también presentan una composición de la red perineuronal diferenciada, existiendo una subpoblación de neuronas que presentan el proteoglicano agregano, y otra subpoblación que presenta el proteoglicano brevicano (Giamanco and Matthews, 2012).

3.2 Efectos de la red perineuronal sobre la plasticidad sináptica

Una vez descrita la red perineuronal, nos referiremos a continuación a las funciones descritas para los componentes de la red perineuronal en el sistema nervioso y en particular en su efecto sobre la plasticidad sináptica, por lo que comenzaremos con una breve reseña de qué es la plasticidad neuronal.

La plasticidad neuronal se refiere al mecanismo que habilita a la neurona a modificar su respuesta frente a un estímulo y/o a modificar las conexiones con otras neuronas, para así procesar y transmitir correctamente la información en función de las variaciones del entorno. Los cambios en la organización y en el número de sinapsis se pueden inducir durante el proceso de maduración y aprendizaje, pero también se puede observar en respuesta a lesiones, estrés o frente a un ambiente enriquecido (*environmental enrichment*), en el caso de los animales de experimentación (Lamprecht and LeDoux, 2004; Citri and Malenka, 2008). Las formas descritas de plasticidad, involucran la plasticidad a corto plazo, que va desde los milisegundos a varios minutos, principalmente asociada a cambios a nivel presináptico (Zucker and Regehr, 2002b); y la plasticidad a largo plazo, que va desde horas a meses, la cual involucra cambios a nivel presináptico y postsináptico (Citri and Malenka, 2008).

Los tipos de plasticidad a corto plazo más caracterizados son la facilitación, potenciación post-tetánica y la depresión. La facilitación y la depresión se pueden medir mediante la aplicación de pares de pulsos dentro de un intervalo de tiempo corto (segundos). Si la respuesta del segundo estímulo es de una amplitud mayor respecto a la respuesta del primer estímulo, corresponde a facilitación; una respuesta menor significa depresión (Katz and Miledi, 1968; Zucker and Regehr, 2002b).

La depresión por pulsos pareados se observa comúnmente en las sinapsis cuando el intervalo de tiempo entre los estímulos es de muy corta duración, por lo general menor a 20-50 milisegundos. Los eventos presinápticos asociados al desarrollo de la depresión por pulsos pareados son la inactivación de los canales de calcio o de sodio dependientes del voltaje, el vaciamiento transitorio de los depósitos de vesículas de liberación rápida que se encuentran ancladas al terminal presináptico y el incremento en la probabilidad de liberación (Katz and Miledi, 1968; Zucker and Regehr, 2002b; Fioravante and Regehr, 2011). Además, la depresión por pulsos pareados se puede desarrollar debido a eventos postsinápticos, tales como la

desensibilización o la saturación de los receptores postsinápticos después de una unión repetida del neurotransmisor, donde la desensibilización corresponde al período de tiempo en el cual el receptor postsináptico no responde frente a la unión del neurotransmisor; y la saturación del receptor corresponde a la disminución del número de receptores disponibles para la unión del neurotransmisor tras estimulaciones repetitivas (Chen et al., 2002; Sun et al., 2002)

La facilitación por pulsos pareados se suele observar cuando el intervalo de tiempo entre los estímulos es más largo (segundos). La facilitación disminuye cuando se incrementa el intervalo de tiempo entre estímulos. El origen de este tipo de plasticidad se basa en la existencia de un calcio residual tras el primer estímulo, el cual contribuiría a una liberación adicional tras la aplicación del segundo estímulo. Este hecho es muy común en sinapsis del SNC con una baja probabilidad de liberación (típicamente $\leq 0,4$) (Zucker and Regehr, 2002b; Citri and Malenka, 2008).

La potenciación post-tetánica representa el incremento de la amplitud de la respuesta debido a un incremento en la liberación del neurotransmisor. Este tipo de plasticidad persiste por varios minutos y se origina después de la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia (10-200 Hz) por aproximadamente 200 ms y 5 s (Zucker and Regehr, 2002b; Citri and Malenka, 2008).

Las dos formas de plasticidad sináptica a largo término más estudiadas son la potenciación a largo plazo o LTP, por su acrónimo del inglés *Long-Term Potentiation*, y la depresión a largo plazo o LTD, por su acrónimo del inglés *Long-Term Depression*, los cuales se han asociado los procesos de memoria y aprendizaje (Citri and Malenka, 2008). Los cambios en la plasticidad a largo plazo derivan de modificaciones estructurales que requieren síntesis local de proteínas, activación de proteasas, polimerización de actina, crecimiento de espinas dendríticas y síntesis e inserción de moléculas de adhesión para estabilizar los contactos sinápticos (Abraham and Williams, 2008; Citri and Malenka, 2008). La inducción de ambos tipos de plasticidad requieren la despolarización de las neuronas y la activación de los receptores NMDA y/o de los canales de calcio dependientes de voltaje, procesos que favorecen la entrada de calcio a las células (Abraham and Williams, 2008; Citri and Malenka, 2008).

Como se ha descrito previamente, existe una coincidencia temporal entre la maduración del sistema nervioso central y la aparición de la red perineuronal, atribuyéndosele un rol en la

plasticidad sináptica. Como se ha mencionado con anterioridad, las células gliales secretan componentes de la matriz extracelular que afectan la formación de nuevas sinapsis, como lo son los glicopiranos-4 y -6 y las proteínas matricelulares trombospondina, hevin y SPARC, que se detallan más adelante.

Uno de los mecanismos que explicarían la implicación de la red perineuronal en la plasticidad sináptica, estaría dado por la función que esta red desempeña en la difusión lateral de los receptores postsinápticos, entre el sitio de la sinapsis y los dominios extrasinápticos. La difusión lateral ha sido descrita como un mecanismo involucrado en el mantenimiento del número de receptores sinápticos mediante el intercambio de receptores de superficie y los receptores intracelulares, a través de exocitosis y endocitosis (Newpher and Ehlers, 2008; Petrini et al., 2009). La difusión lateral también ha sido relacionada con un mecanismo de plasticidad a corto plazo en neuronas hipocampales, tanto en rodajas de hipocampo como en cultivos primarios. El estudio realizado por Heine y colaboradores (Heine et al., 2008), mostró que tras una estimulación a alta frecuencia las neuronas empleaban la difusión lateral para intercambiar receptores AMPA desensibilizados, por receptores extrasinápticos sin uso. El bloqueo de la difusión lateral incrementó la depresión observada al aplicar pulsos pareados, causado por una acumulación de receptores desensibilizados en la sinapsis, demostrando que la difusión lateral es un mecanismo que se encuentra involucrado en la plasticidad a corto plazo. Una observación interesante a considerar es que la maduración sináptica de las neuronas hipocampales en cultivo está asociada a una disminución en el coeficiente de difusión de los receptores AMPA (Borgdorff and Choquet, 2002), lo que coincide con el desarrollo y la aparición de una red perineuronal que se asemeja a la observada en el SNC adulto (John et al., 2006).

En otro estudio realizado por el mismo grupo, los investigadores demostraron que la red perineuronal restringe la difusión lateral de los receptores AMPA extrasinápticos (Frischknecht et al., 2009). En este trabajo, se estudió la difusión de los receptores en neuronas inmaduras, que no presentan red perineuronal, y en neuronas maduras con una red perineuronal formada, observándose que la difusión de los receptores disminuye cuando la red perineuronal está presente. La eliminación de la MEC mediante digestión del ácido hialurónico con enzimas hialuronasas, incrementa el coeficiente de difusión de los receptores extrasinápticos y el intercambio entre los receptores sinápticos y extrasinápticos, asemejándose a lo observado antes del establecimiento de la MEC en las neuronas en cultivo. Conforme a este hecho, la eliminación de la MEC induce una disminución en la depresión a corto plazo al aplicar pulsos pareados de

glutamato (Frischknecht et al., 2009), efecto que podría deberse al mayor intercambio entre los receptores sinápticos y extrasinápticos. Todas estas evidencias sugieren que el ácido hialurónico, y por tanto la red perineuronal, forma una barrera en torno a la sinapsis, la cual disminuye la difusión de moléculas sinápticas entre la sinapsis y las áreas extrasinápticas, participando en la diferenciación de una sinapsis inmadura a una madura.

Adicionalmente, la red perineuronal estaría ejerciendo otras acciones a nivel postsináptico, mediante un mecanismo paralelo al anteriormente propuesto: el ácido hialurónico interaccionaría directamente con los canales de calcio dependientes de voltaje (Kochlamazashvili et al., 2010). Kochlamazashvili y colaboradores observaron que las rodajas de hipocampo de ratones adultos tratados con hialuronasas, presentaban una reducción de la LTP. Esta reducción en la LTP no estaría mediada por la acción de interneuronas, las cuales poseen una red perineuronal prominente, ya que el tratamiento de las rodajas con picrotoxina, un antagonista de los receptores GABA_A, no altera la reducción de la LTP observada tras la digestión del ácido hialurónico. En este estudio, los investigadores proponen que el ácido hialurónico interacciona con la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo L, presentes en las dendritas postsinápticas, por lo que la eliminación del ácido hialurónico reduciría los transientes de calcio en las dendritas, favoreciendo una disminución en la LTP (Kochlamazashvili et al., 2010). En la siguiente tabla se resumen los distintos ratones KO para los componentes de la red perineuronal y los fenotipos que presentan.

Gen	Viabilidad	Fenotipo del SNC
Agrecano (variedad Acan/cmd)	Muerte al nacer	ND
Brevicano (Bcan)	Normal	LTP reducido
Fosfacano/ RPTP- β (Ptrz I)	Normal	LTP incrementada
Neurocano (Ncan)	Normal	LTP reducido
Versicano (variedad Vcan/hdf)	Muerte a E 10,5	-
Versicano V2	Normal	Red perineuronal anormal, LTP ND
Tenascina-R (Tnr)	Normal	LTP reducido, Red perineuronal anormal, reducción en la velocidad de conducción en el SNC, anormalidades leves de comportamiento.
Tenascina-C (Tnc)	Normal	LTP reducido, LTD suprimido, anormalidad estructural del hipocampo, anormalidades leves de comportamientos.
HAPLN1/Crtl1 (Hapln1)	Muerte al nacer	ND

Tabla 3 Ratones KO generados para distintas moléculas de la matriz extracelular. Ratones KO para distintas moléculas de la MEC, indicándose el nombre de la molécula y el gen correspondiente, la viabilidad del animal y fenotipo que muestran los animales. Agrecano (Watanabe et al., 1994), brevicano (Brakebusch et al., 2002), fosfacano/RPTP- β (Harroch et al., 2000; Harroch et al., 2002; Niisato et al., 2005), neurocano (Zhou et al., 2001), versicano (Mjaatvedt et al., 1998), versicano V2 (Dours-Zimmermann et al., 2009), tenascina-R (Weber et al., 1999; Brückner et al., 2000; Haunso et al., 2000; Bukalo et al., 2001; Freitag et al., 2003; Montag-Sallaz and Montag, 2003), tenascina-C (Saga et al., 1992; Forsberg et al., 1996; Fukamauchi et al., 1996; Kiernan et al., 1999; Evers et al., 2002; Gurevicius et al., 2009), HAPLN1/Crtl1 (Watanabe and Yamada, 1999). ND: no determinado. Adaptado de Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008 (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008).

Como podemos apreciar, la relación entre los componentes de la matriz extracelular del sistema nervioso con la plasticidad sináptica, *han sido estudiados esencialmente a nivel postsináptico*, por lo que hay un gran desconocimiento sobre el efecto que poseen los componentes de la red perineuronal sobre el terminal presináptico.

Como se señaló con anterioridad, en la MEC se pueden encontrar diversas moléculas que no participan en la formación de la matriz, tales como factores de crecimiento y citoquinas, que potencialmente pueden afectar la plasticidad sináptica. Uno de los componentes que ha cobrado más relevancia en los últimos años, son las proteínas matricelulares, cuyas características se describen a continuación.

4 Proteínas matricelulares

El término matricelulares se ha aplicado a moléculas de la matriz extracelular que no contribuyen directamente a la formación de elementos estructurales de la matriz, pero que sirven para modular las funciones celulares y la interacción entre la célula y la matriz extracelular (Bornstein, 1995, 2001; Bornstein and Sage, 2002; Kyriakides and Bornstein, 2003). Inicialmente este grupo estaba compuesto por las proteínas trombospondina 1 (TSP-1), SPARC, también conocida como osteonectina; y la proteína tenascina-C (Sage and Bornstein, 1991), grupo que ha sido ampliado a medida que se comprendía mejor la interacción célula-MEC, incluyéndose las TSP-2 y -4, osteopontina (OPN), periostina, tenascina-X y los miembros de la familia de proteínas CNN (del acrónimo en inglés *cyr-61, CTGF [connective tissue growth factor], Nov*) (Bornstein and Sage, 2002; Frangogiannis, 2012).

Las propiedades que justifican que una proteína de la matriz sea clasificada como matricelular son (Bornstein and Sage, 2002; Frangogiannis, 2012):

- Se expresa en un alto nivel durante el desarrollo y como respuesta a una lesión, poseyendo un bajo nivel de expresión en los tejidos adultos.
- No posee funciones estructurales, sino que funciona como moduladora de las interacciones células –MEC.

- Se une a varios receptores de la superficie celular, de la MEC, a factores de crecimiento, citoquinas y proteasas.
- Generalmente induce desadhesión, en contra de la adhesión que generan la mayoría de las proteínas de la matriz.
- En la mayoría de los casos, la disrupción de genes dirigida de la proteína en ratones, genera un fenotipo macroscópicamente normal o un fenotipo sutil que se agrava después de una lesión.

Una de las características de las proteínas matricelulares es que son capaces de interferir en la adhesión celular, sustentado sólo los estados iniciales e intermedios de la adhesión celular (Murphy-Ullrich, 2001). En las células que se adhieren a la MEC, la adhesión celular al substrato ocurre en tres etapas (figura 6): a) adhesión celular, en donde los receptores de superficie celular, como por ejemplo las integrinas, interaccionan con sus substratos de la MEC; b) extensión celular, en donde la célula incrementa la superficie de contacto con el substrato de la MEC, mediante la expansión celular. Por último, y dependiendo de las interacciones con la MEC, la célula procede a organizar su citoesqueleto, dando paso a la última etapa, c) formación de contactos focales, también conocidos como placas de adhesión, y de fibras de estrés de actina (Schoenwaelder and Burridge, 1999).

La desadhesión se refiere al proceso reverso del anteriormente descrito, en donde la célula pasa de un estado de adhesión fuerte hacia un estado de adhesión débil (Greenwood and Murphy-Ullrich, 1998). Este proceso puede involucrar la transición de una adhesión fuerte en donde se observan placas de adhesión y fibras de estrés de actina, hacia un estado intermedio de adherencia, caracterizado por una reestructuración de los contactos focales y las fibras de estrés, manteniéndose la expansión y la forma celular. Éste es el tipo de desadhesión mediada por las proteínas matricelulares TSP1, tenascina-C y SPARC, que interrumpen los contactos focales y estimulan la reorganización de las fibras de estrés de la actina (Sage and Bornstein, 1991; Murphy-Ullrich, 2001).

La adhesión fuerte, mediada por una alta expresión de integrinas, se asocia a un bajo grado de migración (Palecek et al., 1997), mientras que la adhesión intermedia, en donde no se forman los contactos focales ni las fibras de estrés (Zhang et al., 2008), se ha asociado a un alto grado de migración celular (Palecek et al., 1997; Gupton and Waterman-Storer, 2006).

Adicionalmente, la unión entre las integrinas y sus sustratos de la MEC; como por ejemplo $\alpha 5\beta 1$ con fibronectina ó $\alpha 2\beta 1$ con colágeno, favorecen la proliferación celular, mientras que la unión ineficiente entre la integrina y sus ligandos resulta en una inhibición en la proliferación (Danen and Yamada, 2001). Por otra parte, se ha demostrado que las células que se unen a la MEC, sufren apoptosis cuando las integrinas no se pueden unir a sus ligandos (Stupack et al., 2001). Todas estas evidencias han llevado a atribuir a las proteínas matricelulares, y por consiguiente al estado de adherencia intermedia, funciones en la proliferación, supervivencia y muerte celular (Bornstein and Sage, 2002).

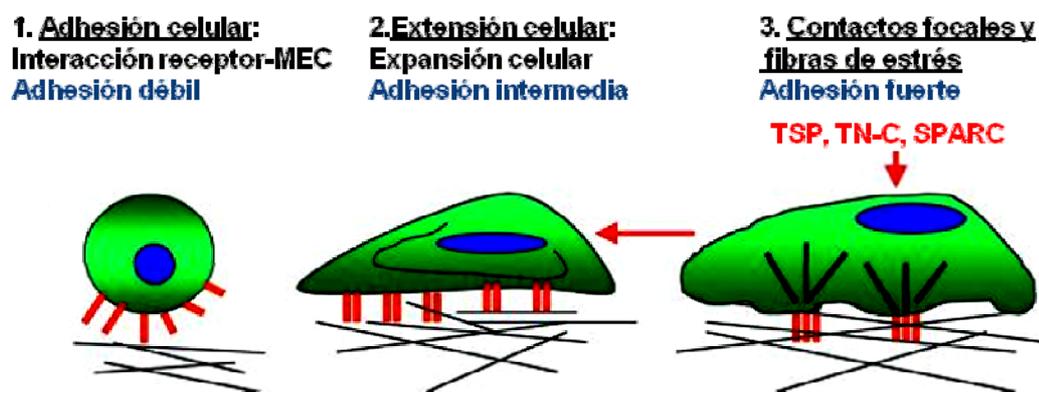


Figura 6 Modelo de las etapas de la adhesión celular e inducción al estado de adhesión intermedio por las proteínas matricelulares. Durante el proceso de adhesión, las células se adhieren al sustrato o soporte (1), se extiende (2) y forman los contactos focales y las fibras de estrés de actina (3). En cada una de las etapas, la fuerza de adhesión de la célula se va incrementando. La desadhesión se define como la transición desde un estado de adhesión fuerte hacia una adherencia intermedia (etapa 2), caracterizado por las rupturas de las fibras de estrés. Adaptado de Murphy-Ullrich, 2001 (Murphy-Ullrich, 2001).

A razón de estas características, las proteínas matricelulares han sido ampliamente estudiadas en el cáncer, por lo que se conocen mejor los efectos y mecanismos de acción de estas proteínas en esta área respecto a las acciones que poseen en el sistema nervioso. Como ejemplo de las acciones de las proteínas matricelulares con relevancia en el estudio del cáncer y de la metástasis, existen estudios que sugieren que la TSP-1 intervendría en la desintegración de los contactos focales (Goicoechea et al., 2000); que SPARC mediaría la desintegración de las adhesiones focales en células endoteliales en cultivo (Murphy-Ullrich et al., 1995) y que en células tumorales la tenascina-C interacciona con la fibronectina, previniendo la unión de esta última a su receptor de membrana, interrumpiendo la unión célula-fibronectina, aumentando la desadhesión celular e incrementando la proliferación de las células tumorales (Huang et al.,

2001). A continuación se realiza una revisión de los efectos que ejercen las proteínas matricelulares en el sistema nervioso.

4.1 Función de las proteínas matricelulares en el sistema nervioso

La familia de proteínas matricelulares más estudiada en el sistema nervioso son las trombospondinas (TSPs), que constituyen una familia de glicoproteínas que unen calcio extracelular, de los cuales se han identificado cinco miembros codificados en el genoma humano y cuatro miembros identificados en otras especies, tales como ratón o pollo (Adams, 2004). Las TSPs se clasifican en dos subgrupos (ver figura 7): el subgrupo A, compuesto por las TSP-1 y -2, los cuales son trímeros de subunidades de aproximadamente 146 KDa; y el subgrupo B, compuesto por las TSP-3, -4 y -5, correspondientes a pentámeros de subunidades de aproximadamente 105 KDa (Bornstein et al., 2004). Las TSP promueven la adhesión celular, regulan la dinámica de citoesqueleto y la migración celular (Bornstein et al., 2004), así como la sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005).

En preparaciones no neuronales, se ha determinado que TSP-1 interacciona con diversas moléculas, como por ejemplo con fibronectina, laminina, fibrinógeno (Lahav et al., 1982; Mumby et al., 1984), y con colágeno del tipo I, III, IV y V (Galvin et al., 1987). La TSP-1 también se une a integrinas de tipo $\beta 1$ (Krutzsch et al., 1999; Rodriguez-Manzaneque et al., 2001; Calzada et al., 2003; Calzada et al., 2004a; Short et al., 2005; Staniszewska et al., 2007; Carlson et al., 2008), lo que promueve la supervivencia y proliferación de las células endoteliales (Calzada et al., 2004b).

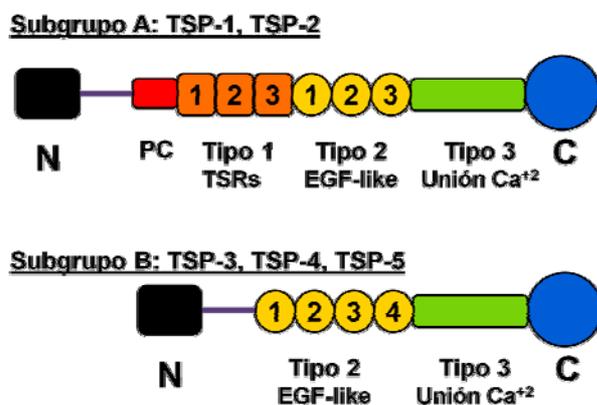


Figura 7 Estructura modular de los miembros de la familia de trombospondinas. Las trombospondinas del subgrupo A están compuestas por los siguientes dominios, desde el extremo amino terminal (negro) al carboxilo terminal (azul): dominio de oligomerización (violeta); dominio homólogo al procolágeno (PC, rojo) el cual posee el factor de von Willebrand de tipo C (vWF-C); módulo “tipo 1” compuesto por tres repeticiones del motivo de tipo properdina o TSRs (naranja); módulo “tipo 2” con tres o cuatro dominios EGF-like o de homología al factor de crecimiento epidérmico (amarillo); módulo “tipo 3” que corresponde a repeticiones de sitios de unión a calcio (verde); dominio globular C-terminal del tipo lectina (azul). Las trombospondinas del subgrupo B no poseen el dominio PC ni el dominio tipo 1. Adaptada de Carlson y colaboradores, 2008 (Carlson et al., 2008).

Además de la unión con fibronectina, las TSPs interaccionan con los proteoglicanos, como por ejemplo heparina (Lawler et al., 1978; Lawler et al., 1992; Krutzsch et al., 1999; Calzada et al., 2003; Tan et al., 2006; Tan et al., 2008), condroitina sulfato, sindecano-1, -3 y -4, con perlecano, glipicano-2 (cerebroglucano) y versicano (Herndon et al., 1999; Ferrari do Outeiro-Bernstein et al., 2002; Elzie and Murphy-Ullrich, 2004; Kuznetsova et al., 2006).

Como se ha explicado previamente, en el SNC las trombospondinas del subgrupo A poseen un efecto sinaptogénico. Al ampliar el estudio del efecto de las trombospondinas sobre la sinaptogénesis a las trombospondinas del subgrupo B, Eroglu y colaboradores demostraron que las TSP-3, -4 y -5 tienen un efecto sinaptogénico sobre las neuronas ganglionares de la retina en cultivo comparable al inducido por TSP-1 o por los astrocitos (Eroglu et al., 2009), lo que apunta a que el dominio de TSP responsable de la actividad sinaptogénica se encuentra en la región carboxilo terminal conservada. Debido a que TSP interacciona con diversos receptores, los autores de este trabajo, y mediante el empleo de constructos de TSP-1 y -2 y el uso de anticuerpos monoclonales, determinaron que los fragmentos de TSP que contenían la repetición EGF-like simulaban la habilidad de las TSP para inducir la sinapsis. Además caracterizaron que el empleo de una fracción de la molécula que comprendía la tercera repetición EGF-like y el extremo C-terminal de TSP-2 también incrementaba el número de sinapsis, pero que la tercera repetición EGF-like por sí sola no incrementaba el número de sinapsis. Estudios previos demostraron que la porción EGF-like de TSP-4 interacciona con la integrina $\alpha_M\beta_2$, concretamente con el dominio α_{MI} (Pluskota et al., 2005), el cual es homólogo a un dominio de 200 aminoácidos presentes en el factor vWF-A (Larson et al., 1989). Estos resultados llevaron a Eroglu y colaboradores a buscar moléculas presentes en la superficie neuronal que tuviesen este dominio; con la finalidad de encontrar un ligando potencial que interaccionara con las TSP, descubriendo una interacción entre las TSP-1, -2 y -4 con la subunidad $\alpha_{2\delta-1}$ del canal de calcio dependientes de voltaje, concretamente la región extracelular de la subunidad α_2 , que es la que contiene el dominio vWF-A.

La función de la subunidad $\alpha_{2\delta-1}$ en la sinaptogénesis fue demostrada mediante la sobreexpresión de la subunidad tanto *in vitro* como *in vivo*, obteniéndose en ambos casos un incremento en el número de sinapsis. Sin embargo, la sobreexpresión de esta unidad por sí sola no indujo la formación de sinapsis, siendo necesario el tratamiento concomitante con el dominio EGF-like para obtener el efecto. Este resultado sugiere que la interacción entre la subunidad $\alpha_{2\delta-1}$ del canal de calcio y el dominio EGF-like son necesarios para observar este efecto.

Adicionalmente, este estudio demostró que el efecto sinaptogénico de la subunidad $\alpha 2$ no involucra cambios globales en los niveles de expresión del canal, ni en la función del canal de calcio.

Debido a que la subunidad $\alpha 2\delta-1$ es un receptor de alta afinidad para gabapentina y pregabilina, medicamentos antiepilépticos que, *in vivo*, han demostrado ejercen su acción mediante la unión con esta subunidad auxiliar (Gee et al., 1996; Field et al., 2006). Eroglu y colaboradores trataron los cultivos neuronales con gabapentina, resultando en el bloqueo de la unión entre TSP-2 y la subunidad $\alpha 2\delta-1$, y en la pérdida del efecto sinaptogénico descritos para las TSP y los astrocitos *in vitro*. Adicionalmente, el tratamiento farmacológico de ratones con gabapentina en la primera semana de vida, momento que coincide con la formación de sinapsis y la máxima expresión de TSP-1 y -2 en el cerebro, demostró que este medicamento también bloquea la formación de sinapsis *in vivo*. El mecanismo por el cual la interacción entre la subunidad $\alpha 2\delta-1$ y las TSPs inducen la formación de sinapsis está aún por ser determinado.

La capacidad de las TSPs para ejercer funciones sinaptogénicas quedo reflejado en otro estudio realizado en neuronas hipocampales en cultivo, el cual mostró que el tratamiento con TSP-1 durante el cultivo incrementaba el número de sinapsis en las neuronas con 5-8 DIV, pero que en las neuronas con 14-17 DIV no presentaban diferencias en el número de sinapsis respecto al grupo neuronal no tratado. Este resultado sugiere que la TSP-1, en este tipo neuronal, acelera la sinaptogénesis sin afectar el número final de sinapsis presentes en las neuronas maduras (Xu et al., 2010). En este trabajo, los investigadores determinaron que la TSP-1 interactuaba con las neuroliginas 1-3, que son proteínas de adhesión celular postsinápticas (Lisé y El-Husseini 2006), proponiendo que el efecto sinaptogénico estaría mediado por la interacción de TSP-1 con neurexina-1 (Xu et al., 2010). Este resultado difiere a lo descrito por Eroglu y colaboradores, discrepancia que, de acuerdo a los autores, puede deberse al empleo de tipos neuronales distintos, en donde cada población neuronal estaría utilizando un mecanismo de respuesta a TSP-1 diferente.

Otra proteína que pertenece a las proteínas matricelulares es la tenascina-C (TN-C), que pertenece a la familia de las glicoproteínas tenascinas (TN), la cual además está compuesta por las tenascinas -X, -R y -W (Tucker 2006), siendo la tenascina-C el primer miembro de la familia. La TN-C tiene una expresión ubicua en el organismo, mientras que TN-X se expresa primordialmente en tejidos conectivos laxos, tales como dermis y vasos sanguíneos, TN-W se

expresa principalmente en los huesos y TN-R primordialmente en el sistema nervioso, tanto central como periférico (Bristow et al., 1993; Scherberich et al., 2004; Kimura et al., 2007; Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2009).

Si bien en el sistema nervioso se expresan tanto TN-C como TN-R, se ha descrito que TN-R forma parte de la estructura de la red perineuronal (Weber et al., 1999; Carulli et al., 2006; Wang and Fawcett, 2012), por lo que TN-R no se puede clasificar a como proteína matricelular, por que no cumple con el criterio de que las proteínas matricelulares no deben poseer funciones estructurales (Bornstein and Sage, 2002). Por estos motivos nos centraremos en la función de TN-C en el sistema nervioso.

La tenascina-C es una glicoproteína oligomérica compuesta por polipéptidos individuales con un peso molecular entre 180-300 KDa aproximadamente, los cuales se unen mediante puentes disulfuro por el extremo amino terminal, formando una estructura hexamérica. Los dominios que conforman la estructura de TN-C se representan en la figura 8, de los cuales el dominio homólogo al fibrinógeno interacciona con otras moléculas de la MEC y con proteínas de la superficie celular, incluyendo colágeno fibrilar, integrinas, heparina y fosfacano (Jones and Jones, 2000).

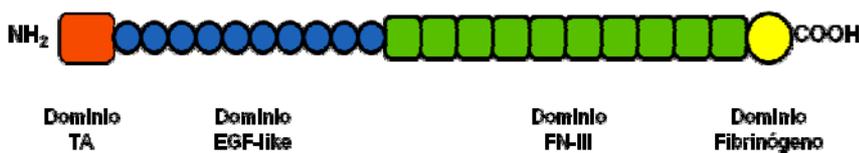


Figura 8. Representación esquemática de la estructura de un monómero de Tenascina-C. El extremo amino terminal posee un dominio de ensamblaje de tenascina, también llamado TA, por el acrónimo en inglés *TN assembly* (naranja); el segundo dominio corresponde a un dominio con repeticiones EGF-like (azul); el tercer dominio corresponde a repeticiones de fibronectina del tipo III o FN-III (verde); la región distal contiene un dominio homólogo a fibrinógeno globular (amarillo).

La expresión de TN-C está altamente regulada durante el desarrollo y en el animal adulto. Durante el desarrollo, TN-C se expresa abundantemente tanto en el SNC como en los tejidos periféricos, mientras que en los adultos se encuentra casi ausente, detectándose en tendones y ligamentos (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004), así como en la corteza cerebral, en el hipocampo, en el cerebelo y en áreas con actividad neurogénica, tales como la zona

subventricular del hipocampo (Bartsch et al., 1992; Gates et al., 1995; Ferhat et al., 1996; Jankovski and Sotelo, 1996; Irintchev et al., 2005).

Las TN son secretadas principalmente por astrocitos inmaduros y por astrocitos reactivos, así como por la glía radial en la corteza cerebral y por la glía de Bergmann en el cerebelo (Grumet et al., 1985; Crossin et al., 1986; Brodkey et al., 1995; Kawano et al., 1995; Yuasa, 1996; Yuasa et al., 1996). Sin embargo, las TN también son secretadas por un número restringido de neuronas inmaduras, que incluyen a las células granulares del hipocampo, motoneuronas de la médula espinal así como por neuronas de la retina en desarrollo (Kawano et al., 1995; Bartsch, 1996).

Un trabajo inicial reportó que los ratones *KO* para TN-C (TN-C $-/-$) no presentaban diferencias respecto a los ratones nativos control (Saga et al., 1992). Trabajos posteriores señalaron que los ratones TN-C $-/-$ muestran una coordinación motora y un comportamiento exploratorio anormal (Fukamauchi et al., 1996; Kiernan et al., 1999), así como una composición celular anormal en la corteza cerebral de los ratones TN-C $-/-$ adultos, observándose una alta densidad neuronal anormal, astrogliosis, una disminución en la densidad de interneuronas positivas para parvalbúmina, una baja proporción entre oligodendrocitos y neuronas, así como una relación menor entre neuronas inhibitorias y excitatorias, respecto al grupo control (Irintchev et al., 2005). Recientemente se ha descrito que los ratones TN-C $-/-$ presentan una reducción en el volumen de la región CA1 del hipocampo, así como una disminución en el número de interneuronas positivas para somatostatina (Gurevicius et al., 2009).

La relación entre la expresión de TN-C y la plasticidad sináptica fue propuesta cuando se encontró que los niveles de TN-C se incrementan en el hipocampo, al aumentar la actividad sináptica (Nakic et al., 1996; Nakic et al., 1998). La estimulación de la vía colateral de Schaffer en el hipocampo de ratones TN-C $-/-$, reduce la LTP en CA1, mientras que la LTP en CA1 se inhibió completamente (Evers et al., 2002). El nifedipino, un bloqueador de los canales de calcio voltaje dependientes de tipo L, no afecta la LTP en los ratones deficientes de TN-C, pero reduce la LTP en los ratones silvestres a niveles observados en los ratones mutantes, indicando la existencia de una relación entre los canales de calcio voltaje dependientes del tipo L y TN-C en la regulación de la plasticidad sináptica.

4.2 La familia SPARC de proteínas matricelulares

Las otras moléculas que se clasifican como proteínas matricelulares pertenecen a la familia de proteínas correspondientes a SPARC, formada por (figura 9): a) SPARC, también conocida como osteonectina ó BM-40; b) hevin, también conocida como SPARC-like 1 (SPL-1), SC1, MAST 9, RAGS-1, QR1 ó ECM2; c) SMOC 1 y 2, por su acrónimo en inglés de *Secreted Modular Calcium Binding Proteins* ó SRG; d) testicano-1, -2 y -3; también conocidos como SPOCKs (por su acrónimo en inglés *SPARC/osteonectin, CWCW and Kazal-like domains*) y por e) la proteína *Follistatin Like protein-1* o Fstl-1. Cada miembro de esta familia posee un dominio EC (*E-F hand Calcium binding*) que une calcio extracelular que se encuentra conservado y que es característico para cada proteína. Basados en la homología de la secuencia de los dominios EC, los miembros de esta familia se pueden clasificar en cuatro grupos: a) SPARC y hevin; b) SMOC 1 y 2; c) Testicano-1, -2 y -3; y d) FSTL-1 (Bradshaw, 2012).

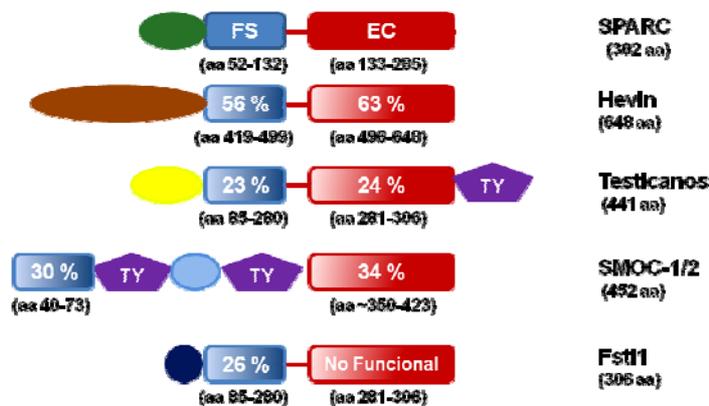


Figura 9. Proteínas de la familia de SPARC. Representación esquemática de las estructuras de los dominios modulares de las distintas proteínas de la familia de SPARC. El número total de aminoácidos para cada región o grupo de proteínas se muestra debajo del respectivo nombre de la proteína. El porcentaje de identidad de los aminoácidos para cada módulo homólogo, se muestra superimpuesto en la representación del respectivo dominio. Testicano-1 y SMOC-1 fueron usados como representantes para el respectivo subgrupo, el porcentaje de identidad para testicano-2 y -3 fue similar al presentado por testicano-1. Lo mismo ocurre con SMOC-2, en donde el grado de identidad es similar a SMOC-1. Los dominios que son únicos para un miembro de la familia o para una subfamilia, se muestra en verde, marrón, amarillo, azul claro y azul oscuro. TY: *thyroglobulin domain* (púrpura), FS: *follistatin domain* (azul), EC: *extracellular domain* (rojo). Adaptada de Bradshaw, 2012 (Bradshaw, 2012).

La proteína SPARC fue identificada por tres grupos independientes como una proteína de los huesos bovinos y humanos, así como una proteína secretada por células en cultivo (Lane and Sage, 1994), que es codificada por un único gen que posee un alto grado de conservación evolutivo. El gen humano es un 92% y un 32% idéntico a los homólogos de ratón y nematodos respectivamente (Brekken and Sage, 2001). En los vertebrados, el gen de SPARC codifica para una proteína de 198-304 aminoácidos, en donde los primeros 17 aminoácidos constituyen una secuencia de señalización, que es eliminada antes de ser secretada.

4.2.1 Papel funcional de SPARC en el sistema nervioso

SPARC ha sido estudiada esencialmente en células de tejidos no neuronales, demostrándose que en estos tipos celulares, esta proteína matricelular interacciona directamente con la MEC y sus receptores. SPARC se une al colágeno IV de la membrana basal, a los colágenos fibrilares I, III y V (Sage et al., 1989; Sasaki et al., 1998; Sasaki et al., 1999), y presumiblemente a las subunidades de integrinas, reduciendo la adhesión de las células a los substratos de la MEC (Said et al., 2007; Nie et al., 2008; Weaver et al., 2008), induciendo un estado intermedio de adhesión debido a la interrupción de los contactos focales de las células (Sage et al., 1989; Bradshaw et al., 1999). Además, SPARC interacciona con diversos factores de crecimiento involucrados en la angiogénesis y en el remodelamiento de tejidos, tales como FGF, por el acrónimo del inglés *Fibroblast growth factor*, el factor de crecimiento VEGF por su acrónimo del inglés *vascular endothelial growth factor*, PDGF por su acrónimo del inglés *platelet-derived growth factor* y el TGF β (Hasselaar and Sage, 1992; Raines et al., 1992; Kato et al., 1998; Kupprion et al., 1998; Motamed et al., 2003; Francki et al., 2004). SPARC contiene tres dominios diferentes (figura 10):

Dominio I: es un dominio altamente ácido que compromete los aminoácidos 3-51, el cual une entre 5 y 8 moléculas de calcio con una constante de afinidad de 10^{-3} - 10^{-5} M.

Dominio II (aminoácidos 52-132): este dominio contiene 10 cisteínas. La secuencia codifica para una estructura que es homóloga para un dominio con repeticiones de folistatina, una proteína que une activina e inhibina, que son miembros de la superfamilia TGF- β , así como agrina. Este dominio contiene péptidos bioactivos que ejercen diferentes efectos en las células endoteliales. El péptido 2.1 (aa 55-74), inhibe la proliferación de las células endoteliales (Funk

and Sage, 1993), y el péptido 2.3 (aa 113-130) que contiene una secuencia GHK que une cobre, estimula la angiogénesis y la proliferación de las células endoteliales (Funk and Sage, 1993; Lane and Sage, 1994). Adicionalmente, se ha descrito que la región N-terminal de este módulo une heparina o proteoglicanos, lo que sería de importancia para el reclutamiento de SPARC en los receptores de la superficie celular (Hohenester et al., 1997).

Dominio III (aa 133-285), constituye el dominio que une calcio extracelular (módulo EC), el cual interactúa con el módulo II a través de diversos residuos, lo que ayudaría a estabilizar las uniones de los iones calcio (Hohenester et al., 1997). El módulo EC contiene una secuencia designada como péptido 4.2 (aa 254-276) que se une a las células endoteliales, inhibiendo su proliferación (Kupprion et al., 1998; Motamed and Sage, 1998). A su vez, el módulo EC se une a los colágenos tipo I – V en una forma dependiente de calcio (Sasaki et al., 1997; Sasaki et al., 1998). Esta afinidad por el colágeno aumenta cuando se rompe el enlace entre los aminoácidos L197 y L198, ruptura que puede ser realizada mediante metaloproteinasas (Sasaki et al., 1997). Se ha demostrado que para la unión con el colágeno se requieren cinco residuos específicos: R149, N156, L242, M245 y E246 (Sasaki et al., 1998) y que el sitio de unión comparte una estructura similar con el receptor de colágeno DDR2 (Hohenester et al., 2008). Los receptores DDR, por su acrónimo del inglés *discoidin domain receptor*, se han clasificado en dos, en el receptor DDR1 que es activado por distintos tipos de colágeno, que incluyen los colágenos tipo I, VI y VIII; y en el receptor DDR2, que es activado sólo por colágeno fibrilar, particularmente por los tipos I y II (Vogel et al., 2006; Leitinger, 2011). Los receptores DDR son receptores que unen colágeno y que participan en la señalización de la adhesión celular, proliferación y remodelamiento de la matriz extracelular (Vogel et al., 2006; Leitinger and Hohenester, 2007). Dada la homología entre el dominio III de SPARC con el receptor DDR2, estas moléculas se unen en el mismo sitio del colágeno fibrilar (Giudici et al., 2008), lo que podría traducirse en una competencia entre SPARC y DDR2 por la unión al colágeno, sugiriendo que la expresión de SPARC podría regular la actividad del DDR2.

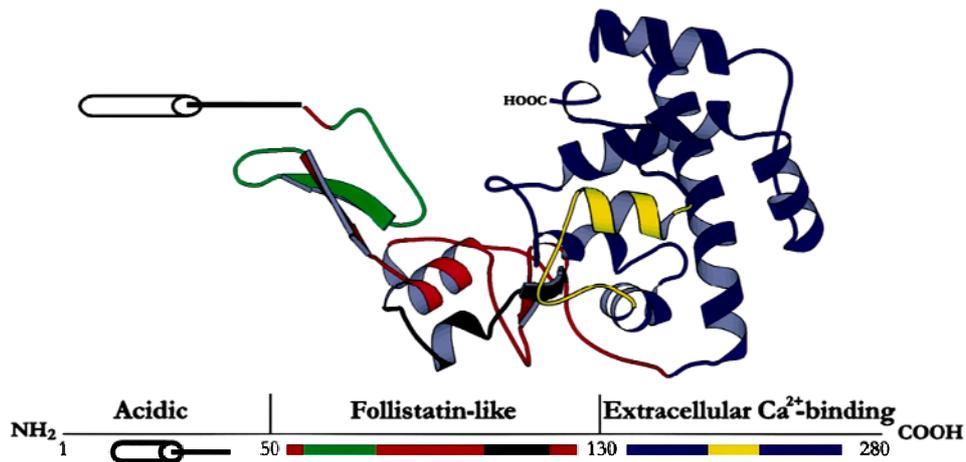


Figura 10. Estructura de SPARC humana. El diagrama, derivado de los datos cristalográficos, nos muestra tres módulos estructurales. El módulo II se muestra en rojo, excepto para los péptidos 2.1 (aa 55-74) y para el péptido 2.3 (aa 113-130), que se muestran en verde y negro, respectivamente. El módulo III se muestra en azul, excepto para el péptido 4.2 (aa 254-276), el que se muestra en amarillo. Adaptado de Bradshaw y Sage, 2001 (Bradshaw and Sage, 2001).

Debido a las propiedades antiadhesivas de SPARC, esta proteína ha cobrado especial interés en el estudio del cáncer, por su posible implicación en los procesos metastásicos (Tai and Tang, 2008). El mecanismo de acción por el cual SPARC realiza su efecto antiadherente, pasa por un cambio en el citoesqueleto celular, en donde la traducción de la señal extracelular de SPARC hacia las vías de señalización intracelulares varía según el tipo celular. Golembieski y colaboradores (Golembieski et al., 2008), describieron que en una línea celular de glioma, SPARC induce un cambio morfológico, pasando de una morfología celular extendida a una morfología celular más contraída y elongada, además de una disminución en la proliferación y un aumento en la migración celular. En estas células los efectos están mediados por un aumento en la actividad de la quinasa ILK (por el acrónimo del inglés *Integrin-Linked Kinase*), que es una quinasa que se une al dominio intracelular $\beta 1$ de las integrinas, que a su vez interactúa directamente con actina y con proteínas que unen actina (Nikolopoulos and Turner, 2001; Wu and Dedhar, 2001; Yamaji et al., 2001; Zhang et al., 2004; Hannigan et al., 2005), por lo que la activación de esta quinasa podría ser la responsable de los cambios inducidos por SPARC, en este tipo celular.

En un trabajo diferente, realizado por Bhoopathi y colaboradores en una línea celular de meduloblastoma (Bhoopathi et al., 2011), se describe que SPARC media el cambio en el citoesqueleto a través de un incremento de la quinasa Src, lo que se traduce en una pérdida de las fibras de estrés de actina y de los contactos focales, observándose una disminución de la

migración de este tipo celular. Estos resultados sugieren que el efecto final de SPARC en el crecimiento y migración celular en este tipo celular, dependen del tipo celular y/o de la composición de la MEC en la cual se encuentra. Como complemento, cabe mencionar que en melanomas y gliomas, la expresión de SPARC se asocia con un fenotipo agresivo del tumor, mientras que en otros tipos de cáncer, principalmente en cáncer de ovarios, neuroblastomas y cáncer colorectal, la expresión de SPARC se asocia con una actividad supresora del tumor (Tai and Tang, 2008).

El efecto antiadhesivo de SPARC se ha demostrado *in vivo* en *Xenopus laevis*, en donde la inyección de la secuencia de SPARC correspondiente al módulo III, inhibe la migración de las células del mesodermo (Huynh et al., 1999). De hecho, varios fenotipos descritos para gusanos, ranas y ratones asociados a una sobreexpresión o ablación de SPARC, podrían reflejar una afectación en los patrones de migración de células durante el desarrollo (Bradshaw and Sage, 2001). La función *in vivo* de SPARC en el ensamblaje de la MEC se evidencia con los ratones *KO* para SPARC, los cuales presentan fenotipos que se relacionan con un depósito y organización de la MEC anormales. Estos animales presentan un menor nivel de colágeno tipo I en la piel, en el tejido adiposo, corazón y huesos (Bradshaw et al., 2003a; Bradshaw et al., 2003b; Delany et al., 2003), exhiben una piel laxa, una cola curva, una formación temprana de cataratas y osteopenia progresiva (Bradshaw and Sage, 2001). La cataratogénesis temprana se debe en la deposición desorganizada de colágeno IV y laminina en la membrana basal del epitelio del cristalino (Gilmour et al., 1998; Norose et al., 1998; Yan et al., 2002; Yan et al., 2003)

En el sistema nervioso, SPARC es secretada por las células gliales: astrocitos, microglía, la glía radial, la glía de Bergmann en el cerebelo y las células de Müller en la retina, la que durante el desarrollo se distribuye por todo el sistema nervioso, particularmente en las áreas sinaptogénicas y en torno a las sinapsis en el hipocampo (Mendis and Brown, 1994; Mendis et al., 1995; Vincent et al., 2008). En el sistema nervioso adulto, SPARC presenta mayores niveles de expresión en el colículo, tálamo, hipotálamo, hipocampo y cerebelo, así como en las células de Müller en la retina, en el bulbo olfatorio y en los nichos neurogénicos como la zona subventricular del hipocampo (Mendis et al., 1995; Vincent et al., 2008), expresión que se incrementa tras un daño en el tejido nervioso (Mendis et al., 1998; Liu et al., 2005). En neuronas del SNP como del SNC, se ha descrito que SPARC promueve el desarrollo y el crecimiento de neuritas (Bampton et al., 2005; Au et al., 2007; Ma et al., 2009; Ma et al., 2010).

Para comprender mejor la función de SPARC en el hipocampo, Jones y colaboradores (Jones et al., 2011) realizaron un análisis de la expresión de SPARC mediante la técnica de *Western blot*, observando que en el hipocampo SPARC tiene su máxima expresión en torno al día P14, tras lo cual disminuye, coincidiendo con el período de mayor formación y reorganización de sinapsis en esta estructura (De Simoni et al., 2003). Al analizar la morfología del hipocampo, los ratones *KO* para SPARC no presentaron diferencias respecto a los ratones nativos control, pero al analizar la actividad neuronal, observaron que las neuronas de la zona CA1 presentaban un aumento en la función de los receptores AMPA y un incremento en la actividad espontánea mediada por éstos. Al estudiar la plasticidad sináptica a largo plazo en ratones ente P25-P30, observaron una disminución de la LTP inducida por la estimulación de la vía colateral de Schaffer, sin observarse cambios en la LTD.

Para estudiar el mecanismo celular por el cual se observan estos cambios, los investigadores cultivaron neuronas de hipocampo en presencia de astrocitos obtenidos de ratones *KO* para SPARC u obtenidos de ratones del grupo control, constatando que la falta de SPARC en el medio de cultivo no modificaba el número de sinapsis, pero incrementaba los niveles de los receptores AMPA y de la subunidad $\beta 3$ de las integrinas en la superficie neuronal, sin alterar los niveles totales de los receptores AMPA ni de los niveles de los receptores NMDA. Los niveles de los receptores AMPA y de la subunidad $\beta 3$ de integrinas en la superficie neuronal, volvieron a ser comparables a los observados en el grupo control tras el tratamiento durante 48 horas con SPARC recombinante.

Resultados previos describen una interacción entre SPARC y las subunidades de las integrinas, y que SPARC disminuye la adhesión celular a los sustratos de la MEC (Said et al., 2007; Nie et al., 2008; Weaver et al., 2008), los que indujeron a Jones y colaboradores a estudiar una posible interacción entre SPARC y la subunidad $\beta 3$, sobre-expresando esta subunidad en la línea celular HEK 293T. Se observó que la adición de SPARC redujo la capacidad de la subunidad $\beta 3$ para unirse a la vitronectina, sugiriendo que SPARC interacciona con los complejos de integrinas $\beta 3$ y regula su función. Un trabajo previo demostró que SPARC interacciona con la subunidad $\beta 1$ de las integrinas, a través de la secuencia descrita para el péptido 2.3 (Weaver et al., 2008). Basándose en este estudio, Jones y colaboradores trataron las neuronas en cultivo que han crecido con los astrocitos *KO* para SPARC con el péptido 2.3, observando una menor acumulación de la subunidad $\beta 3$ y de los receptores AMPA en la superficie neuronal, concluyendo que SPARC interacciona con la subunidad de integrina a través de la secuencia

descrita para el péptido 2.3. Con estos resultados, los autores propusieron que SPARC controla los niveles de los receptores AMPA en la superficie neuronal a través de las β integrinas, evitando así una sobreacumulación de estos receptores en las sinapsis durante su desarrollo, lo que permitiría a las neuronas mantener su plasticidad sináptica.

4.2.2 Función de los otros miembros de la familia SPARC en el sistema nervioso

Los otros miembros de la familia de SPARC son las proteínas hevin, SMOC, testicanos y FSTL-1, miembros que podrían competir con SPARC, debido a la similitud estructural que presentan.

Hevin es la molécula más cercana a SPARC dentro de todos los miembros de esta familia. En los vertebrados hevin contiene aproximadamente 650 aminoácidos que codifican para una proteína de aproximadamente 71 KDa, más grande que los 43 KDa de SPARC. Hevin comparte los tres dominios de SPARC, con un N-terminal más expandido (Sullivan and Sage, 2004). De hecho, la ruptura de hevin por determinadas proteasas, remueve el dominio N-terminal, generando fragmentos similares a SPARC o SLF, del acrónimo del inglés *SPARC-like fragment* (Weaver et al., 2011). Hevin es el único miembro de esta familia que presenta unión a colágeno fibrilar, además de SPARC (Hambrock et al., 2003).

En comparación con SPARC, la expresión de hevin es más restringida, encontrándose principalmente en el sistema nervioso (Gongidi et al., 2004; Sullivan and Sage, 2004). Hevin se puede detectar a partir de P1 en el cerebro de ratones durante el desarrollo postnatal, pero el mayor incremento se observa entre los días P10 y P20, con un pico máximo a P15, coincidiendo con el período de mayor actividad sinaptogénica (Miller and Peters, 1981; Sutor and Luhmann, 1995; Waites et al., 2005; Lively and Brown, 2008). En el cerebro adulto, hevin se localiza en el soma neuronal de la corteza cerebral, en los procesos de la glía de Bergmann ubicados en la capa molecular del cerebelo, y en los cuerpos celulares de las células amacrinas y neuronas ganglionares de la retina (Lively et al., 2007), en donde, además de ser un agente sinaptogénico para las neuronas ganglionares de la retina (Kucukdereli et al., 2011), participa en la migración neuronal en la corteza cerebral durante su desarrollo (Gongidi et al., 2004).

Se ha demostrado que hevin, tanto *in vitro* como *in vivo*, sufre una ruptura por la proteasa ADAMTS4, una desintegrina y metaloproteinasa que rompe los proteoglicanos agregano y brevicano (Gao et al., 2002), lo que genera una fracción proteolítica de hevin similar a SPARC. La relevancia que este proceso tiene *in vivo*, se manifiesta en que los ratones *KO* para hevin o para ADAMTS4 presentan unas células de Purkinje con una morfología alterada, con procesos dendríticos con apariencia atrofiada y con una arborización significativamente menor, así como un incremento en el número de astrocitos presentes en la sustancia blanca del cerebelo, respecto al grupo control (Weaver et al., 2010). En un estudio reciente, se ha demostrado que hevin y SPARC presentan un patrón de expresión similar durante el desarrollo, no obstante la expresión de hevin no se incrementa en los ratones *KO* para SPARC, como cabría esperar si las funciones de estas proteínas fuesen redundantes (Lloyd-Burton and Roskams, 2012).

Las proteínas SMOC-1 y SMOC-2 contienen el dominio EC, que es común con SPARC, adicionalmente al dominio *follistatin-like*, a pesar de lo cual no se ha predicho que estas proteínas unan colágeno (Vannahme et al., 2002). SMOC-1 se encuentra principalmente en las membranas basales así como asociados a otras proteínas de la MEC (Vannahme et al., 2002; Gersdorff et al., 2006). Recientemente se ha determinado que SMOC-1 presenta niveles elevados en tumores cerebrales así como en gliomas (Brellier et al., 2011), y que se une a las proteínas del suero, a TN-C, fibulina-1 y a la proteína reactiva C (Novinec et al., 2008; Brellier et al., 2011).

Las proteínas SPOCK, o testicanos, comprenden tres proteínas codificadas por genes separados, testicano -1,-2 y -3, en donde testicano-1 es el mejor caracterizado. Testicano-1 es un proteoglicano inicialmente encontrado en los testículos, de ahí su nombre, pero el mayor nivel de expresión de esta proteína se encuentra en el cerebro (Edgell et al., 2004). En ratón, esta proteína se expresa únicamente en el cerebro, en particular en las neuronas del hipocampo (Bonnet et al., 1996) y su período de expresión en el sistema nervioso se correlaciona con el desarrollo embrionario, la migración neuronal y el crecimiento axonal (Charbonnier et al., 2000). Se ha planteado que testicano-1 podría participar en el desarrollo del cerebro, porque al igual que SPARC ejerce un efecto antiadhesivo, debido a que puede bloquear la adhesión al sustrato de línea celular neuronal Neuro-2A y bloquear el crecimiento de neuritas (Marr and Edgell, 2003)

A pesar de que testicano-1 se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso durante el desarrollo y el establecimiento de las sinapsis, los ratones *KO* para testicano-1 no presentan un fenotipo diferente al del grupo control. Los ratones *KO* para testicano-1 son fértiles, no muestran

comportamientos anormales y no evidencian diferencias morfológicas del sistema nervioso central respecto a los ratones nativos control, lo que no se debe a una compensación funcional por parte de los otros miembros de la familia, ya que los ratones *KO* para testicano-1 no presentan un aumento en la expresión ni de testicanos-2 y -3 ni de hevin, pudiendo ser que los niveles basales de estas proteínas sean suficientes para suplir la falta de testicano-1 (Roell et al., 2006).

El último miembro de la lista de proteínas de la familia de SPARC, es la proteína FSTL-1, que al igual que los otros miembros de la familia de SPARC, codifica para un dominio EC, el cual se considera no funcional para esta proteína (Hambrock et al., 2004). En el sistema nervioso, FSTL-1 se expresa desde el desarrollo embrionario hasta P20 en el hipocampo, en la corteza cerebral, en el tálamo e hipotálamo, en la espina dorsal y en el ganglio de la raíz dorsal (Yang et al., 2009). Es justamente en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en dónde se ha descrito un papel funcional para FSTL-1 (Li et al., 2011).

En el ganglio de la raíz dorsal se sitúan las neuronas sensoriales, encargadas de transmitir la información desde la periferia hasta el sistema nervioso central (Woolf and Ma, 2007; Basbaum et al., 2009). FSTL-1 también se expresa en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de diámetro pequeño (Li et al., 2011), encargadas de transmitir las señales sensoriales generadas por los nociceptores, termorreceptores y los mecanorreceptores (Woolf and Ma, 2007; Basbaum et al., 2009). Li y colaboradores, determinaron que la aplicación de FSTL-1 disminuía la frecuencia y la amplitud de la actividad espontánea, así como la amplitud de la respuesta evocada en estas neuronas. Al estudiar el mecanismo mediante el cual FSTL1 media este efecto, Li y colaboradores determinaron que esta proteína matricelular se une a la subunidad $\alpha 1$ de la bomba sodio-potasio, activándola, generando una hiperpolarización de las células que expresan esta subunidad. Como consecuencia de esta actividad, las neuronas pequeñas del ganglio presentan una hiperpolarización y una frecuencia menor de potenciales de acción inducidos por corrientes despolarizantes, así como un período de hiperpolarización prolongado.

Con el fin de evaluar la relevancia fisiológica de FSTL1, los investigadores estudiaron la respuesta de los ratones *KO* para FSTL1 frente a la estimulación mecánica y térmica en la superficie plantar, observando que estos ratones exhiben una hipersensibilidad a estas estimulaciones, efecto que se revierte tras la aplicación de la proteína matricelular en la espina dorsal. Por lo tanto, la proteína FSTL1 es necesaria para el normal funcionamiento de las neuronas implicadas en la transmisión de las señales sensoriales.

El conjunto de trabajos revisados, demuestran la existencia de una matriz extracelular en el sistema nervioso central, cuyos componentes poseen una función estructural que participan en la formación y remodelamiento de la sinapsis, así como en la transmisión y plasticidad sináptica. Los componentes de la red perineuronal ejercen sus funciones a través de su interacción con distintos componentes presinápticos como postsinápticos, tales como receptores de neurotransmisores, receptores de la matriz extracelular o canales iónicos. De los componentes que se encuentran en la MEC, la función de las proteínas matricelulares ha sido estudiada principalmente en tejidos no neuronales, conociéndose en los últimos años el papel que estas proteínas desempeñan en el sistema nervioso esencialmente desde un punto de vista postsináptico, siendo la trombospondina el miembro más estudiado.

La línea de investigación de interés en nuestro grupo del laboratorio de Neurobiología, se centra en los terminales presinápticos, esencialmente en el estudio de los mecanismos moleculares de la transmisión sináptica, por lo que en las siguientes secciones se procederá a describir la organización de los depósitos de las vesículas sinápticas y los eventos que regulan la maduración del terminal presináptico.

5 Organización de los depósitos de vesículas en el terminal presináptico.

La transmisión sináptica es la base de la transferencia de información en el sistema nervioso y tiene lugar en los sitios de contactos entre las neuronas, los cuales fueron denominados como sinapsis por Charles Sherrington (Molnár and Brown, 2010). Este proceso de comunicación neuronal está mediada por neurotransmisores químicos que se encuentran almacenados en vesículas secretoras o vesículas sinápticas en el terminal de la neurona presináptica, las cuales pueden ser utilizadas repetidamente durante una actividad sostenida en el tiempo. La acumulación de este tipo de vesículas es una de las características de un terminal presináptico (Rizzoli and Betz, 2005).

La relación entre las vesículas sinápticas y la transmisión sináptica empezó con la serie de experimentos realizados por Bernard Katz y colaboradores, quienes demostraron que: 1) los neurotransmisores se liberan en paquetes que denominaron cuantos, 2) que la neurotransmisión puede ser espontánea o evocada (figura 11) y, 3) que los potenciales de la neurotransmisión

evocada correspondían a la sumatoria de los potenciales unitarios individuales observados durante la neurotransmisión espontánea (Fatt and Katz, 1951, 1952; Del Castillo and Katz, 1954).

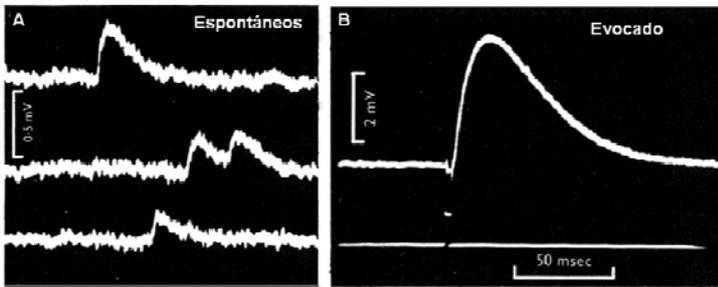


Figura 11. Las vesículas se liberan de forma espontánea y evocada. Potenciales de la placa motora espontáneos y evocados, obtenidos mediante registros intracelulares de la unión neuromuscular de rana.

A: potencial espontáneos de placa motora en miniatura. B: Potencial de placa motora evocado. Adaptado de Katz y Miledi, 1969 (Katz and Miledi, 1969).

Paralelamente, el empleo de la microscopía electrónica en los tejidos nerviosos llevó a la identificación de las vesículas sinápticas en los terminales presinápticos (Palay and Palade, 1955), con lo que se hipotetizó que éstas correspondían a la estructura morfológica de la teoría cuantál de la liberación de neurotransmisores propuesta por Del Castillo y Katz (Del Castillo and Katz, 1954). Posteriormente, y mediante el uso de microscopía electrónica de criofractura, Heuser y colaboradores (Heuser et al., 1979) identificaron vesículas sinápticas en contacto directo con la membrana neuronal en la unión neuromuscular de rana, correlacionando la liberación de un cuanto de neurotransmisor con la fusión de una sola vesícula sináptica.

El estudio de la organización de los depósitos de vesículas comenzó con el trabajo de Birks y MacIntosh (Birks and Macintosh, 1961), quienes investigaron la liberación de acetilcolina en los ganglios simpáticos de gato, proponiendo que el neurotransmisor se almacenaba en dos depósitos presinápticos distintos, uno de liberación rápida (*“readily releasable” fraction*), el cual se vaciaba rápidamente al aplicar una estimulación a alta frecuencia; y otro de liberación lenta (*“non-readily releasable” fraction*). Posteriormente, Quastel y colaboradores (Elmqvist et al., 1964; Elmqvist and Quastel, 1965) obtuvieron unos resultados similares en estudios realizados en el músculo intercostal humano. Además, ellos observaron que durante una estimulación a altas frecuencias la amplitud de las respuestas disminuía rápidamente, sugiriendo que los primeros estímulos liberaban neurotransmisores de un depósito de fácil movilización o *mobilization store*. Estos autores concordaban con lo propuesto por Birks y MacIntosh, en donde el depósito de fácil movilización se correspondería al depósito de liberación rápida y el resto se correspondería con el depósito de liberación lenta.

5.1 Aspectos funcionales de los depósitos de vesículas sinápticas

La determinación de los depósitos de vesículas se ha realizado principalmente mediante tres técnicas: microscopía electrónica, microscopía de fluorescencia y técnicas electrofisiológicas, las cuales han sido empleadas para estudiar los depósitos de vesículas en distintas preparaciones, tales como en la unión neuromuscular de rana (Heuser and Reese, 1973; Richards et al., 2003; Rizzoli and Betz, 2004), en la unión neuromuscular de *drosophila* (Atwood et al., 1993; Koenig and Ikeda, 1999; Kuromi and Kidokoro, 1999, 2000, 2002; Kuromi et al., 2010), en cultivo de neuronas del hipocampo de roedores recién nacidos (Rosenmund and Stevens, 1996; Schikorski and Stevens, 1997; Pyle et al., 2000; Harata et al., 2001; Schikorski and Stevens, 2001; Andreae et al., 2012), en los terminales presinápticos de cáliz de Held de roedores recién nacidos (Schneggenburger et al., 1999; Wu and Borst, 1999; Sätzler et al., 2002; de Lange et al., 2003; Wölfel and Schneggenburger, 2003; Müller et al., 2010), en el terminal nervioso de las neuronas bipolares de la retina de la carpa dorada (Lagnado et al., 1996; von Gersdorff et al., 1996; Neves and Lagnado, 1999; Holt et al., 2004; Zenisek, 2008), en la unión neuromuscular de serpientes (Teng et al., 1999; Teng and Wilkinson, 2000; Lin et al., 2005), en las neuronas de *Aplysia californica* (Humeau et al., 2001; Doussau et al., 2010), en la sinapsis del calamar gigante (Hilfiker et al., 1998; Yu et al., 2008), y en la sinapsis retículo-espinal de la lamprea (Shupliakov et al., 2002; Andersson et al., 2008).

Como podemos apreciar, existen múltiples modelos en los cuales se han estudiado los depósitos de vesículas, por lo cual la terminología para denominar los depósitos de vesículas varía de acuerdo a los laboratorios de investigación que los han descrito. Por ejemplo, a las vesículas que primero se liberan, Birks y MacIntosh las denominaron depósito de liberación rápida, mientras que Quastel y colaboradores le nombraron depósito de fácil liberación, por lo que en este trabajo empleamos la terminología utilizada por Rizzoli y Betz en su revisión de 2005 (Rizzoli and Betz, 2005)

1) Depósito de vesículas de liberación rápida ó RRP (por su acrónimo del inglés *rapidly or readily releasable pool*): Este depósito de vesículas se define como aquellas vesículas que se encuentran disponibles para ser liberadas rápidamente frente a una estimulación, el cual ha sido correlacionadas con las vesículas que se encuentran ancladas a la zona activa, en los terminales presinápticos de neuronas de hipocampo, (Schikorski and Stevens, 2001). En neuronas de hipocampo en cultivo, el RRP está formado por entre 5 a 9 vesículas sinápticas, medidas por

microscopía de fluorescencia empleando el colorante FM1-43 (Murthy y Stevens 1999), o por 5 a 10 vesículas por zona activa, determinado por microscopía electrónica (Schikorski y Stevens 1997). El RRP es un depósito de vesículas que se agota rápidamente, cuya liberación se puede inducir mediante la generación 5 a 15 potenciales de acción con una estimulación eléctrica de entre 20 – 100 Hz (Elmqvist and Quastel, 1965; Schneggenburger et al., 1999; Richards et al., 2003), tras unos pocos segundos de depolarización (Mennerick and Matthews, 1996; Neves and Lagnado, 1999), o mediante la aplicación de una solución hipertónica por aproximadamente 1 segundo (Rosenmund and Stevens, 1996). En este trabajo hemos determinado el tamaño del RRP utilizando técnicas electrofisiológicas y de microscopía electrónica.

2) Depósito de vesículas de reciclaje: se define por aquellas vesículas que pueden mantener una liberación de neurotransmisor, y que se estima que corresponde entre el 5 y el 20 % del total de las vesículas presentes en el botón sináptico. La aplicación de estimulaciones a frecuencias moderadas, de entre 2 y 5 Hz, causan un reciclado continuo de estas vesículas (de Lange et al., 2003; Kuromi and Kidokoro, 2003; Richards et al., 2003).

3) Depósito de vesículas de reposo o de reserva: corresponde al más grande de los tres depósitos de vesículas, el cual constituye entre el 80 y el 90 % del total de vesículas presentes en un terminal, aproximadamente, las cuales sólo se pueden liberar durante una estimulación intensa. En la unión neuromuscular de la rana, se requiere una frecuencia de estimulación de al menos 10-30 Hz por un tiempo variable según la preparación, que va desde los 10-15 segundos hasta 15 minutos (Heuser and Reese, 1973; Delgado et al., 2000; Richards et al., 2000; Kidokoro et al., 2004) o por una estimulación neuronal prolongada mediante la aplicación de la aplicación de un medio de 50 mM KCl durante 15 minutos, en el terminal presináptico del cáliz de Held (de Lange et al., 2003). En la siguiente tabla se resumen las características generales de los depósitos de vesículas anteriormente descritos.

Depósito de vesículas	RRP	De Reciclado	De Reserva
Tamaño (% respecto al total de vesículas)	~ 1 – 2%	~ 10 – 20 %	~ 80 – 90%
Localización	Ancladas a la membrana neuronal	Dispersas	Dispersas (agrupaciones de vesículas en masa)
Tiempo de liberación	< 1 segundo	Pocos segundos	Decenas de segundos a minutos
Reciclado	Rápida (segundos)	Rápida (segundos)	Lenta (minutos)

Tabla 4. Características de los distintos depósitos de vesículas. Adaptado de Rizzoli and Betz, 2005 (Rizzoli and Betz, 2005)

La cuantificación de los depósitos de vesículas, de acuerdo al número total de vesículas del terminal presináptico hace que intuitivamente sean representados en un modelo en donde los depósitos se encuentran morfológicamente segregados en distintas agrupaciones, como se representa en la figura 13A. El depósito con una mayor probabilidad de liberación se representa más cercano a la membrana neuronal, mientras que el depósito con menor liberación se encuentra más alejado de la membrana presináptica, sugiriendo que son las vesículas con una liberación más lenta o casi nula. A pesar de esta esquematización, es muy difícil separar los depósitos de vesículas ya que éstos no son anatómicamente distinguibles (Harata et al., 2001; de Lange et al., 2003), tal como podemos apreciar en la figura 12.

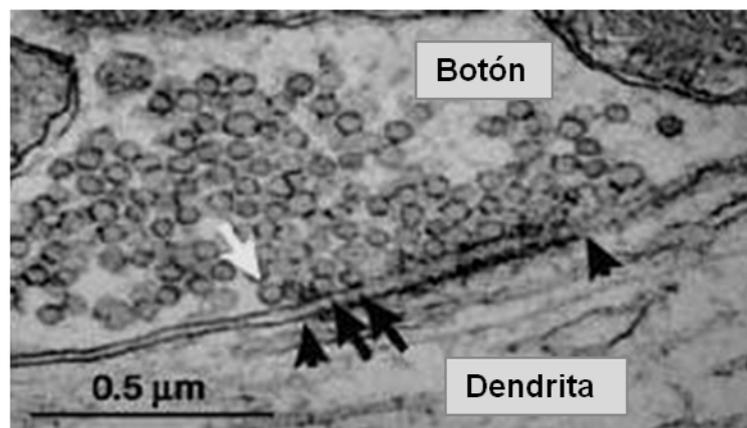


Figura 12. Caracterización de los depósitos de vesículas mediante microscopía electrónica. Micrografía de microscopio electrónico de una sección transversal de un botón sináptico de hipocampo. Las cabezas de flecha indican los extremos de la zona activa en esta imagen, las flechas negras señalizan dos vesículas ancladas a la zona activa, la flecha blanca señaliza una vesícula cercana a la zona activa y que no se encuentra anclada. Modificada de Rizzoli and Betz, 2005 (Rizzoli and Betz, 2005).

A pesar de que las vesículas que componen el RRP han sido correlacionadas con las vesículas ancladas a la membrana, Rizzoli y Betz, mediante el empleo del colorante FM 1-43, mostraron que no todas las vesículas ancladas en la zona activa se liberan tras una estimulación, y que aquellas que se liberan, tras la estimulación, pasan a distribuirse dentro de todo el terminal, en zonas que no necesariamente se corresponden con la zona activa (Rizzoli and Betz, 2004). Adicionalmente, en distintas preparaciones se ha descrito que las vesículas que conforman el depósito de reciclaje se encuentran dispersas por todo el terminal nervioso y que a su vez, se encuentran mezcladas con las vesículas que componen los otros depósitos. (Harata et al., 2001; de Lange et al., 2003; Rizzoli and Betz, 2004; Denker et al., 2009)

Todos estos trabajos han llevado a plantear otro modelo para la distribución de los depósitos de vesículas, representado en la figura 13B, en donde las vesículas del RRP se encuentran ancladas o cercanas a la membrana plasmática, pero en donde las vesículas que conforman los otros dos depósitos se encuentran entremezcladas.

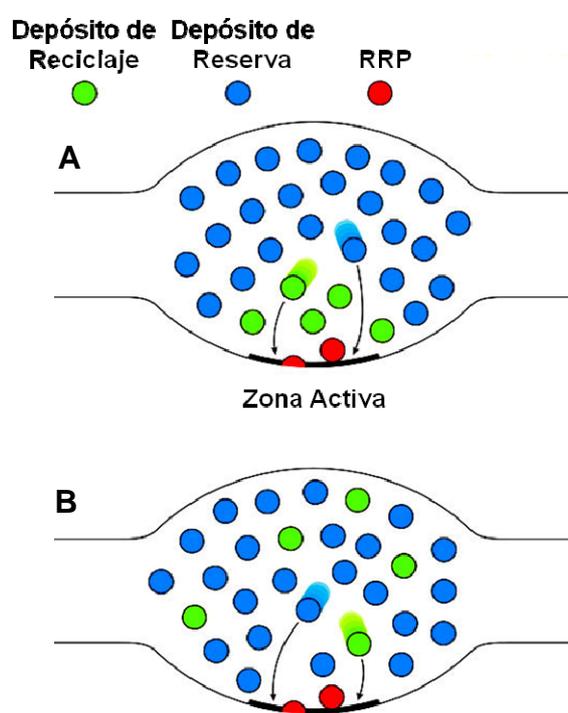


Figura 13. Modelos de los depósitos de vesículas. A) modelo clásico en donde los tres depósitos de vesículas están localizados independientemente. El depósito de vesículas de liberación rápida (RRP, en rojo) consiste en las vesículas acopladas a la zona activa (en negro) y preparadas para ser liberadas. En este modelo, el depósito de vesículas de reciclaje (en verde) se dispone directamente detrás del RRP. Bajo estimulaciones moderadas, y una vez que se ha vaciado el RRP, estas vesículas se movilizan a la zona activa (flecha izquierda) para ser liberadas. Estimulaciones a altas frecuencias provocan un vaciamiento del depósito de reciclaje, por lo que las vesículas del depósito de reserva (en azul) se movilizan desde áreas alejadas de la zona activa para ser liberadas (flecha derecha). B) Modelo de depósitos que considera la mezcla espacial de las vesículas. En contraste con el modelo previo, en éste las vesículas de los depósitos de reciclaje y de reposo se encuentran espacialmente, pero no funcionalmente, entremezcladas. A la llegada de un potencial de acción, las vesículas del RRP (que corresponderían a vesículas de reciclaje afortunadas que se encuentran acopladas a la zona activa) se liberan primero, seguidas por la liberación de vesículas del depósito de reciclaje (flecha derecha). Como en el modelo anterior, estimulaciones continuas a altas frecuencias resultan en un vaciamiento del depósito de reciclaje y en la movilización de las vesículas del depósito de reserva (flecha derecha). Adaptado de Denker and Rizzoli, 2010 (Denker and Rizzoli, 2010).

5.2 Neurotransmisión y depósitos de vesículas: una discusión vigente

Como se ha descrito en el apartado anterior, Katz y colaboradores describieron los potenciales espontáneos de placa motora miniatura, los cuales posteriormente fueron identificados como producto de la fusión de una vesícula individual. Adicionalmente, describieron que la estimulación de la unión neuromuscular de la rana generaba una respuesta sináptica que se correspondía a la sumatoria de potenciales unitarios individuales, los cuales eran idénticos en tamaño y forma a los observados en los potenciales espontáneos, planteando la teoría cuantal de la neurotransmisión. La fusión espontánea de vesículas es un fenómeno observado en todas las sinapsis, en donde el origen de las vesículas sinápticas que generan la actividad espontánea y la evocada aún queda por determinar. Existe un contraste de opiniones sobre el origen de las vesículas que participan en la neurotransmisión, diversos trabajos proponen que ambos tipos de neurotransmisión son generados por vesículas provenientes de un mismo depósito (Groemer and Klingauf, 2007; Hua et al., 2010; Wilhelm et al., 2010), o provenientes de depósitos diferentes (Sara et al., 2005a; Mathew et al., 2008; Fredj and Burrone, 2009; Chung et al., 2010; Andreae et al., 2012) como se explica a continuación.

El estudio del origen de las vesículas que generan tanto la respuesta evocada como la espontánea, se ha realizado principalmente mediante microscopía de fluorescencia, empleando los colorantes FM para monitorizar la liberación y el reciclado de las vesículas sinápticas en células vivas, así como la utilización de anticuerpos contra proteínas presentes en la vesícula sináptica. Los colorantes FM son moléculas anfipáticas fluorescentes que se unen a la membrana plasmática de forma reversible. Debido a la carga que presentan, los colorantes FM no atraviesan la membrana, por lo que se han empleado para estudiar el reciclaje de las vesículas sinápticas (Cochilla et al., 1999).

La primera evidencia de la existencia de dos depósitos de vesículas independientes para la transmisión sináptica evocada y espontánea, se obtuvo mediante el uso de un colorante FM. Sara y colaboradores (Sara et al., 2005a) estudiaron el reciclaje de las vesículas empleando el colorante FM 2-10, en neuronas de hipocampo en cultivo, encontrando que las vesículas marcadas con el colorante FM 2-10 durante la transmisión espontánea, una vez recicladas no se liberan al inducir una respuesta evocada mediante trenes de pulsos de 10 Hz por 90 segundos, ni por la aplicación de una solución 90 mM de potasio, ni mediante la aplicación de una solución

hipertónica de sucrosa. Por otra parte, describieron que la inhibición de la reacidificación de la vesícula mediante el uso de folimicina, un bloqueador de la bomba de protones de la vesícula sináptica, disminuye la transmisión espontánea sin alterar la neurotransmisión evocada (Sara et al., 2005a). Con estos resultados, los investigadores propusieron que las vesículas que participan en la actividad espontánea pertenecen al depósito de vesícula de reserva y que las vesículas que participan en la actividad evocada pertenecen al RRP y al depósito de reciclaje. Resultados similares se encontraron al estudiar los depósitos de vesículas involucradas en la actividad espontánea y evocada de neuronas inhibitorias en rodajas de la corteza prefrontal obtenidas de ratas P18 – P25 (Mathew et al., 2008).

Sin embargo, Groemer y Klingauf (Groemer and Klingauf, 2007) propusieron que las vesículas que participan en la neurotransmisión pertenecen a un mismo depósito. Estos investigadores realizaron experimentos similares a los de Sara y colaboradores, empleando unos protocolos de adquisición y análisis de imágenes mejorados que les permitieron marcar secuencial y diferenciadamente, con los colorantes FM 5-95 (rojo) y FM 1-43 (verde), las vesículas que participaban en la actividad evocada y en la espontánea, respectivamente, pudiendo analizar simultáneamente la liberación de ambos grupos de vesículas durante la transmisión evocada por dos trenes de 900 potenciales de acción a 10 hercios. Los investigadores encontraron que con esta estimulación se liberaban tanto las vesículas marcadas durante la actividad evocada como aquellas marcadas durante la actividad espontánea, concluyendo que las vesículas que participan en ambos tipos de neurotransmisión provenían de un mismo depósito de vesículas, y que la discrepancia con los resultados obtenidos por Sara y colaboradores se podría deber a una deficiencia en la adquisición de la fluorescencia y/o a una incorrecta normalización de las señales de fluorescencia. Adicionalmente, observaron que la aplicación de folimicina durante la estimulación agotaba la liberación de neurotransmisor para ambos tipos de neurotransmisión, lo que reforzaba la proposición de un solo depósito de vesícula para ambos tipos de neurotransmisión.

Además de los argumentos expuestos por Groemer y Klingauf para explicar la diferencia en los resultados, esta discrepancia de resultados puede estar dada por el empleo de distintos colorantes FM, ya que se ha reportado que los colorantes empleados presentan una diferencia en las propiedades fluorescentes (Cochilla et al., 1999) y una diferencia en la afinidad por las membranas (Zhu and Stevens, 2008). La diferencia en las propiedades fluorescentes se evidencia al comparar la fluorescencia entre el colorante FM 2-10 y el FM 1-43, en donde el primero posee

una señal mucho menor respecto al segundo, razón por la cual se emplea a una concentración mayor. La diferencia de concentraciones podría afectar los resultados obtenidos, ya que cuando se encuentran en altas concentraciones se podría inhibir el reciclado de las vesículas, debido a la semejanza estructural que poseen con los detergentes (Cochilla et al., 1999; Zhu and Stevens, 2008)

Con el fin de solventar las diferencias de resultados que puede inducir el empleo de distintos tipos de colorantes FM, los investigadores Fredj y Burrone (Fredj and Burrone, 2009), marcaron la proteína vesicular sinaptobrevina-2 (VAMP-2) con biotina, para posteriormente marcar con estreptavidina conjugada con fluoróforos aquellas vesículas que son recicladas. Adicionalmente, en este trabajo, los investigadores estudiaron el reciclado vesicular mediante sinaptofluorina, un marcador fluorescente sensible al pH. Con estas técnicas, observaron que las vesículas implicadas en estos dos tipos de neurotransmisión se pueden marcar selectivamente, señalando que éstos serían completamente independientes entre sí, reforzando la hipótesis de los dos depósitos de vesículas independientes implicados en la neurotransmisión. Adicionalmente, la existencia de estos dos depósitos de vesículas diferenciados se ve reforzada por el trabajo realizado por Chung y colaboradores (Chung et al., 2010), quienes describieron que en neuronas de hipocampo en cultivo, la aplicación de dynasore, un inhibidor reversible de la proteína dinamina, y por lo tanto de la endocitosis de las vesículas sinápticas (Newton et al., 2006), bloquea la actividad evocada, pero no la actividad espontánea.

El estudio de las vesículas implicadas en la neurotransmisión y el depósito al que pertenecen, continuó con el trabajo realizado por Hua y colaboradores (Hua et al., 2010), quienes argumentaron que la técnica desarrollada por Fredj y Burrone presentaba la desventaja de que el reciclado de las vesículas no podría ser monitorizado repetidamente, debido a la unión irreversible entre la biotina y la estreptavidina, lo que podría incrementar la variabilidad de los resultados, ya que no se pueden realizar más de una medición por botón sináptico, a diferencia de cuando se emplean los colorantes FM con los cuales se pueden realizar varias mediciones en un mismo botón sináptico. Por este motivo, Hua y colaboradores conjugaron estreptavidina con cypHer-5E, un colorante fluorescente sensible al pH y, en vez de marcar las vesículas sinápticas mediante la sobreexpresión de VAMP-2 para conjugarla con biotina, Hua y colaboradores marcaron la proteína de la vesícula sináptica sinaptotagmina 1, para así evitar cualquier artefacto resultante de la sobreexpresión de proteínas en las neuronas. Empleando este nuevo protocolo de marcaje, los investigadores encontraron que las vesículas que participan en la neurotransmisión

evocada y espontánea pertenecen a un mismo depósito de vesículas, confirmando las observaciones descritas anteriormente por este grupo, obtenidas mediante el empleo de los colorantes FM 1-43 y FM 5-95 (Groemer and Klingauf, 2007). Adicionalmente, Wilhelm y colaboradores (Wilhelm et al., 2010), estudiaron la liberación y reciclado de las vesículas sinápticas en neuronas de hipocampo en cultivo, así como en las uniones neuromusculares de ratón, de rana y de *drosophila*, empleando diversas técnicas de microscopía de fluorescencia, encontrando que en ninguna de las preparaciones estudiadas, independientemente de la técnica de fluorescencia utilizada, se observaba una segregación entre las vesículas que participan en la neurotransmisión evocada o espontánea.

Finalmente, en un esfuerzo para dirimir y comprender el origen de las vesículas que participan en la neurotransmisión, Burrone y colaboradores estudiaron la neurotransmisión durante el desarrollo neuronal, utilizando tanto el método por él descrito, como el empleado por Hua y colaboradores en su trabajo del 2010 (Andreae et al., 2012). En este estudio, Andreae y colaboradores señalan que las vesículas que participan en la actividad espontánea y en la evocada se encuentran segregadas en depósitos diferentes. Además argumenta que el método empleado por Hua no sería el más adecuado para estudiar la segregación de las vesículas, dado que la proteína sinaptotagmina 1 se encuentra presente en la superficie de la membrana presináptica, la cual experimenta endocitosis (Fernández-Alfonso et al., 2006; Wienisch and Klingauf, 2006), pudiendo intervenir en el marcado de las vesículas. Para demostrar esta afirmación, Andreae marcó sinaptotagmina 1 con un anticuerpo conjugado con cypHer-5E, reproduciendo los resultados obtenidos por Hua, concluyendo que esta metodología no se puede emplear para investigar el reciclado de las vesículas dependiente de la actividad.

Considerando que distintos grupos de investigación han obtenido resultados divergentes, empleando las mismas técnicas, se hace evidente una necesidad de estandarización de los protocolos experimentales y/o el desarrollo de técnicas más precisas y estandarizadas en la identificación del reciclado de las vesículas sinápticas, que solventen las diferencias que los grupos alegan a favor o en contra de una posición o de otra.

En este punto existen dos evidencias que apoyan la teoría de la existencia de dos depósitos de vesículas para la neurotransmisión. La primera evidencia se obtiene con el trabajo de Andreae y colaboradores, quienes exponen la existencia de dos depósitos de vesículas segregadas para la neurotransmisión; la segunda evidencia la obtenemos del trabajo realizado por Chung y

colaboradores, quienes muestran que las vesículas que participan en la actividad espontánea no se ven afectadas al inhibir la endocitosis, cosa que sí ocurre con las vesículas que participan en la actividad evocada. A partir de los trabajos que proponen que las vesículas que participan en la neurotransmisión evocada y espontánea pertenecen a dos depósitos de vesículas diferenciados, se plantean dos modelos para explicar el origen de las vesículas (figura 14): 1) los trabajos realizados en neuronas de hipocampo sugieren que las vesículas responsables de la fusión espontánea y de la evocada pertenecen a depósitos diferentes, distribuidas en un mismo terminal, en donde estos depósitos se reciclarían de forma independiente (Sara et al., 2005a; Fredj and Burrone, 2009; Chung et al., 2010); 2) La liberación espontánea de neurotransmisor estaría dado principalmente por vesículas que forman el depósito de reserva, las cuales normalmente no contribuyen a la liberación evocada (Fredj and Burrone, 2009; Andreae et al., 2012)

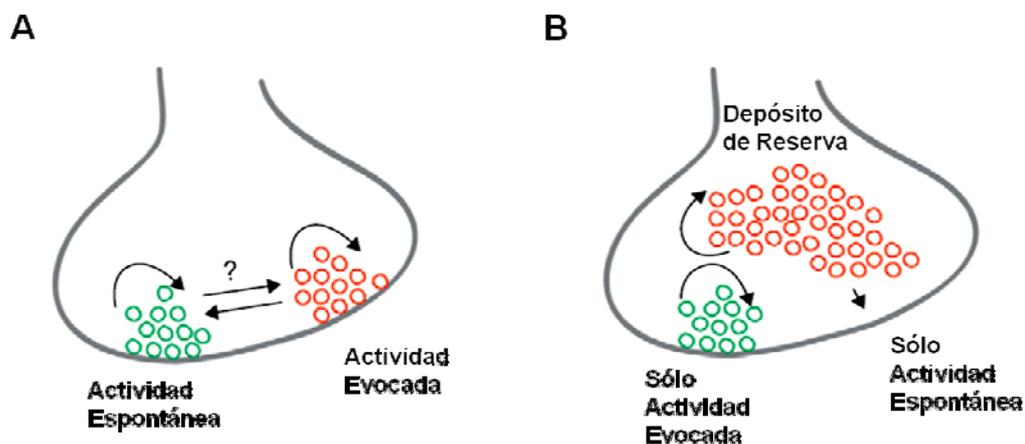


Figura 14. Modelos de segregación de las vesículas que participan en la neurotransmisión espontánea y evocada. Modelo propuesto en donde las vesículas que participan en la transmisión evocada y en la espontánea, pertenecerían a distintos depósitos de vesículas (verde y rojo, respectivamente). **A)** modelo propuesto en donde un mismo botón sináptico posee los dos depósitos de vesículas, que se fusionan y reciclan independientemente. **B)** Modelo propuesto en donde las vesículas que forman el RRP y el depósito de reciclaje, participan en la actividad espontánea y en donde las vesículas del depósito de reserva, serían las responsables de la neurotransmisión espontánea. Adaptado de Ramirez and Kavalali, 2011 (Ramirez and Kavalali, 2011).

6 Maduración sináptica

La sinapsis química es un contacto célula-célula formado por el axón de una neurona que envía una señal y las dendritas, somas neuronales o axones que reciben la señal. La formación de la sinapsis es un proceso continuo que va desde el contacto inicial entre los terminales presinápticos y postsinápticos, hasta la obtención de una sinapsis completamente funcional

(Garner et al., 2006), en donde, como se describe más adelante, proteínas de adhesión celular participan en la formación de las sinapsis (Brose, 1999; Dalva et al., 2007).

Estudios de microscopía electrónica muestran que los terminales presinápticos van acumulando vesículas sinápticas a medida que maduran (Feldmeyer and Radnikow, 2009). Es así como estudios realizados en las neuronas del ganglio cervical superior, el tipo neuronal que empleamos en este trabajo, se aprecia un incremento en el número y densidad de vesículas sinápticas presentes en el terminal en las neuronas maduras respecto a las inmaduras, además se observa que las sinapsis maduras presentan una mayor agrupación de las vesículas, al contrario de lo caracterizado en las neuronas inmaduras (Rees et al., 1976; Furshpan et al., 1986).

6.1 Desarrollo y maduración de los depósitos de vesículas

Además de las diferencias apreciables por microscopía electrónica, técnicas de microscopía de fluorescencia mediante el uso de colorantes FM y técnicas electrofisiológicas, se han demostrado que el número de vesículas recicladas por botón sináptico, así como el número de vesículas que se liberan, aumentan con la maduración sináptica (Mozhayeva et al., 2002; Mohrmann et al., 2003)

Mozhayeva y colaboradores (Mozhayeva et al., 2002) estudiaron la evolución del número de vesículas en relación al tiempo de cultivo en neuronas piramidales de hipocampo, mediante el empleo del colorante FM 2-10, electrofisiología y microscopía electrónica. El empleo del colorante FM 2-10 reveló que el número de vesículas que componen el depósito de reciclaje aumenta en casi dos órdenes de magnitud con la maduración sináptica, en donde las neuronas de 5 DIV presentaron un reciclaje de vesículas lento, en comparación con las neuronas de 12 DIV. Además las neuronas inmaduras presentaron pocas o ninguna vesícula formando parte del RRP. Estos autores también observaron un incremento gradual de las vesículas sinápticas con el tiempo, en donde el RRP se formaría primero y las vesículas del depósito de vesículas se formarían por último. Las neuronas inmaduras (5 DIV) presentaron escasa o nula respuesta frente a la generación de potenciales de acción, incrementando gradualmente la respuesta frente a una estimulación de 30 Hz a partir de los 7 DIV. Paralelamente, estudiaron la organización ultraestructural de las vesículas sinápticas mediante microscopía electrónica, observando que en los terminales presinápticos de las neuronas inmaduras, las vesículas se aprecian mayormente dispersas y sin asociarse ni con la membrana plasmática ni con la zona activa, sin embargo, las

neuronas maduras mostraron un incremento sustancial en el número total de vesículas, así como en el número de vesículas ancladas a la zona activa.

Mohrmann y colaboradores (Mohrmann et al., 2003), realizaron un estudio de la maduración de las vesículas sinápticas en microcultivos de neuronas de la corteza cerebral. Mediante el uso del colorante FM 1-43 observaron que las neuronas excitatorias inmaduras (5-7 DIV) mostraban una señal de fluorescencia débil, indicando un bajo número ó una falta de vesículas sinápticas en el terminal presináptico, hecho que cambiaba en las neuronas maduras (14-18 DIV). Las neuronas maduras mostraron una señal de fluorescencia intensa en los terminales presinápticos, indicando que al madurar el botón sináptico incrementa el número de vesículas sinápticas. Conjuntamente, describieron que las neuronas inmaduras presentaban un tamaño de RRP más pequeño, el cual requería de un mayor tiempo para reciclarse, respecto al de las neuronas maduras. Por último, los investigadores evaluaron la respuesta sináptica de las neuronas inmaduras y maduras, frente a un tren de estímulos de alta frecuencia (50 estímulos a 20 Hz), con un tiempo de intervalo de 30 segundos entre cada estimulación, con lo cual observaron que si bien tanto las neuronas inmaduras como las maduras presentaban una depresión progresiva de la respuesta frente al tren de estímulo como consecuencia del agotamiento del RRP, las neuronas inmaduras desarrollaban una disminución progresiva en la amplitud de la respuesta frente cada tren de estímulos. Sin embargo, las neuronas maduras presentaban una respuesta reproducible en cada tren de estímulos aplicados, indicando que las sinapsis glutamatérgicas aumentan la eficacia sináptica, a medida que las sinapsis maduran.

Los resultados obtenidos por Mozhayeva y colaboradores, así como los obtenidos por Mohrmann y colaboradores, sugieren que el incremento en el número de vesículas ocurre progresivamente, por lo que Mozhayeva y colaboradores propusieron un modelo para explicar la maduración de los depósitos de vesículas (Mozhayeva et al., 2002), consistente en tres etapas de desarrollo, representadas en la figura 15. Según este modelo en el estado inicial, las vesículas sinápticas se acumulan para formar el depósito de reciclaje, el cual permite a la sinapsis liberar neurotransmisores a frecuencias de estimulación moderadas. En el segundo estado del modelo, se formaría el depósito de vesículas correspondientes al RRP en adición al depósito de vesículas de reciclaje, y finalmente en la última etapa o estado 3, se formaría el depósito de vesículas de reserva.

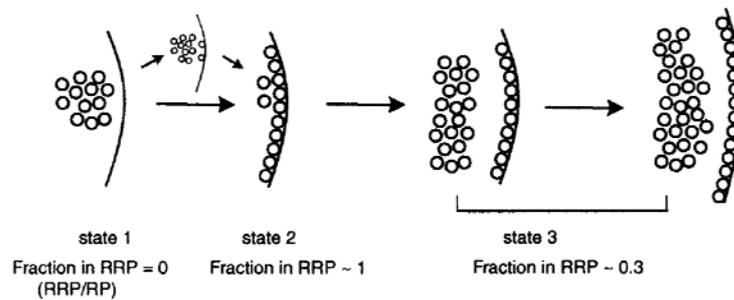


Figura 15. Modelo de la formación de los depósitos de vesículas durante el desarrollo de la sinapsis. En el primer estado, las vesículas formarían un depósito de reciclaje con ausencia de vesículas ancladas a la zona activa. El segundo estado, muestra un estado transitorio en donde la mayoría de las vesículas se encuentran ancladas a la zona activa. La transición hacia este estado puede estar formada por estados intermedios estables, mostrado por las flechas pequeñas. Para alcanzar el tercer estado, el número de vesículas sinápticas se incrementa para formar el depósito de reserva. En los estados tardíos del desarrollo, los tamaños del RRP y del depósito de reciclado crecen en paralelo. Modificado de Mozhayeva y colaboradores, 2002 (Mozhayeva et al., 2002).

Adicionalmente, se ha descrito que los terminales presinápticos inmaduros, pero no los maduros, de neuronas de hipocampo en cultivo requieren de F-actina para prevenir la dispersión de sus componentes (Zhang and Benson, 2001). En este estudio, los investigadores observaron que las neuronas en cultivo de 5 DIV, al ser tratadas con latrunculina-A, presentaban una dispersión tanto de la proteína vesicular sinaptofisina, como de la proteína Bassoon, un marcador del citoesqueleto de la zona activa, desde el terminal presináptico hacia los procesos neuronales. Por el contrario, las neuronas de 12 DIV mantenían la colocación de ambas proteínas en el terminal presináptico, demostrando que la estabilidad sináptica en los botones maduros es independiente de F-actina (Zhang and Benson, 2001).

6.2 Moléculas de adhesión celular, red perineuronal y maduración sináptica

Hasta este punto hemos descrito que tanto los componentes de la red perineuronal y como la expresión de las proteínas matricelulares experimentan cambios durante el desarrollo neuronal, los cuales ejercen un efecto sobre la formación y plasticidad sináptica. La acción de estas moléculas pueden ocurrir a través de su interacción con moléculas de adhesión celular, por lo que en la búsqueda de los mecanismos que controlan los cambios observados en la maduración sináptica se ha prestado especial atención a las moléculas de adhesión celular presentes en la sinapsis, encontrándose que las CAM participan en el desarrollo de la sinapsis (Brose, 1999). En este apartado se describirán las evidencias experimentales que indican la importancia de tres

conjuntos de moléculas CAM en la maduración sináptica: las neurexinas, las neuroliginas, la proteína de adhesión sináptica SynCAM y las cadherinas.

El descubrimiento de las moléculas neurexinas (NX) en el terminal presináptico de los vertebrados (Ushkaryov et al., 1992; Ushkaryov and Südhof, 1993) y de las neuroliginas (NL) en el postsináptico (Ichtchenko et al., 1995), así como la interacción entre estas dos moléculas, proporcionó uno de los primeros indicios de cómo se establece el contacto sináptico a nivel molecular (Brose, 1999).

Las neurexinas y neuroliginas son proteínas de transmembrana que consisten en una región extracelular responsable de la interacción trans-sináptica, un dominio transmembrana simple y un dominio citoplasmático pequeño involucrado en las interacciones proteína-proteína y en la señalización intracelular (Craig and Kang, 2007; Südhof, 2008). La familia de las neurexinas consiste en tres miembros, NX1-3, los cuales se expresan en una isoforma α , o una isoforma β más corta, en donde estas isoformas contienen una secuencia de aminoácidos diferentes en la región extracelular amino terminal, pero con una región transmembrana y una región citoplasmática idénticas (Südhof, 2008). En ratones se han caracterizado cuatro isoformas de NL, en donde NL-1 se localiza en las sinapsis excitatorias y NL-2 en las inhibitorias, NL-4 se distribuye en las sinapsis inhibitorias de la retina, en la médula espinal y en el cerebro, incluyendo sinapsis excitatorias en el hipocampo y en la corteza cerebral, y NL-3 en neuronas en cultivo, distribuyéndose en sinapsis excitatorias e inhibitorias (Song et al., 1999; Chih et al., 2005; Budreck and Scheiffele, 2007; Chubykin et al., 2007; Levinson et al., 2010; Hoon et al., 2011).

Las primeras evidencias de la función que tiene la interacción entre NX-NL, se obtuvieron de la expresión heteróloga de NX y NL en células no neuronales en co-cultivo con células neuronales HEK293. La evidencia de la función de NL se obtuvo con el trabajo realizado por Scheiffele y colaboradores (Scheiffele et al., 2000), quienes caracterizaron que la sobreexpresión de NL en células no neuronales induce la formación de contactos entre las neuronas y las células no neuronales. Los terminales presinápticos que contactaban con las células no neuronales exhibieron una acumulación de sinapsina, sinaptofisina y sinaptotagmina, además de la capacidad de excitar las vesículas sinápticas. Adicionalmente, el estudio con microscopía electrónica mostró que estos terminales presinápticos poseían agrupaciones de vesículas sinápticas. Por

último, los investigadores demostraron que la adición de β -NX, inhibe la actividad inducida por la sobreexpresión de NL-1 (Scheiffele et al., 2000).

La sobreexpresión de NL en las neuronas hipocampales aumentó el número y la densidad de las sinapsis, en donde NL-1 incrementó las sinapsis excitatorias y NL-2 las inhibitorias, a su vez se apreció un aumento de la respuesta sináptica mediada por los receptores AMPA y NMDA (Chih et al., 2005; Chubykin et al., 2007), mientras que la inhibición selectiva de NL-1, mediante RNA de interferencia, tuvo el efecto contrario (Chih et al., 2005). Por otra parte, la sobreexpresión de β -NX en células PC12 y HEK293 indujo la diferenciación postsináptica, evidenciada por la acumulación de proteínas que conforman la densidad postsináptica, así como por el reclutamiento de subunidades de los receptores GABA y NMDA en las dendritas que contactaron con fibroblastos que sobreexpresaban neurexina (Graf et al., 2004; Nam and Chen, 2005).

A pesar de las evidencias que muestran los trabajos anteriores, estos efectos no se observan *in vivo*, ya que los ratones KO para las α -NX (Missler et al., 2003) o para NL 1-3 (Varoqueaux et al., 2006), no presentan una disminución en el número total de sinapsis formadas en el cerebro. Los ratones KO para neurexinas se han realizado para las tres α -NX, los cuales a pesar de ser viables, mueren por problemas respiratorios dentro de las 24 horas siguientes tras el parto. Las sinapsis excitatorias presentan una ultraestructura normal, sin apreciarse diferencias en el tamaño de la zona activa, ni en el número o tamaño de las vesículas sinápticas, sin embargo, estos animales presentan un menor número de sinapsis inhibitorias. Adicionalmente, estos animales presentan una disminución en la neurotransmisión debido a una disfunción de los canales de calcio (Missler et al., 2003). Los ratones KO para NL 1-3, al igual que los ratones triple KO para α -NX, presentan problemas respiratorios y mueren dentro de las 24 horas siguientes tras el parto. En los animales KO no se observa un cambio en el número total de sinapsis, respecto a los ratones control, pero sí muestran una disminución en la neurotransmisión (Varoqueaux et al., 2006), por lo que en términos generales, y de acuerdo al fenotipo observado en los ratones KO, las NX y las NL participan en la estabilización de la sinapsis más que en su formación (Chubykin et al., 2007).

Por otra parte, la sobreexpresión de NL-1 en neuronas en cultivo, incrementó la probabilidad de liberación, el reciclado de las vesículas sinápticas y el tamaño del RRP, induciendo la maduración estructural y funcional del terminal presináptico (Futai et al., 2007; Ko

et al., 2009; Wittenmayer et al., 2009). Wittenmayer y colaboradores observaron que neuronas de 5 DIV que sobre-expresaban NL-1 presentaban características comparables a neuronas control maduras, de 18 DIV. Adicionalmente, observaron que neuronas en cultivo obtenidas de ratones *KO* para NL-1, mostraron que la estabilidad del botón sináptico es dependiente de F-actina, y que el tamaño de depósito de vesículas de reciclaje era comparable al de neuronas control de 5 DIV, indicando un defecto específico en la maduración de las neuronas deficientes en NL-1.

Una segunda molécula de adhesión que se ha sido caracterizada como importante para la maduración de los contactos sinápticos es la proteína de adhesión sináptica o SynCAM (por su acrónimo del inglés *Synaptic Cell Adhesion Molecule*), también conocida como Cadm1 y como *nectin-like molecule 2* (Biederer et al., 2002), la cual se expresa en el sistema nervioso en desarrollo y en el adulto (Biederer, 2006; Thomas et al., 2008; Triana-Baltzer et al., 2008).

La proteína SynCAM-1 se distribuye en las membranas presinápticas y postsinápticas y su expresión en las neuronas puede ser determinada antes de la formación de los contactos sinápticos. Al igual que las NL, la sobreexpresión de SynCAM-1 en células no neuronales (COS-7 y HEK 293) en co-cultivo con neuronas hipocampales, induce la formación de los terminales presinápticos así como el reclutamiento de las vesículas sinápticas en el terminal, favoreciendo la formación del depósito de vesículas de reciclaje (Biederer et al., 2002; Sara et al., 2005b; Stagi et al., 2010; Fogel et al., 2011). Asimismo, SynCAM promueve la formación del terminal presináptico e incrementa el número de sinapsis excitatorias, pero no las inhibitorias, en neuronas de hipocampo tanto *in vitro* como *in vivo* (Biederer et al., 2002; Sara et al., 2005b; Fogel et al., 2007; Robbins et al., 2010). Los ratones *KO* para SynCAM-1 presentan una disminución en el número de sinapsis excitatorias, observándose un menor tamaño de la densidad postsináptica y de la zona activa, respecto al de los ratones controles nativos (Robbins et al., 2010). Considerando estos resultados, podemos decir que las proteínas SynCAM favorecen la maduración del terminal presináptico favoreciendo la formación de los contactos sinápticos y el reclutamiento inicial de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico, participando en la primera etapa de la formación de los depósitos de vesículas representado en la figura 15. Además, podemos decir que la expresión de las proteínas SynCAM coincide con el período en el cual se expresan los componentes tempranos de la red perineuronal.

La tercera proteína CAM que participa en la maduración de los terminales presinápticos son las cadherinas, una familia de moléculas de adhesión compuesta por más de 80 miembros dependiendo de la especie, los cuales se clasifican en distintas subfamilias que incluyen las cadherinas clásicas y las protocadherinas, entre otros (Yagi and Takeichi, 2000). En los vertebrados, la familia de las cadherinas clásicas está compuesta por aproximadamente 20 miembros, en donde cada uno de los cuales es expresado por un grupo restringido de neuronas, que se encuentran conectadas entre ellas, limitando su expresión a regiones específicas del cerebro, en donde la N-cadherina es el miembro más estudiado. (Suzuki et al., 1997; Inoue et al., 1998; Benson et al., 2001; Hirano et al., 2003).

La N-cadherina se acumula en la sinapsis después del contacto axodendrítico inicial (Benson and Tanaka, 1998), y se distribuye uniformemente por todo el espacio sináptico durante la formación de la sinapsis, para posteriormente distribuirse en agrupaciones discretas dentro del espacio sináptico de las neuronas maduras (Yamagata et al., 1995; Uchida et al., 1996; Togashi et al., 2002; Elste and Benson, 2006).

La importancia de N-cadherina en la maduración del terminal presináptico fue determinada por los trabajos que muestran que si bien la N-cadherina no induce la formación de sinapsis (Scheiffele et al., 2000; Jüngling et al., 2006), la inhibición de esta proteína incrementa el número de dendritas con una morfología inmadura, reduce el número de vesículas sinápticas, las cuales experimentan un menor reciclado, lo que se traduce en que las vesículas que conforman el RRP requieren más tiempo para recuperarse tras una estimulación (Murase et al., 2002; Togashi et al., 2002; Bamji et al., 2003; Abe et al., 2004; Jüngling et al., 2006; Vituriera et al., 2012). Los análisis de los terminales presinápticos por microscopía electrónica reveló que si bien los botones mostraban una morfología comparable al de las neuronas control, los terminales presinápticos con N-cadherina inhibida presentaban una disminución en torno al 50% del número total de vesículas sinápticas y del número de vesículas ancladas a la zona activa (Vituriera et al., 2012), efectos que en las neuronas *KO* para N-cadherina, diferenciadas desde células madres, se traduce en un incremento de la depresión a corto plazo (Jüngling et al., 2006).

La N-cadherina estaría induciendo la maduración del terminal presináptico a través de una comunicación trans-sináptica, debido a que la inhibición de N-cadherina postsináptica es suficiente para observar los cambios a nivel presináptico (Jüngling et al., 2006; Vituriera et al., 2012). El mecanismo de acción pasaría, en parte, por una cooperación entre N-cadherina y NL1

(Stan et al., 2010; Aiga et al., 2011). Estudios recientes han demostrado que N-cadherina y NL1 colocalizan en las sinapsis excitatorias, en donde primero se acumula N-cadherina en los contactos sinápticos, la que luego induce el reclutamiento de NL1 hacia la sinapsis, observándose esta capacidad solamente en las sinapsis inmaduras (Aiga et al., 2011). El mecanismo por el cual N-cadherina recluta NL1 hacia la sinapsis está mediado por la interacción de N-cadherina con la molécula de anclaje S-SCAM (Stan et al., 2010). La cooperación entre estas dos proteínas se corroboró al inhibir selectivamente la N-cadherina, situación en la cual NL1 perdió su efecto sobre el reclutamiento de las vesículas sináptica, la probabilidad de liberación y la frecuencia de actividad espontánea mediados por los receptores de AMPA (Stan et al., 2010). Estudios previos a estas observaciones refuerzan este planteamiento ya que la proteína β -catenina, proteína que se une a las cadherinas, interacciona con S-SCAM en la densidad postsináptica (Nishimura et al., 2002; Iida et al., 2004).

Considerando los resultados, podemos afirmar que las moléculas de adhesión celular presentes en la sinapsis tendrían una función diferenciada en la formación y maduración de la sinapsis. A falta de estudios sobre la escala temporal en la cual estas moléculas actúan sobre la maduración del terminal presináptico y considerando las evidencias experimentales, la acción de estas CAM sobre la formación y maduración del botón sináptico se podría simplificar en un proceso consistente en tres etapas (figura 16). En la primera etapa, la proteína SynCAM induciría la formación de los contactos sinápticos, tras lo cual comenzaría el reclutamiento de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico. En la segunda etapa, la N-cadherina se distribuirían uniformemente por todo el espacio sináptico, reforzando la acumulación de vesículas sinápticas en el terminal presináptico e iniciando el reclutamiento de neuroliquina en el terminal postsináptico. En la tercera etapa, las cadherinas se concentrarían en agrupaciones discretas distribuidas dentro del espacio sináptico y las neuroliquinas interaccionarían con las neurexinas, favoreciendo el crecimiento de los depósitos de vesículas en el terminal presináptico y la maduración estructural y funcional de las sinapsis, en donde la presencia de NL-1 o NL-2 induciría la formación de una sinapsis excitatoria o inhibitoria, respectivamente. Paralelamente, la diferenciación presináptica y postsináptica ocurriría entre la segunda y tercera etapa, con la incorporación de los elementos que conforman la zona activa, tales como proteínas del citoesqueleto y los canales iónicos, y la incorporación de los receptores de los neurotransmisores, subunidades auxiliares y otros componentes de la densidad postsináptica.

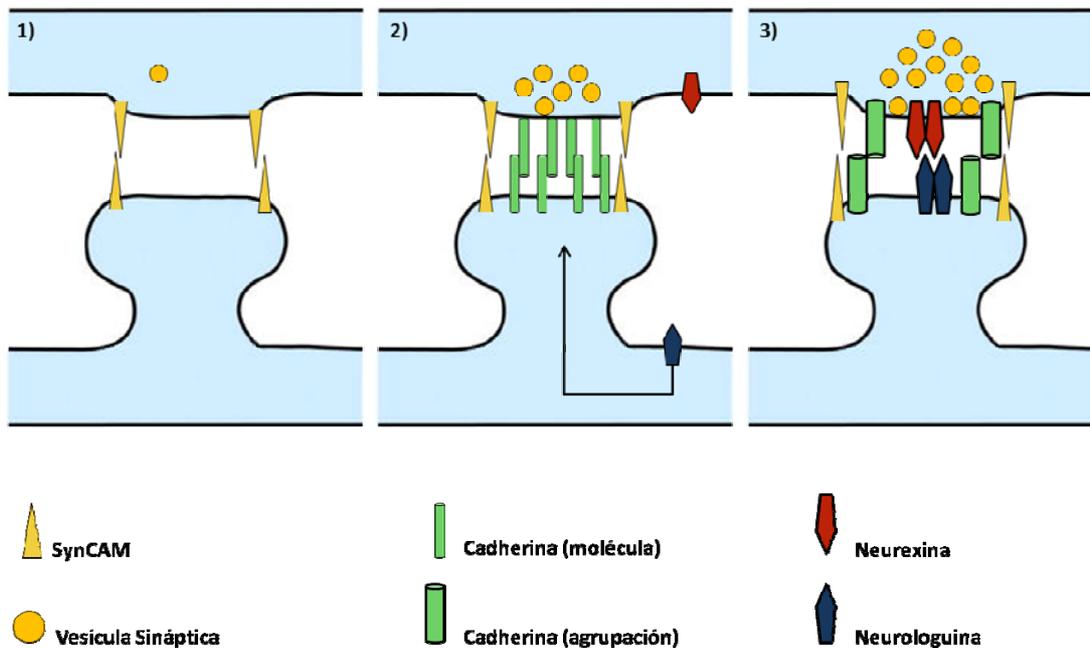


Figura 16. Modelo de maduración sináptica mediada por las moléculas de adhesión celular. Modelo propuesto para las moléculas de adhesión celular presentes en la sinapsis y que mediarían la formación y maduración de la sinapsis en un proceso simplificado en tres etapas. **1)** La molécula SynCAM interviene en la formación de los contactos sinápticos iniciales y en el reclutamiento inicial de vesículas sinápticas hacia el terminal presináptico. **2)** La N-cadherina se incorpora al contacto sináptico, distribuyéndose uniformemente y favoreciendo el reclutamiento de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico y de las neuroliquina en el terminal postsináptico. **3)** Las N-cadherinas formarían agrupaciones que se distribuirían discretamente en el espacio sináptico, mientras que la interacción entre neuroliquina y neurexina refuerza la incorporación de las vesículas sinápticas, incrementando los depósitos de vesículas, e induce la diferenciación sináptica

Los antecedentes hasta ahora expuestos nos indican que en el proceso de maduración sináptica participarían los componentes de la red perineuronal y las CAM, planteándose la posibilidad de una interacción entre las CAM y la red perineuronal. Debido a que la formación de la sinapsis es un proceso dinámico, para comprender la función de esta interacción en la maduración del terminal presináptico hacen falta más estudios, por lo que a continuación se presenta un resumen pocas evidencias del papel funcional de esta interacción durante la maduración sináptica.

En el sistema nervioso central, el período de actividad sinaptogénica varía según la región, ocurriendo durante las primeras tres semanas postnatales (Miller and Peters, 1981; Sutor and Luhmann, 1995; De Simoni et al., 2003; Waites et al., 2005; Lively and Brown, 2008). Durante este período la expresión de las moléculas de la red perineuronal y de las proteínas matricelulares es variable, las cuales se resúmen en la figura 17. En los primeros días postnatales (P0-P7), se expresan las moléculas tempranas de la red perineuronal. En este período la red perineuronal aún no se ha establecido, por lo que la matriz extracelular es permisiva y permite la migración celular,

el crecimiento axonal, la sinaptogénesis y el remodelamiento de los contactos sinápticos, así como la difusión de los componentes sinápticos. Entre los días P7-P14, los componentes tempranos de la red perineuronal son reemplazados por moléculas homólogas y comienza la formación de la red perineuronal, la que participaría en la estabilización de los contactos sinápticos, limitando la difusión lateral de los componentes de la sinapsis. La posibilidad de que la MEC ejerza un rol activo en la sinaptogénesis viene dado por un estudio, realizado en pollo, ha determinado que el versicano V0 promueve la diferenciación presináptica de los axones de las células ganglionales de la retina, mediante el reclutamiento de vesículas sinápticas (Yamagata and Sanes, 2005).

Las proteínas secretadas por la glía participan en la maduración sináptica en un proceso paralelo a la formación de la red perineuronal. Dentro de estas proteínas se encuentran los glicano-4 y -6 y las proteínas matricelulares TSPs, hevin y SPARC. Las proteínas matricelulares poseen un perfil de expresión diferenciado en el tiempo y unas acciones sobre la sinaptogénesis diferenciada. Para poder poner la acción de estas proteínas en el contexto de la maduración sináptica, y debido a la falta de información existente sobre la acción de estas proteínas sobre la maduración del terminal presináptico, se ha tomado como referencia la escala temporal de expresión de la red perineuronal.

En los modelos animales de ratón, las TSPs son las primeras proteínas matricelulares en alcanzar el nivel de máxima expresión, entre los días P5 – P10, coincidiendo con el período de transición entre la red perineuronal inmadura y la formación de la red perineuronal. Hevin se expresa entre los días P1 y P21 dependiendo de la región estudiada, alcanzando la máxima expresión a P15, coincidiendo con el período de formación de la red perineuronal. Las TSPs y hevin inducen la formación de nuevos contactos sinápticos con una ultraestructura normal pero funcionalmente silentes, indicando que estas proteínas serían necesarias para la formación inicial del terminal presináptico, pero no para la diferenciación postsináptica. Por otra parte, la proteína matricelular SPARC se expresa entre P1 y P20, pero la acción de esta proteína en la maduración sináptica no ha sido estudiada en profundidad, por lo que en este trabajo buscamos ampliar este conocimiento y así obtener una visión más amplia de este cuadro resumen (fig. 17).

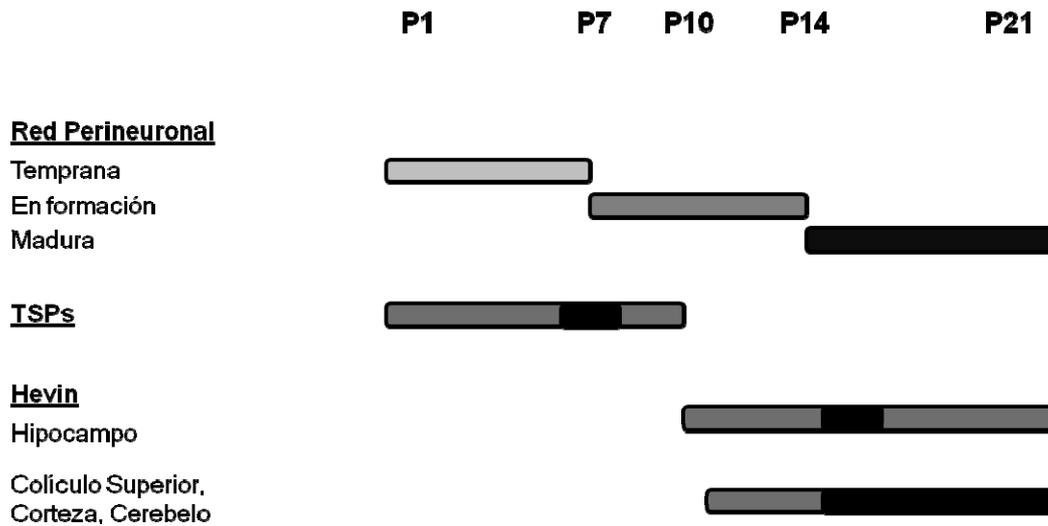


Figura 17. Representación esquemática de la expresión postnatal de la red perineuronal, TSPs, Hevin y SPARC. Las barras negras representan el período de máxima expresión, las barras grises representan un incremento o una disminución en el nivel de expresión dependiendo si se representan antes o después del nivel máximo de expresión, respectivamente.

Como se puede deducir de los datos anteriormente expuestos en el transcurso de esta introducción, existen diversas moléculas de la MEC que poseen un efecto sobre la maduración y la plasticidad sináptica, cuyo estudio se ha centrado principalmente desde un punto de vista postsináptico, quedando pendiente el estudio en mayor profundidad de los cambios en el terminal presináptico. Durante el desarrollo de esta tesis caracterizaremos el efecto de SPARC sobre un tipo de sinapsis colinérgica: las sinapsis autápticas formadas en cultivo por neuronas del ganglio cervical superior. Como se detalla a continuación, SPARC tiene un efecto característico: mantiene los terminales presinápticos en un estado inmaduro.

OBJETIVOS

“Cuanto más alto coloque el hombre su meta, tanto más crecerá”

Friedrich von Schiller

OBJETIVOS

El objetivo general fue continuar el estudio de las observaciones previas del laboratorio, para comprender el mecanismo molecular por el cual las células de la glía periférica modifican la plasticidad sináptica de las sinapsis autápticas nicotínicas. Para llevar a término este objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) *Caracterización del fenotipo de las células gliales periféricas en cultivo.*
- 2) *Puesta a punto de un sistema de detección, identificación y cuantificación de proteínas secretadas por las células de la glía periférica en cultivo.*
- 3) *Estudio de la expresión en el ganglio cervical superior de la proteína de interés.*
- 4) *Estudio del efecto de la(s) proteína(s) identificada(s) sobre los depósitos de vesículas sinápticas y la plasticidad sináptica a corto plazo.*
- 5) *Estudio de la secreción de la proteína de interés durante el desarrollo postnatal.*

MATERIALES Y MÉTODOS

“De hombres es equivocarse; de locos persistir en el error”

Marco Tulio Cicerón

MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos planteados se emplearon cultivos primarios de neuronas y de células de Schwann obtenidas del ganglio cervical superior de rata, así como líneas celulares no neuronales. En los microcultivos autópticos de las neuronas aisladas del ganglio cervical superior, una neurona individual hace contactos consigo misma, formando un circuito monosináptico. En este tipo de circuito, una misma neurona presenta el componente presináptico y el postsináptico, permitiendo así estudiar la actividad sináptica con un solo electrodo de registro (Perez-Gonzalez et al., 2008). Con este sistema se evita la interferencia de otras neuronas en el circuito sináptico, facilitando la interpretación de los resultados obtenidos. Los microcultivos se establecen a partir de neuronas obtenidas del ganglio cervical superior, debido a que contrariamente a las neuronas del SNC, las neuronas del SCG requieren solamente NGF para crecer, permitiendo así la obtención de microcultivos de neuronas en ausencia de células gliales. Esta característica hace que sea una preparación única para el estudio de la interacción neurona-glia y de la acción de los factores secretados por las células gliales sobre la neurotransmisión.

En este apartado se explican las metodologías usadas para llevar a cabo los objetivos planteados, detallándose principalmente aquellas puestas a punto en el laboratorio de Neurobiología. Las técnicas de uso más frecuente en un laboratorio de biología celular, tales como cultivo de líneas celulares, inmunofluorescencia y *Western blot* se explican brevemente en este apartado, pero quedan detalladas en el anexo de protocolos.

1 Microcultivo de neuronas del ganglio cervical superior

Los cultivos primarios de neuronas se realizan de acuerdo al protocolo desarrollado en el laboratorio de Neurobiología (Perez-Gonzalez et al., 2008; Pérez González, 2011). Las neuronas se obtuvieron del SCG de ratas albinas Sprague-Dawley entre las edades postparto P0-P2. El procedimiento fue aprobado por el Comité Ético de la Generalitat de Catalunya (DMAH #5131).

Para el cultivo primario de neuronas, se emplearon los siguientes materiales y soluciones (figura 18-19, tabla 5):

Material quirúrgico:

- a) Pinzas *Dumont Tweezers #55* (ref: 14099, World Precision Instruments Ltd, Gran Bretaña).
- b) Tijeras *Superfine Vannas* punta recta 8 cm de largo (World Precision Instruments Ltd, Gran Bretaña, ref: 501778).
- c) Tijeras *McPherson-Vannas* punta curva 12 cm de largo (World Precision Instruments Ltd, Gran Bretaña, ref: 503364).

Material	Casa Comercial	Referencia
Cubreobjetos de 15 mm de diámetro	Thermo Scientific, Alemania	
Placa para cultivo celular de 12 pocillos estéril	TPP, Suiza	92012
Placas de Petri no estériles de 5,5 cm de diámetro		
Placa de Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro estéril	TPP, Suiza	93100
Pipetas Pasteur de vidrio esterilizadas, modificadas		
Jeringa de tres cuerpos estéril de 1 mL con aguja	Rubilabor, España	141.2001A
Cámara de Neubauer		
Frasco atomizador 12 ml	Muji, Barcelona, www.muji.es	4945247030495
Tubo de centrifuga de 15 mL		
Tubo Eppendorf de 1,5 mL		

Tabla 5. Materiales empleados en el cultivo primario de neuronas



Figura 18. Material quirúrgico usado en la disección.

- A) Pinzas *Dumont Tweezers #55*.
- B) Tijeras *Superfine Vannas*, punta recta 8 cm de largo.
- C) Tijeras *McPherson-Vannas*, punta curva 12 cm de largo.

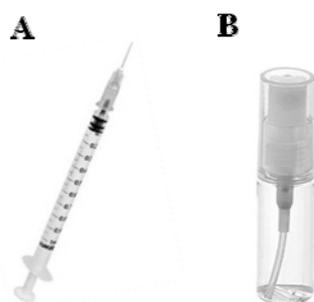


Figura 19. Jeringa de tres cuerpos y frasco atomizador. A) Jeringa de tres cuerpos, empleada para la resuspensión y disgregación de las neuronas B) Frasco atomizador de 12 ml, empleado para la formación de gotas de colágeno sobre cubreobjetos cubiertos con agarosa.

Soluciones:

- Tampón fosfato salino (PBS) estéril (ver soluciones, S4).
- Solución de colágeno (ver anexo I).

Medio de cultivo de pre-incubación	Medio de cultivo neuronal
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM:F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033) • 20% (v/v) Suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen) • Sin antibióticos 	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM:F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033) • 2,5% (v/v) FBS (Invitrogen) • 2,5% (v/v) Suero de rata (RS)*. • 0,5 µg/mL NGF-7S (Alomone Labs, Israel)[§]. • 2 ng/mL CNTF (Alomone Labs, Israel) [§], adicionados a partir del segundo cambio de medio. • 1% (v/v) Penicilina-Estreptomicina (ref: P0781, Sigma-Aldrich). La solución comercial con 0.9% NaCL, cada mL de solución contiene 10.000 unidades Penicilina / 10 mg Estreptomicina.

* RS es facilitado por el estabulario del Campus de Medicina de Bellvitge, Universidad de Barcelona.

[§] La adición de los factores de crecimiento al medio de cultivo, se realiza inmediatamente antes de efectuar el cambio de medio

Antes de la extracción de los SCG, los materiales de disección se esterilizan bajo luz ultravioleta durante una hora y las crías de ratas, de una misma camada, se anestesian en un baño de hielo por 15 minutos. La extracción del SCG se realiza bajo lupa de disección, en campana de flujo laminar (Nuair, modelo UN-201-330E) a temperatura ambiente. Durante la disección, la cría de rata se mantiene fría (4 – 8° C), para asegurar la anestesia durante todo el proceso. La disección comienza con una incisión en forma de “Y” invertida al nivel de la tráquea, con las tijeras *McPherson-Vannas*, exponiéndose las glándulas salivares. Con las pinzas se diseccionan

las glándulas salivares, dejando visible el músculo esternocleidomastoideo a ambos lados de la tráquea. A continuación se eliminan los tejidos adyacentes a ambos músculos, para dejar visible las arterias carótidas de ambos lados de la tráquea. El SCG se ubica por debajo de la bifurcación de esta arteria. Con la ayuda de la tijera *Superfine Vannas*, se retira conjuntamente la arteria carótida y el SCG, poniéndose en PBS estéril en una placa de Petri de 5,5 cm de diámetro a 4° C.

Al finalizar la extracción de los ganglios de 10-12 crías de ratas, la arteria carótida y el ganglio nodoso se separan del SCG y se retira la cápsula de tejido conectivo del SCG, para reducir la presencia de fibroblastos en el cultivo. Los SCG limpios se pasan a una placa de Petri de 5,5 cm de diámetro con PBS estéril.

Los ganglios así obtenidos, se ponen en 1 mL de solución de 2,5 mg/mL de colagenasa tipo IA en PBS estéril, a 37° C durante 10 minutos, en un tubo eppendorff de 1,5 mL. Finalizado este período, se elimina la colagenasa, quedando los SCG en el fondo del eppendorff, y se añade 1 mL de solución de 0,05% Tripsina-EDTA (Gibco®, ref: 25300-62), durante 20 minutos a 37° C. Tras este tiempo, se retira la solución de Tripsina-EDTA y se adiciona 1 mL del medio de pre-incubación para inactivar la actividad enzimática. A continuación, los SCG se traspasan a un tubo de centrifuga estéril de 15 mL y se disgregan mecánicamente haciéndolos pasar repetidamente por las pipetas Pasteur a las cuales se les ha reducido previamente el diámetro mediante un mechero Bunsen.

Una vez disociadas las neuronas, éstas se traspasan a una cápsula de Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro, que contiene 10 mL de medio de pre-incubación. La placa se deja durante 60-90 minutos en incubador a 37° C y 8% CO₂, para así eliminar las células gliales. A mayor tiempo de pre-incubación, habrá menor número de células gliales en el cultivo resultante, en donde 90 minutos de pre-incubación resultan en un cultivo con una presencia de células gliales prácticamente nula.

Transcurrido este paso intermedio, se recoge el medio, se transfiere a un tubo de centrifugación de 15 mL y se centrifuga durante 2 minutos a 200g a temperatura ambiente. Terminada la centrifugación, se retira el medio sobrenadante, el precipitado celular se resuspende con 1 mL de medio de cultivo (ver más adelante) empleando las pipetas Pasteur modificadas y se transfieren a un eppendorff de 1,5 mL. El número total de neuronas se calcula mediante una cámara de Neubauer. El medio que contiene las células en suspensión se hace pasar tres veces por

una jeringa estéril de 1 mL y las neuronas se resuspenden en el medio de cultivo a una concentración final de 2.500 neuronas/mL de medio de cultivo.

Finalmente, en el frasco atomizador, se realiza la mezcla de colágeno y RPMI 10x determinada previamente (ver preparación de colágeno, anexo I) y se rocía sobre los cubreobjetos pre tratados con la solución de agarosa al 0,15% en agua mQ (ver soluciones, S1 y S2). Los cubreobjetos se encuentran en una placa de 12 pocillos. Para obtener unas gotas de colágenos adecuadas para los microcultivos, la solución de colágeno se debe rociar desde una distancia de unos 30-45 cm aproximadamente y disponer el atomizador unos 5 cm más alto respecto a la placa de cultivo. El colágeno se rocía en uno o dos pulsos, sobre una mitad primero, para finalizar con uno o dos pulsos sobre los cubreobjetos restantes, evitando la pulverización excesiva. Una vez que las gotas de colágeno se comienzan a tornar de un color blanco, a cada pocillo se le añade 1 mL de medio de cultivo con las neuronas en suspensión, antes de que las gotas de colágeno adquieran una tonalidad blanca por completo, que es indicativo que el colágeno se ha secado. Este paso es importante, porque las gotas de colágeno se deforman cuando éste se seca.

Transcurridos dos o tres días del establecimiento del cultivo neuronal, el medio de cultivo se reemplaza parcialmente. Basándonos en estimaciones previas del laboratorio, se asume que el uso constante del incubador provoca una evaporación de unos 100 μ L/día, por lo que de cada pocillo se retiran 400 μ L de medio, y se adicionan 600 μ L. En este cambio de medio se adiciona NGF 7-S y el factor de crecimiento CNTF. La concentración de los factores de crecimientos en el medio de cultivo fresco, es la necesaria para que alcancen una concentración final de 500 ng/ml de NGF 7-S y de 2 ng/mL de CNTF por pocillo. En el caso de las neuronas tratadas con SPARC durante su desarrollo, se añade SPARC suficiente para alcanzar una concentración final de 10 ng/ml (\sim 0,24 nM) ó 100 ng/mL (\sim 2,4 nM). El cultivo neuronal se mantiene en estas condiciones entre 2 y 3 semanas. Para disminuir la variabilidad de las respuestas entre los microcultivos, las microislas seleccionadas para ser registradas correspondieron a islas con una gran cantidad de procesos, con un tamaño de entre 100 y 300 μ m aproximadamente, las cuales al ser observadas al microscopio con un objetivo de 40 aumentos se pueden abarcar casi por completo dentro del campo visual (figura 20).

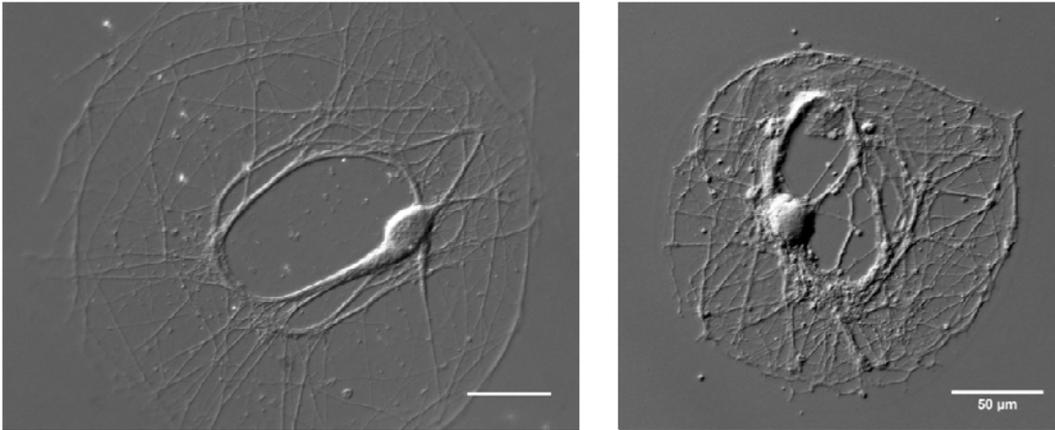


Figura 20. Imágenes de microcultivos SCM representativos empleados para este estudio. Barra de calibración = 50 μm .

2 Cultivo celular masivo

Conjuntamente con los microcultivos de neuronas, durante el desarrollo de este trabajo se establecieron cultivos primarios de glía periférica, así como cultivos de las líneas celulares COS-7 y PYS-2. A continuación se explican los protocolos empleados en el cultivo de estas células.

2.1. Cultivo primario de células de glía periférica

El cultivo de células de glía periférica se realiza siguiendo el mismo protocolo usado para el cultivo de neuronas, pero con algunas modificaciones. Los pasos correspondientes a la extracción y disgregación del SCG se realizan sin ninguna modificación. Una vez obtenido el precipitado celular que contiene neuronas y glía, estas se resuspenden en 1 mL de medio de cultivo para células gliales:

Medio de cultivo para células gliales:

- DMEM : F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (ref: 11320-033, Gibco®).
- 5% (v/v) Suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen).
- 1% (v/v) Penicilina-Estreptomicina (ref: P0781, Sigma-Aldrich).

El número total de células se calcula usando una cámara de Neubauer y se añaden al medio de cultivo necesario para alcanzar una concentración de 10.000 células/mL. De acuerdo al tipo de placa de cultivo empleada, las células se siembran de la siguiente forma:

- a) En placa de cultivo de 12 pocillos, con cubreobjetos sin agarosa. En este caso, la mezcla de colágeno-RPMI se rocía repetidamente sobre los cubreobjetos, hasta observar una película de colágeno en su superficie. Se esperan 5 minutos y se adiciona 1 mL de medio de cultivo por cada pocillo.
- b) En flacones de 25 cm². Para este envase, 2 mL de la solución colágeno-RPMI se adiciona a la placa y se extiende por toda la superficie, se espera 3-5 minutos aproximadamente y se retira el exceso de colágeno. Transcurrido 5-10 minutos, justo antes de que el colágeno se comience a secar, se adicionan 4 mL de medio de cultivo con las células gliales.

Para el mantenimiento del cultivo de glía periférica, se realiza un cambio parcial de medio de cultivo cada 7-10 días. Las células gliales alcanzan la confluencia al cabo de unas 3 semanas aproximadamente.

2.2. Obtención de medios condicionados por células gliales

Los cultivos de células gliales se emplearon para el estudio y caracterización del fenotipo de las células gliales presentes en el cultivo, y para la obtención de medios condicionados enriquecidos en factores secretados por la glía. También se obtuvieron medios de cultivos enriquecidos por líneas celulares

Para la obtención de los medios condicionados, se emplean células gliales o líneas celulares a un 80% de confluencia, aproximadamente. Una vez alcanzada esta confluencia, las células gliales se lavan 3 veces con PBS estéril, temperado previamente a 37° C, tras lo cual se adiciona un medio de cultivo sin suero, de composición definida (SF; del inglés *serum free*). El SF empleado para las líneas celulares, correspondió a DMEM:F12, la composición del SF utilizado en los cultivos de células gliales, se detalla más adelante.

Para las células gliales, el medio condicionado se recoge a los 7 días, el medio condicionado de las líneas celulares, se recoge según se indica en los resultados. Una vez obtenido el medio condicionado, éste se pone en tubo(s) de centrifuga de 15 mL y se centrifuga a 3000 g por 10 minutos, para eliminar los restos celulares. El medio sobrenadante se traspassa a tubos concentradores centricon con un corte nominal de 10 KDa con una capacidad de 4 mL

(Amicon Ultra-4, Millipore, ref: UFC801024) o de 15 mL (Amicon Ultra-4, Millipore, ref: UFC901024) y se centrifugan a 3327 g durante 15-30 minutos, obteniéndose un medio 8-20 veces concentrado. El medio condicionado resultante se guarda a -80° C hasta su posterior uso.

Medio de cultivo sin suero (*serum free*, SF):

- DMEM : F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033).
- Transferrina, 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich, ref: T1283).
- Progesterona, 60 ng/mL (Sigma-Aldrich, ref: P8783).
- Putrescina, 16 µg/mL (100 µM) (Sigma-Aldrich, ref: P5780).
- Insulina, 5 µg/mL (Sigma-Aldrich, ref: I0516).
- Selenito de sodio, 160 ng/mL (30 nM) (Sigma-Aldrich, ref: S5261).
- Triyodotironina, 10 ng/mL (Sigma-Aldrich, ref: T6397).
- Forskolina, 20,5 mg/mL (50 µM) (Calbiochem, ref: 344273).
- Glutamina, 1,4 mM
- Penicilina/Estreptomicina 1%(v/v) (Sigma-Aldrich, ref: P0781).

2.3. Cultivo de líneas celulares

Dentro de este estudio, se emplean dos líneas celulares distintas: células COS-7 y células PYS-2. Estas líneas celulares, como todas las líneas celulares empleadas en investigación, han sido inmortalizadas, pudiendo proliferar indefinidamente cuando se cultivan en condiciones adecuadas.

La línea celular COS-7 (ATCC código CRL-1651™), es una línea celular epitelial de riñón, obtenida del mono *Cercopithecus aethiops*. Esta línea celular se emplea para el estudio del efecto de la secreción directa de SPARC sobre los microcultivos y su consecuencia en la neurotransmisión.

La línea celular PYS-2 (ATCC, código CRL-2745™), es una línea celular epitelial de saco vitelino (*Yolk sac*), obtenida de ratón (*mus musculus*). Esta línea celular se emplea para la obtención de SPARC, dado que se ha demostrado que esta línea celular es una fuente reproducible de SPARC biológicamente activa (Sage, 2003).

Para las líneas celulares, se emplea un medio de cultivo con 10% de suero:

Medio de cultivo para líneas celulares (medio completo):

- DMEM : F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033).
- 10% (v/v) Suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen).
- 1% (v/v) Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, ref: P0781).

El cultivo de las líneas celulares se realiza a partir de alícuotas de células congeladas en nitrógeno líquido. La alícuota se descongela y se transfiere a 5 mL de medio de cultivo con 10% de suero contenido en un flascón de 25 cm². Las células se mantienen en cultivo en un incubador a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se cambia cada 2-3 días. Cuando las células alcanzan la confluencia, se realiza un pase de células para mantener la viabilidad celular. Las líneas celulares se criopreservaron en nitrógeno líquido, en un medio completo con 5 % (v/v) de DMSO.

3 Técnica de inmunofluorescencia

La visualización de proteínas de interés en los microcultivos neuronales, en los cultivos primarios de glía y en los cortes histológicos del SCG se realiza mediante inmunofluorescencia. Las células se fijan en una solución de paraformaldehído al 4% y se permeabilizan con Tritón X100. A continuación se indican los anticuerpos primarios y sus concentraciones:

<u>Anticuerpo Primario</u>	<u>Origen</u>	<u>Concentración</u>	<u>Casa Comercial (referencia)</u>
Anti-S100β	conejo	1: 750	DakoCytomation (Z0311)
Anti-S100β	ratón	1: 500	Abcam (ab8330)
Anti-NICD	conejo	1: 100	Abcam (ab52301)
Anti-MBP	conejo	1: 100	Sigma (M3821)
Anti-Gal C	ratón	1: 100	Millipore (MAB342)
Anti-Bassoon	ratón	1: 1000	Assay Design
Anti-Sinaptofisina	ratón	1: 500	Synaptic Systems (101-011)
Anti-SPARC	cabra	1: 500	R&D Systems (AF942)

Las preparaciones se incuban durante toda la noche a 4° C. Posteriormente las preparaciones se incuban con los anticuerpos secundarios específicos a una dilución 1:500, conjugados con fluorocromos Alexa 488 o Alexa 555 (Molecular Probes). Los núcleos celulares

se marcan con To-Pro 3 (Invitrogen) o con DAPI (Sigma-Aldrich). (Ver anexo I para más detalles).

Según el requerimiento de los experimentos, las muestras se observan en: 1) Microscopio Zeiss, modelo Axio Examiner.A1, acoplado a una cámara AxioCam MRc5. Las imágenes fueron adquiridas con el programa AxioVision versión 4.7. 2) Microscopio confocal Leica TCS-SL (spectral confocal) y las imágenes adquiridas con el programa Leica Confocal Software (LCS), en los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Barcelona.

4 Cuantificación del número de contactos axosomáticos en un microcultivo

La cuantificación de los terminales presinápticos se realiza en aquellas neuronas marcadas para bassoon y sinaptofisina. La cuantificación se realiza mediante el programa gratuito Image J, en secciones de confocal. La sinapsis fue definida como una estructura redonda en donde los dos marcadores colocalizan con un área aparente de 0,3 a 3 μm^2 , la cual está presente en 3 a 5 secciones consecutivas del confocal, lo que abarca aproximadamente 0,9 a 1,5 μm . El procedimiento fue el siguiente:

La región del soma se delimita en la imagen correspondiente al campo claro. Para cada canal se elimina la señal de fondo y se realiza una proyección máxima. Los canales correspondientes a las proyecciones máximas de bassoon y de sinaptofisina, junto con la imagen de una sección de campo claro, se juntan en un solo canal y se contabilizan las colocalizaciones que se encuentran dentro del soma. Para cada sección de confocal, se comprueba que las colocalizaciones identificadas cumplan con los criterios establecidos y aquellos que cumplen estos criterios se contabilizan como sinapsis.

5 Electrofisiología

Los microcultivos permiten generar un potencial de acción y registrar la respuesta postsináptica empleando un único electrodo. El estudio de la neurotransmisión se realiza con la técnica de fijación de voltaje (*Voltage-Clamp*).

5.1. Experimentos de *Patch Clamp*

El voltaje de membrana de las neuronas en microcultivo, se fija a -60 mV y una vez que la neurona se encuentra en la configuración *whole-cell*, se aplica un pulso despolarizante para inducir la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje y así generar un potencial de acción y evocar un potencial postsináptico. Debido a las características del modelo empleado, la corriente de entrada de sodio asociada al potencial de acción y la corriente postsináptica evocada son registradas (figura 21)

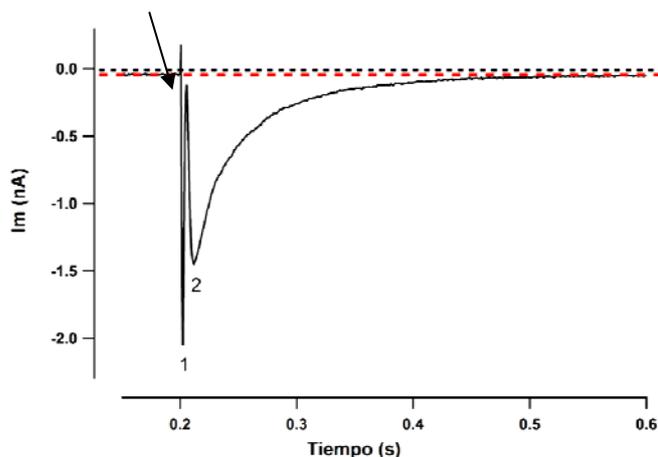


Figura 21. Registro electrofisiológico. Trazo representativo de un registro obtenido en una neurona autóptica, en el modo de fijación de voltaje. **1)** Corriente de entrada de sodio asociada al potencial de acción, generada al aplicar un pulso despolarizante en la neurona (flecha). **2)** Corriente autóptica postsináptica asociada a la entrada de sodio y calcio ligados a la respuesta de los receptores colinérgicos postsinápticos. La corriente basal de la neurona se representa por la línea roja discontinua, valor que se sustrae, ajustando la corriente basal a 0 pA (línea negra discontinua), para así obtener el valor de la corriente evocada. Típicamente el valor de la corriente basal es $< 3\%$ y nunca superior al 10% de la corriente evocada.

Para realizar los registros, los cubreobjetos con microcultivos de neuronas de entre 13 y 18 días de cultivo *in vitro* (DIV) se ponen en una cámara de registro con un compartimento de perfusión en forma de diamante, diseñado para cubreobjetos redondos (Warner Instruments, Hamden, USA, modelo RC-25F). En el compartimento de perfusión de la cámara, se monta un electrodo clorado, que se usa como electrodo de referencia. Los registros de fijación de voltaje se efectúan con un amplificador EPC-9 (HEKA, Lambrecht, Alemania) controlado por el programa

PULSE (HEKA, Lambrecht, Alemania). Los experimentos se desarrollaron a temperatura ambiente (21-25° C).

Para los registros, se emplean pipetas de borosilicato con filamento interno (Harvard apparatus) fabricadas con una forja horizontal (modelo P-97, Sutter Instrument, USA). La resistencia de las pipetas utilizadas es de 3-4 MΩ cuando están llenas de solución interna. Durante los registros, las neuronas son constantemente perfundidas con solución externa. Entre cada estimulación, se espera un mínimo de 30 segundos.

Solución externa (en mM)	Solución interna (en mM)
130 NaCl	130 Gluconato de potasio
2,7 KCl	10 HEPES
10 mM Hepes hemisodium salino	0,02 BAPTA
2 MgCl ₂ ⁽¹⁾	3 Na ₂ ATP
2 CaCl ₂ ⁽²⁾	1 NaGTP
10 mM Glucosa	2 MgCl ₂ ⁽¹⁾
(1): A partir de solución comercial MgCl ₂ 1M	(1): A partir de solución comercial MgCl ₂ 1M
(2): A partir de solución comercial CaCl ₂ 1M	

Para la solución externa, el pH se ajusta a 7,4 y la osmolalidad se ajusta a 290 mOsmol Kg⁻¹, antes de adicionar glucosa y calcio. La osmolaridad aumenta a 300-3002 mOsmol Kg⁻¹ cuando se añaden la glucosa y el calcio.

Para la solución interna, el pH se ajusta a 7,2, mediante la adición de KOH en solución. La osmolalidad se ajusta a 290 mOsmol·Kg⁻¹.

5.2. Análisis de registros de la respuesta evocada

La cuantificación de la respuesta evocada, se realiza mediante la cuantificación del valor máximo, en términos absolutos, de la corriente postsináptica excitatoria (EPSC, por su acrónimo del inglés *Excitatory Postsynaptic Current*), que en nuestro caso corresponde a la corriente autáptica. El análisis se efectúa mediante macros escritas en el programa IGOR 6.0. (Wavemetrics, Oregon, USA).

Para cuantificar la amplitud de la corriente, se subtrae previamente la corriente basal del registro (figura. 21). Típicamente, la corriente basal es $< 3\% - 10\% >$ del valor de la corriente evocada. No se consideran los registros con un valor basal mayor al 10% de la corriente evocada o mayor a 300 pA. En las gráficas, los valores promedios son representados como el promedio \pm error estándar.

5.3. Análisis de registros de la respuesta espontánea

El análisis de las corrientes postsinápticas excitatorias miniaturas (mEPSC o minis, figura. 22), consiste en la cuantificación de la amplitud y en el cálculo de su frecuencia. El valor de amplitud mínimo de un mEPSC se estima en 20 pA, que corresponde aproximadamente tres veces la desviación estándar del ruido.



Figura 22. Trazo representativo de un registro de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura observados en nuestra preparación.

6 Microscopía electrónica de transmisión correlativa con la electrofisiología

Para estudiar el efecto de SPARC sobre los terminales presinápticos, cuando se adicionan concentraciones nanomolares de esta proteína matricelular durante el desarrollo, se realiza un estudio de microscopía electrónica de transmisión correlativa con los registros electrofisiológicos. Este protocolo nos permite para cada neurona individual correlacionar el registro electrofisiológico con un terminal presináptico específico.

Las neuronas empleadas en esta metodología, se cultivan sobre cubreobjetos de thermanox (Thermo Scientific, ref: 174969) y se registran a los 14-18 DIV. Los protocolos aplicados corresponden a pulsos pareados con un tiempo de intervalo de 1 segundo, con un máximo de 5 estimulaciones por registro. Tras el último protocolo aplicado, se espera un tiempo de recuperación de 3 minutos. Una vez finalizado el registro, se obtiene una imagen de campo claro de la neurona, para su posterior identificación (figura 24A) y la neurona se fija con una solución al 2,5% de glutaraldehído en PB 0,1M, pH 7,4, por 15 minutos, al cabo de los cuales se reemplaza el fijador por una solución de fijador fresca y se deja durante 2 horas a 4°C. Una vez finalizada la fijación, la microisla se identifica bajo microscopio (figura 24B) y con un bisturí, se marca un área alrededor de la microisla, para su posterior identificación.

La neurona se transporta al servicio de microscopía electrónica del Servicio Científico-Técnico (SCT) de la Universidad de Barcelona (Campus Casanova), en donde se procesa la muestra para microscopía electrónica de transmisión.

Una vez que la muestra está en el SCT, el personal de este servicio lava la muestra con PB 0,1 M pH (ver soluciones, S5), por tres veces de 10 minutos cada uno. Tras el lavado, la muestra se postfija con una solución de 1% tetróxido de Osmio/ 0,8% ferrocianato de potasio en tampón fosfato 0,1 M, por 1 hora a 4° C. Después de la postfijación, la muestra se lava tres veces con agua destilada a 4°C, de 10 minutos cada uno y se deshidrata a 4°C en pasos sucesivos, desde un 25% al 100% de acetona, Una vez deshidratada, la muestra se infiltra con resina sintética (Spurr) en pasos sucesivos del 25% al 100% spurr, a temperatura ambiente. Una vez que la muestra está infiltrada, se recorta la zona del cubreobjeto que contiene la neurona previamente delimitada, se gira cara abajo y se pone sobre un bloque de resina sintética (Spurr) previamente polimerizado, el cual contiene resina líquida en la cara superior, haciéndola coincidir con la cara del cubreobjeto

que contiene la neurona (figura 23). El bloque que contiene la neurona, se deja polimerizando por 48 horas en una estufa a 60° C.

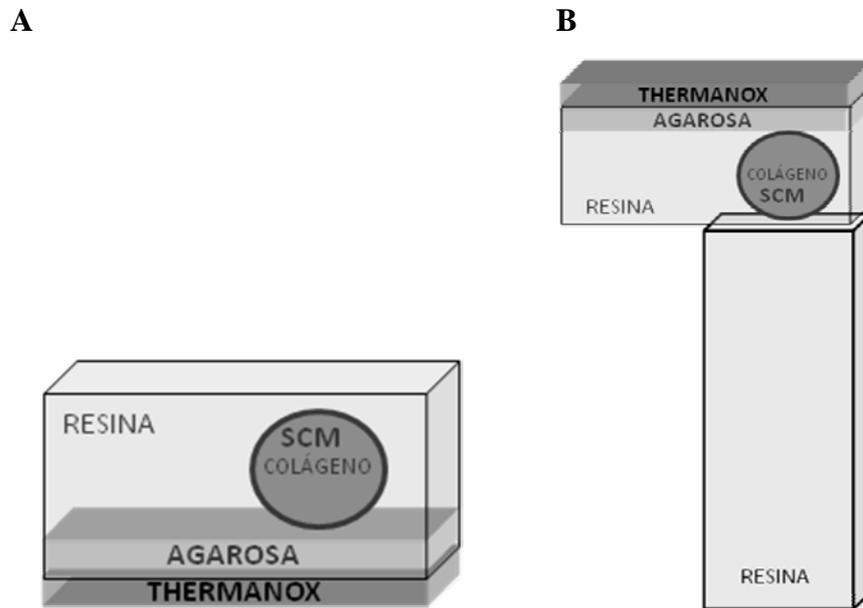


Figura 23: Esquematación de la formación del bloque de resina con la muestra. A) esquematización de la disposición de la muestra, una vez finalizada la inclusión. B) esquematización de la disposición de la muestra en el bloque de resina. Nótese que la muestra se ha puesto cara abajo en un bloque de resina previamente polimerizado.

Una vez formado el bloque, se retira el trozo de cubreobjeto, se identifica la zona del bloque que contiene la neurona (figura 24 C y D) y se procede a realizar cortes semifinos de 1 μm hasta llegar a la neurona. Luego de alcanzar la neurona, se continúa con cortes ultrafinos de 60 nm. Los cortes se realizan con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E. Los cortes semifinos se tiñen con azul de tolueno y los cortes ultrafinos se tiñen con acetato de uranilo (Fig. 24 E y F). Los cortes se observan en un microscopio de transmisión JEOL 1010 + Bioscan (Gatan), en donde la identidad de la neurona se confirma a bajos aumentos (Fig. 24 F). La cuantificación del número de vesículas y su localización, se realiza en imágenes obtenidas a un aumento de 80-150K. La zona activa del terminal presináptico se identifica como la porción de membrana plasmática del botón opuesta a la densidad postsináptica. Las vesículas sinápticas se consideran ancladas cuando no se puede resolver la distancia entre la membrana vesicular y la membrana plasmática.

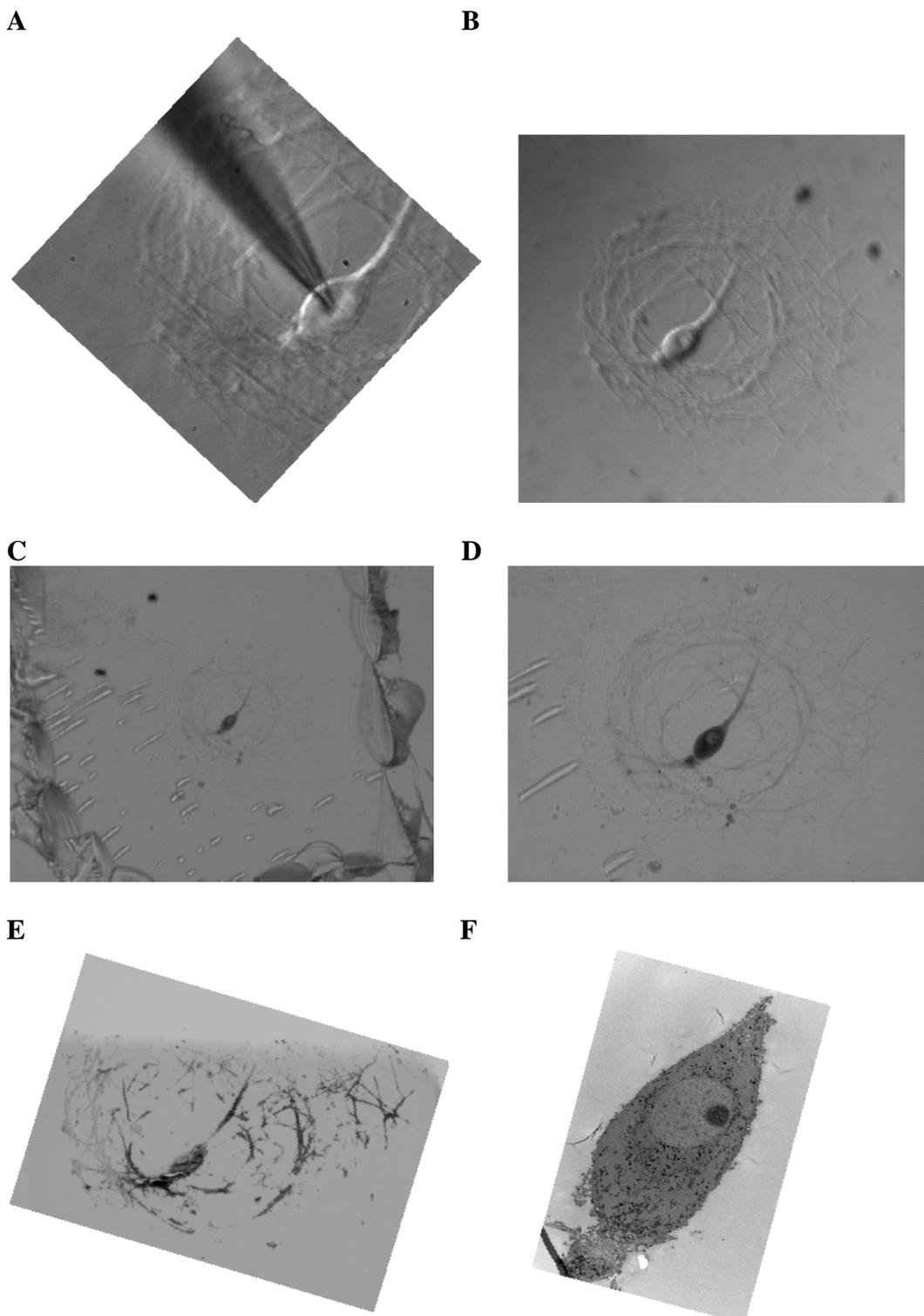


Figura 24. Identificación de la muestra en el protocolo de microscopía electrónica correlativa. A ,B) Micrografía de un SCM tomada luego de realizar los protocolos de registros electrofisiológicos. C) Imagen del SCM una vez incluido en un bloque de resina, las marcas que se aprecian en torno a la microisla corresponden a la delimitación realizada con bisturí. D) Imagen ampliada de la misma zona, donde se aprecia más claramente la morfología de la neurona. E) Corte semifino, teñido con azul de tolueno. F) Corte ultrafinos, teñido con acetato de uranilo, donde se puede certificar la identidad de la neurona al observarla a bajo aumento.

7 Modificación genética de células en cultivo

La transfección es uno de los métodos más empleados para introducir ácidos nucleicos en células eucariotas sin la utilización de agentes virales. Con este método, se consigue introducir en la célula, moléculas de carga negativa (como ADN o ARN), a través de la membrana celular, que también tiene una carga negativa. El empleo de fosfato de calcio (Kingston et al., 2003), dietilaminoetanol-dextrano (Gulick, 2003) o de reactivos basados en lípidos (Dean and Gasiorowski, 2011), envuelven el ADN, neutralizando su carga negativa o incluso creando un complejo con una carga neta positiva (figura 25). Este proceso facilita la internalización del complejo formado entre el ADN y los reactivos empleados. El método más usado para realizar cotransfecciones, es el empleo de liposomas catiónicos, método que ha experimentado grandes progresos desde el reporte inicial de Felgner y colaboradores, en 1987. Mediante el uso de este último método, se han sobreexpresado proteínas en las células COS-7, empleando el reactivo comercial Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por la casa comercial, empleando una relación de ADN (μg): Lipofectamina (μL) de 1:0,5, obteniéndose una eficiencia del 50% en las células COS-7 y un 2% en las células de la glía periférica.

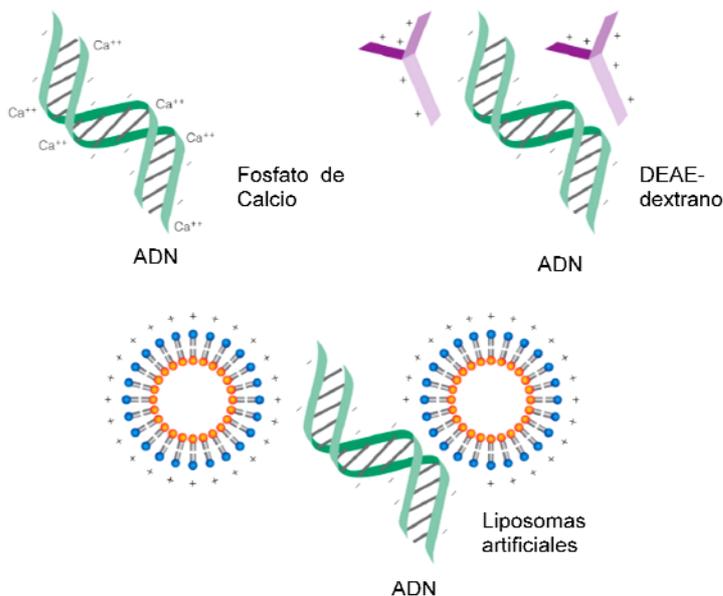


Figura 25. Representación esquemática de varios métodos de transfección. En este esquema se representan tres métodos de neutralización de la carga negativa del ADN. Nótese que los reactivos basados en lípidos, además de formar micelas y asociarse con el DNA, pueden revestir el ADN

(Modificado de:
<http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/>)

Para estudiar el efecto en la neurotransmisión de la liberación localizada de SPARC sobre las neuronas, se emplearon células COS-7 transfectadas simultáneamente con dos constructos, uno correspondiente a GFP y otro correspondiente a SPARC en una relación 1:4. Como grupo control se emplean células COS-7 transfectadas solamente con el constructo de GFP. Si las células transfectadas se emplean para traspasarlas sobre las microislas, tras la transfección se les adiciona medio de cultivo para células gliales, si se traspasan a las microislas. Si las células se utilizan para cuantificar la producción de proteínas, se les adiciona medio de cultivo DMEM:F-12 (Gibco®, ref: 11320-033).

8 Análisis de proteínas en los medios condicionados.

El análisis de proteínas presentes en el medio condicionado por células de la glía periférica o por células COS-7 transfectadas, se realiza mediante diversas técnicas. Para el análisis inicial de los sobrenadantes, se recurre a la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, concretamente del tipo SDS-PAGE (por su acrónimo del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), empleando geles de una dimensión y de dos dimensiones. En los geles de una dimensión, las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño (ver anexo I para más detalles); en los de dos dimensiones las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico (PI) y peso molecular (ver anexo I para más detalles). Las proteínas separadas por bandas de proteínas se identificaron mediante tinción de Coomassie o tinción de plata (Ver anexo I para más detalles).

Los geles de dos dimensiones se utilizan para lograr una mejor resolución de las proteínas presentes en los medios condicionados por las células de la glía periférica. Debido a que las proteínas son moléculas anfotéricas, éstas presentan una carga neta negativa, positiva o neutra dependiendo del pH del medio en el que estén disueltas. En la primera dimensión, de un gel de dos dimensiones, las proteínas se separan de acuerdo a su PI, el que corresponde al pH en el cual la proteína no presenta una carga neta. Esta separación se consigue poniendo la muestra en un gel con un gradiente de pH, al cual se le aplica una diferencia de potencial que moviliza las proteínas hacia el pH en donde no presentan carga neta (figura 26). Una vez que las proteínas han sido separadas por su punto isoeléctrico en la primera dimensión, se procede con la segunda dimensión, donde se separan por su masa (figura. 27). Las proteínas de interés identificadas en

los geles 2D, se recortan con una hoja de bisturí estéril, se guardan en un eppendorff con agua mQ y se envían a secuenciar por MALDI-TOF al servicio de proteómica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

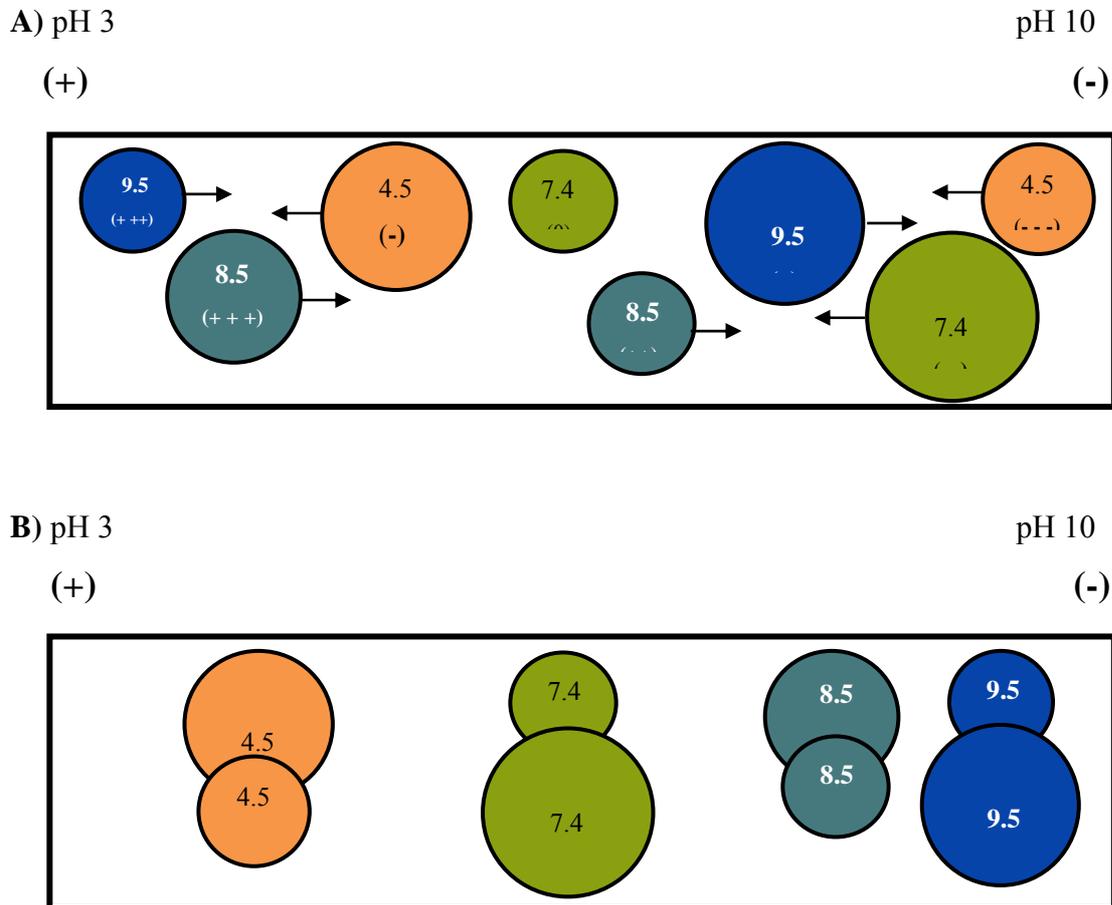


Figura 26. Gel de dos dimensiones: isoelectroenfoque (primera dimensión). La primera dimensión se realiza sobre una tira que contiene un gel que posee un gradiente de pH, sobre el cual se aplica la muestra. **A) Representación de una muestra cargada en la primera dimensión, antes del isoelectroenfoque.** En este estado inicial, las moléculas se distribuyen a lo largo de toda la tira, independientemente de su tamaño o de su punto isoelectrónico. El isoelectroenfoque se consigue situando la tira sobre un soporte con electrodos, en donde el extremo ácido de la tira se coloca sobre el ánodo, y el extremo básico sobre el cátodo. Al aplicar una diferencia de potencial, las moléculas que se encuentren en regiones en donde el pH es inferior a su punto isoelectrónico, tendrán una carga positiva y migrarán hacia el cátodo, mientras que aquellas que se encuentren en zonas de pH superiores a su punto isoelectrónico estarán cargadas negativamente, por lo que migrarán hacia el ánodo. La migración de las moléculas se realiza hasta encontrarse en la zona donde el pH es igual a su PI. **B) Representación de una muestra cargada en la primera dimensión, después del isoelectroenfoque.** Las moléculas se distribuyen a lo largo de la tira dependiendo de su punto isoelectrónico e independientemente de su tamaño.

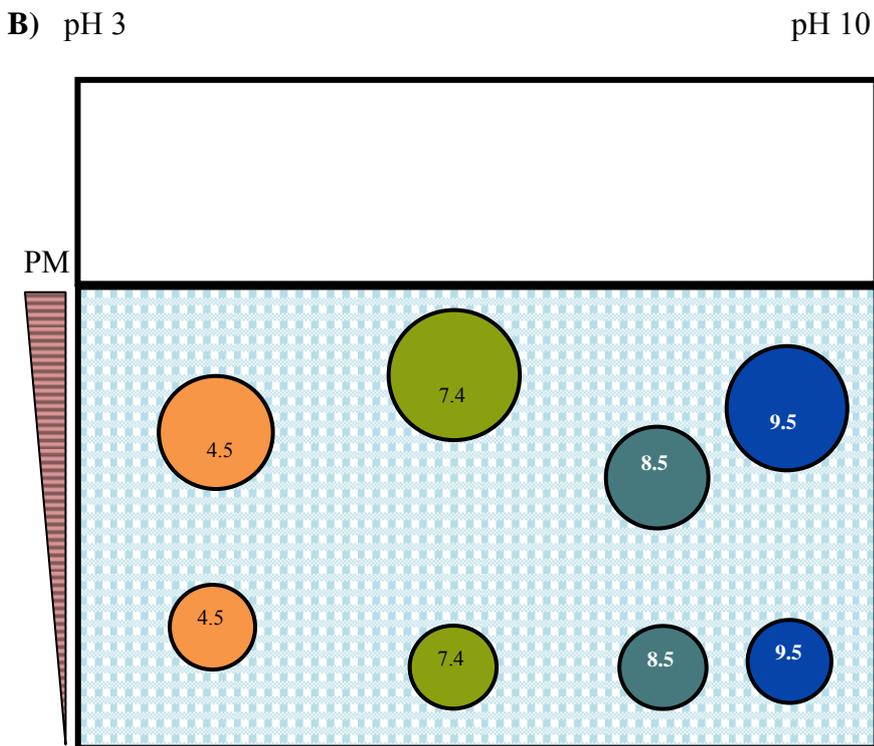
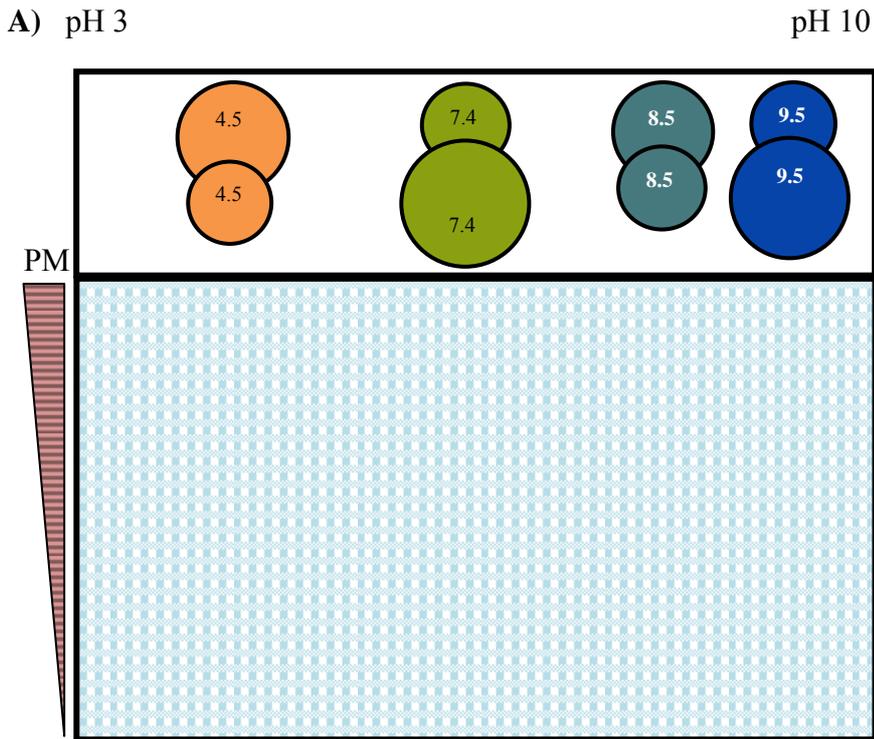


Figura 27. Gel de dos dimensiones: gel de poliacrilamida (segunda dimensión)

A) Una vez separadas las proteínas por su punto isoeléctrico, la primera dimensión se pone sobre un gel de poliacrilamida. Este punto representa el estado previo a la electroforesis. **B)** Esquema donde se representa un gel de dos dimensiones luego de realizar la electroforesis. Nótese que en este punto las proteínas quedan separadas tanto por su punto isoeléctrico como por su tamaño.

9 Detección y cuantificación de proteínas en los medios condicionados

Las proteínas presentes en el medio condicionado, fueron detectadas y cuantificadas mediante *Western blot*, *Dot blot* y ELISA.

9.1. Técnica de *Western blot*.

La confirmación de la presencia de SPARC en los medios condicionados y la cuantificación inicial de la producción de SPARC, se realiza mediante *Western blot* (ver anexo I para más detalles), empleando el anticuerpo policlonal contra SPARC (R&D Systems, Minneapolis, AF942) a una concentración 1:500, seguido por un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Dako, Dinamarca, P 0160) a una dilución 1:500. El *Western blot* se revela con reactivos quimioluminescentes del ECL (*Enhanced Chemilluminescence*) (GE Healthcare), y la señal luminiscente se adquiere en el aparato “*Luminescent Image Analyzer LAS-3000*” (Fujifilm), mediante el programa “*ImageReader LAS-3000*”

9.2. Técnica de *Dot blot*

La técnica de *Dot Blot* permite una inmovilización rápida de proteínas en membranas de nitrocelulosa, permitiendo una rápida detección e identificación. Por estas características, se empleó la técnica de *Dot Blot* para la identificación de SPARC en las distintas fracciones obtenidas por HPLC, utilizando el aparato “*Bio-Dot ® Microfiltration Apparatus*” (Bio-Rad, Hercules, CA; ref: 170-6545). Se adicionan 20 μ L de muestra en 180 μ L de TBS sobre una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida con TBS y se deja secar. Posteriormente la membrana se bloquea y se continúa con el procedimiento descrito para el *Western blot* (ver anexo I para más detalles).

9.3. Técnica de ELISA

La cuantificación de SPARC en distintos medios se realizó por la técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA (por su acrónimo del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Las primeras cuantificaciones se realizaron con un “kit” de ELISA contra Osteonectina, (Uscn, China, ref: E90791Ra). La elección de este kit, fue porque el rango dinámico de detección informado es de 0,156-10 ng/mL, mucho más bajo que el de otras casas comerciales, y con el cual podríamos detectar la concentración de SPARC estimada a partir de los Western Blot.

En nuestras muestras, y siguiendo las indicaciones del fabricante, el kit de ELISA sólo detectó SPARC presente en suero, no nos detectó el SPARC de los medios condicionados por células de Schwann y de células COS-7. Por ello, el siguiente paso fue la elaboración propia de un método de ELISA por el método “sándwich”, con la utilización de una combinación entre los siguientes anticuerpos: a) anticuerpo policlonal de cabra contra SPARC (R&D Systems, Minneapolis, AF942), b) anticuerpo policlonal de conejo contra SPARC, secuencia TCDLDNDKYIALDEW (Abcam, Cambridge, UK, ref: Ab14177) y c) anticuerpo monoclonal de ratón contra SPARC (“full length”, Abcam, Cambridge, UK, ref: Ab61383), en combinación con los secundarios respectivos. Pero como ninguna combinación de anticuerpos dio una señal lineal para la curva estándar, por lo que se procedió a la puesta a punto de un ensayo de ELISA indirecto (anexo I).

El método de ELISA indirecto se basa en la adsorción pasiva del antígeno sobre una superficie, adición de un anticuerpo específico contra el antígeno, adición de un segundo anticuerpo contra la especie del primer anticuerpo para finalizar la cuantificación por un método colorimétrico, en donde se adiciona un sustrato enzimático que al reaccionar con una enzima peroxidasa, genera un producto de color marrón-anaranjado cuya absorción se puede leer a 450 nm. (Crowther, 1995). En la figura 28 se representa un esquema del protocolo empleado.

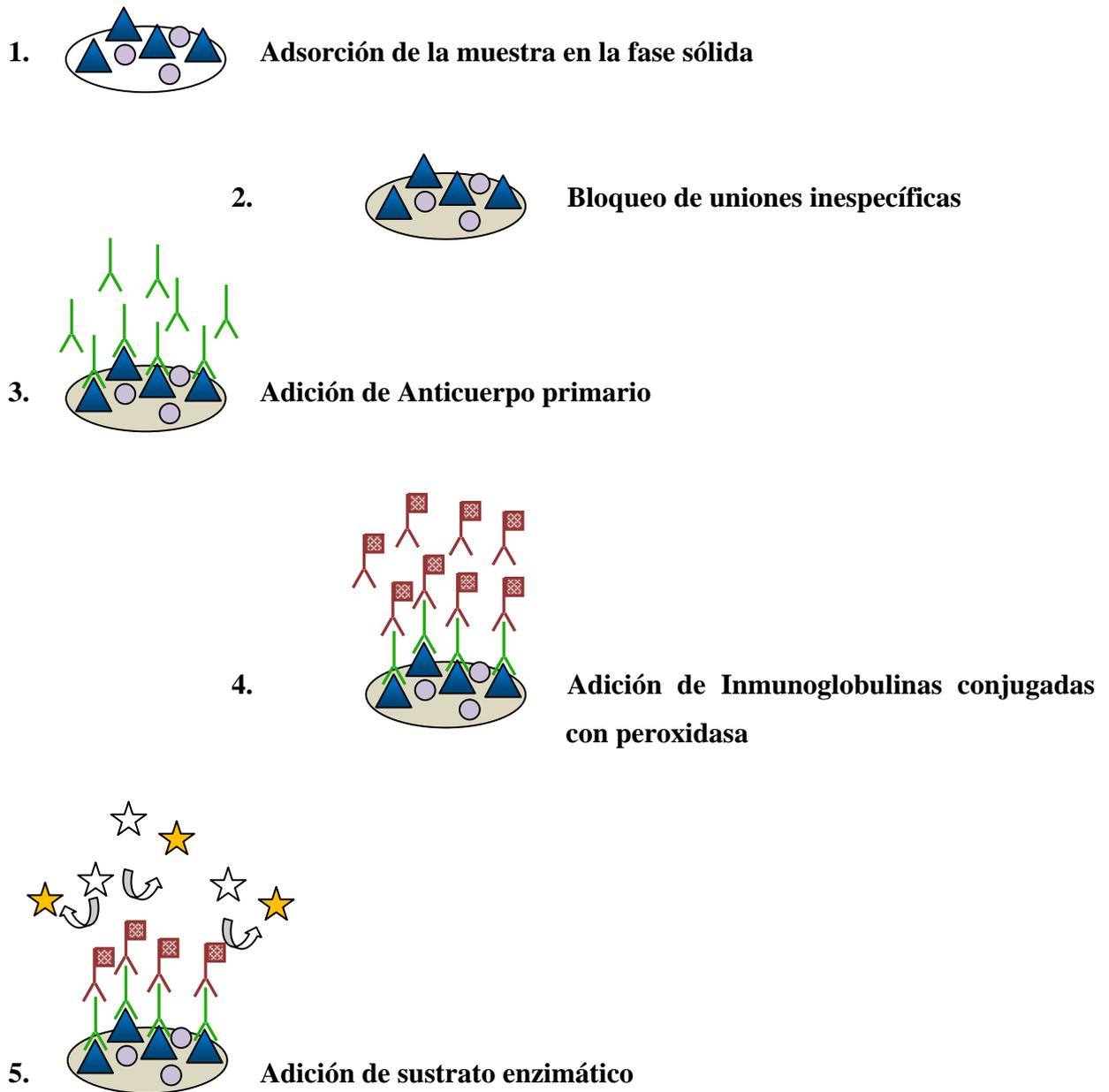


Figura 28. Representación esquemática de un protocolo de ELISA. Entre cada paso, se realiza un lavado para eliminar las proteínas no adsorbidas (para el caso de 1 y 2) ó para eliminar los anticuerpos que no se han unido específicamente (para los casos 3 y 4).

10 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Uno de los objetivos planteados para esta tesis doctoral, es la puesta a punto de un sistema de detección e identificación de las proteínas secretadas por las células de la glía periférica, para lo cual se empleó un método de separación de proteínas mediante HPLC. Debido a que SPARC fue identificada como nuestra proteína de interés, adaptamos un protocolo de purificación de SPARC utilizando la línea celular PYS-2. El protocolo empleado es una modificación de los métodos de purificación ya descritos por Sage y colaboradores (Sage et al., 1989; Sage, 2003), que consiste principalmente en tres etapas sucesivas, detallados en el anexo I:

6.1 Recolección y Precipitación del medio de cultivo enriquecido en SPARC.

6.2 Cromatografía de intercambio iónico.

6.3 Cromatografía de exclusión molecular.

Los pasos 2 y 3 se realizan mediante la técnica conocida como Cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC, por su acrónimo del inglés “*High performance liquid chromatography*”. El HPLC es una técnica de cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la fase estacionaria presente en la columna cromatográfica.

En la cromatografía de intercambio iónico, las moléculas son separadas en función de la carga neta, aprovechando la propiedad anfotérica de las proteínas, que muestran una relación directa entre la carga neta que presentan y el pH del medio en que se encuentran. Una proteína que se encuentra en un medio con un pH equivalente a su punto isoeléctrico (PI), no presenta carga, por lo que no interactúa con la fase estacionaria. Por el contrario, cuando el pH del medio es mayor a su PI, la proteína se encontrará cargada negativamente y se unirá a una fase estacionaria con carga positiva o intercambiador aniónico; y en un medio con un pH menor a su PI, la proteína presentará una carga neta positiva, por lo que se unirá a fases estacionarias cargadas negativamente o intercambiador catiónico.

La Cromatografía de exclusión molecular, también conocida como cromatografía por filtración en gel, separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. En esta cromatografía, los polímeros que componen la fase estacionaria forman una red tridimensional

porosa, por la que atraviesan las moléculas presentes en la muestra. Por lo tanto, las moléculas con un tamaño mayor al del poro de la fase estacionaria eluyen primero y aquellas moléculas con un tamaño menor, eluyen más tarde.

11 Soluciones

S1. Solución de agarosa al 0,15% (p/v):

Se prepara en agua mQ
0,06 g de Agarosa tipo II (Sigma-Aldrich).
40 mL de agua mQ.

Se calienta en microondas a máxima potencia, por unos 20 segundos, evitando que hierva. Se saca del microondas, se agita hasta disolver la agarosa. Calentar nuevamente si es necesario.

S2. Cubreobjetos revestidos con agarosa:

Cubreobjetos de 15 mm, almacenados en solución de etanol al 70% (v/v), se lavan con agua mQ estéril y se ponen en una placa de 12 pocillos. Una vez los cubreobjetos se han secado, se les adiciona la solución de agarosa al 0,15%(p/v) en cantidad necesaria para cubrir los cubreobjetos (~ 500 – 700 μ L). Esperar aproximadamente 2-3 minutos y retirar el exceso de solución de agarosa, comprobar la formación de la capa de agarosa. Repetir el proceso de ser necesario.

S3. Tampón fosfato 0,2 M (PB 0,2M):

El tampón fosfato está formado por una solución A y una solución B en una relación A/B = 19/81, llevándolo a un pH de 7,4.

- Solución A (ácida): 0.2 M fosfato sódico monobásico (NaH_2PO_4).
- Solución B (básica): 0.2 M fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4).

Una vez preparadas las soluciones A y B, se vierte la solución A sobre la solución B, en agitación, hasta alcanzar un pH de 7,4.

S4. Tampón fosfato salino (PBS):

Se prepara en agua mQ, a partir de PB 0,2M:

- 10 mM PB.
- 150 mM NaCl.
- 2,7 mM KCl.

S5. Tampón fosfato 0,1 M (PB 0,1M)

Se prepara una solución al 50%(v/v) de PB 0,2M, en agua mQ. Se comprueba el pH y se ajusta a 7,4 de ser necesario.

S6. Tampón de carga:

Se prepara en agua mQ:

- 120 mM de Tris·HCl a pH 6.8.
- 40% (v/v) de solución 10% SDS.
- 20% Glicerol.
- 0,004% de Azul de bromofenol.
- β - Mercaptoetanol.

S7. Solución teñidora Coomasie:

Se prepara en agua mQ:

- 25% (v/v) de isopropanol.
- 10% (v/v) de ácido acético glacial.
- 0,15% (p/v) de colorante Coomasie brilliant blue R250.

S8. Solución desteñidora turbo:

Se prepara en agua mQ:

- 25% de isopropanol.
- 10% (v/v) de ácido acético glacial.

S9 . Tampón concentrador

Se prepara en agua mQ:

- 0,5 M Tris·HCl a pH 6.8.

S10. Gel Concentrador SDS-PAGE (fase concentradora):

Se prepara en agua mQ:

- 4% acrilamida/bisacrilamida.
- 25% (v/v) Tampón concentrador.
- 0,1% N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED).
- 0,2% persulfato de amonio.

S11. Tampón separador

Se prepara en agua mQ:

- 1,5 M Tris·HCl a pH 8.8.
- 0,1% SDS.

S12. Gel separador SDS-PAGE (fase separadora):

- 8-12% acrilamida/bisacrilamida.
- 25% (v/v) Tampón concentrador.
- 0,1% N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED).
- 0,2% persulfato de amonio.

S13. Tampón de electrodos (1x):

El tampón de electrodos (1x) se prepara en agua mQ, diluyendo 10 veces el tampón de electrodos 10x. Para 1 L final de solución:

- 100 mL tampón de electrodos 10x.
- 900 mL de agua mQ.

S14. Tampón de electrodos (10x):

Se prepara en agua mQ:

- 1,92 M de Glicina.
- 0,25 M de Tris-HCl
- 1% (p/v) de SDS. A partir de solución 10% (p/v) SDS

S15. Tampón de equilibrio para geles 2D

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración final</u>
Urea (PM: 60,06)	6 M.
Tris-HCl, pH 8,8	75 mM.
Glicerol	29.3% (v/v)
SDS (PM: 288,38)	2% (p/v)
1% bromofenol (stock)	0.002% (p/v)
Agua mQ	necesaria para completar 200 mL.

Se almacenan en alícuotas de 20 – 50 mL.

S16. Tampón de equilibrio con DTT 2%

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración final</u>
Urea (PM: 60,06)	6 M.
Tris-HCl, pH 8,8	75 mM.
Glicerol	29.3% (v/v)
SDS (PM: 288,38)	2% (p/v)
1% bromofenol (stock)	0.002% (p/v)
DTT*	2% (p/v).
Agua mQ	necesaria para completar 200 mL.

* El DTT se adiciona inmediatamente antes de usar el tampón

S17. Tampón de equilibrio con IAA al 2%

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración final</u>
Urea (PM: 60,06)	6 M.
Tris-HCl, pH 8,8	75 mM.
Glicerol	29.3% (v/v)
SDS (PM: 288,38)	2% (p/v)
1% bromofenol (stock)	0.002% (p/v)
IAA	2% (p/v).
Agua mQ	necesaria para completar 200 mL.

* El IAA se adiciona inmediatamente antes de usar el tampón

S18. Solución stock de azul de Bromofenol al 1% (p/v)

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración final</u>
Azul de bromofenol	1% (p/v)
Tris-HCl, pH 8,8	50 mM.
Agua mQ	necesaria para completar 10 mL.

S19. Tampón de transferencia (1x).

El tampón de transferencia (1x) se prepara en agua mQ, haciendo una dilución 1/10 del tampón de electrodos 10x y añadiendo un 20% (v/v) de metanol. Para 1 L final de solución:

- 100 mL tampón de transferencia 10x.
- 200 mL de metanol.
- 700 mL de agua mQ.

S20. Tampón de transferencia (10x).

Se prepara en agua mQ:

- 1,92 M de Glicina.
- 0,25 M de Tris.

S21. Solución de tiosulfato de sodio al 2% (p/v)

Se prepara en agua mQ:

- 2g. Tiosulfato de sodio
- Agua mQ necesaria para completar 100 mL

S22. Solución fijadora (protocolo tinción de plata)

Se realiza en agua mQ, para un volumen final de 50 mL:

- 15 mL etanol
- mL ácido acético glacial
- 30 mL agua mQ

S23. Solución de nitrato de plata

Se prepara en agua mQ, para 100 mL de solución:

- 0,2 g de nitrato de plata
- 75 μ L de solución de formaldehído al 37%
- Agua mQ necesaria para completar 100 mL.

S24. Solución de revelado

Se prepara en agua mQ, para 100 mL final de solución:

- 6,0 g carbonato sódico.
- 50 μ L de solución de formaldehído al 37%.
- 50 μ L de solución 2% tiosulfato de sodio.
- Agua mQ necesaria para completar 100 mL.

S25. Solución de bloqueo para *Western blot*

- 5% (p/v) de leche en polvo desnatada.
- Tampón TBS-T.

S26. Tampón Tris·HCl, 1 M

Se prepara en agua mQ:

- Se disuelven 121 g Tris base en 800 mL de agua mQ.
- Ajustar el pH deseado con HCL concentrado
- Ajustar con agua a un volumen final de 1 L.

S27. Tampón Tris salino (TBS)

Se prepara en agua mQ:

- 100 mM Tris HCl, pH 7,4
- 140 mM NaCl

Almacenar a 4° C.

S28. Tampón TBS-T.

Se prepara en agua mQ

- 10 mM Tris HCl, pH 7,4
- 140 mM de NaCl.
- 1% (v/v) de Tween-20.

S29. Solución de reactivos quimioluminescentes del ECL

La solución del ECL está formada por una mezcla de dos reactivos: reactivo A y reactivo B en una proporción 1:1

- Reactivo A: Tris 100 mM, pH 8,5, 0,5% de ácido cumárico y 1% de Luminol.
- Reactivo B: Tris 100 mM, pH 8,5, 0,06% H₂O₂ al 30%.

S30. Cubreobjetos polilisinados

Cubreobjetos de 15 mm de diámetro (Thermo Scientific, Alemania), se sumergen en solución estéril de Poli-L-lisina al 0,01% (Sigma-Aldrich, ref: P4832), durante toda la noche o durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavan por inmersión en agua mQ, unas 3 veces. Cada cubreobjeto se pone en un pocillo de una placa de 12 pocillos y se dejan secar en campana, evitando la luz ultra-violeta.

RESULTADOS

*“No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer,
se debe también hacer”*

Goethe

RESULTADOS

1 Fenotipos de la glía periférica del ganglio cervical superior en cultivo.

El interés principal del laboratorio, es el estudio de los mecanismos moleculares de la neurotransmisión, para lo cual se ha implementado un sistema de microcultivos neuronales, en donde una neurona aislada del Ganglio Cervical Superior (SCG por su acrónimo del inglés *superior cervical ganglion*) crece en una gota de colágeno, estableciendo sinapsis funcionales consigo misma. Se establecieron dos tipos de microcultivos: el microcultivo que presenta una sola neurona, que se ha desarrollado en la gota de colágeno en ausencia de cualquier otro tipo celular, al que se le denomina SCM, por su acrónimo del inglés *Single-Cell Microculture*. El microcultivo que presenta una neurona que se ha desarrollado en presencia de la glía endógena del ganglio, se le denomina GM, por su acrónimo del inglés *Glial Microculture* (Perez-Gonzalez et al., 2008).

Los microcultivos se realizaron con neuronas aisladas del SCG de rata, porque este tipo neuronal no requiere células gliales para el crecimiento y el establecimiento de sinapsis *in vitro* (Perez-Gonzalez et al., 2008). Esta es la principal diferencia con los microcultivos establecidos con neuronas aisladas del sistema nervioso central, las cuáles requieren una monocapa de células gliales para su desarrollo y maduración. Esta particularidad de los microcultivos del sistema nervioso periférico nos permite estudiar el efecto de los factores secretados por las células gliales sobre la plasticidad sináptica, mediante cambios en la composición del medio de cultivo.

La caracterización de la neurotransmisión de estos dos tipos de microcultivos, reveló que la presencia de células gliales, incrementaban la frecuencia de la neurotransmisión espontánea y modificaba la plasticidad a corto plazo, acrecentando la depresión a corto plazo (Perez-Gonzalez et al., 2008). A partir de estos resultados, mi trabajo de tesis comenzó con la caracterización de las células gliales presentes en los microcultivos. Los GM presentaron un marcaje positivo para la proteína S100 β . Además se estableció que en estas condiciones de cultivo, las células S100 β positivas correspondían a un 97% (n=1747 células). Las neuronas no presentaban este marcaje.

Adicionalmente se identificó la presencia de fibroblastos, a través del marcaje para fibronectina, los cuales se distribuían hacia los bordes del cubreobjeto, sin llegar a formar parte de los microcultivos (Perez-Gonzalez et al., 2008).

Conforme con los estudios realizados por Jessen & Mirsky, en los primeros días postnatales las células de Schwann presentes corresponden a una mezcla entre los tipos de Schwann inmaduras, mielinizantes y no mielinizantes, pero que al disociarlas para hacer cultivos celulares, éstas últimas se dediferencian hacia células de Schwann inmaduras. Considerando estos antecedentes, para la identificación del tipo glial presente en nuestros cultivos es necesario utilizar marcadores que son indicadores específicos del estado de la célula de Schwann, los cuales se indican en la figura 29 (Dong et al., 1995; Jessen and Mirsky, 2008; Mirsky et al., 2008).

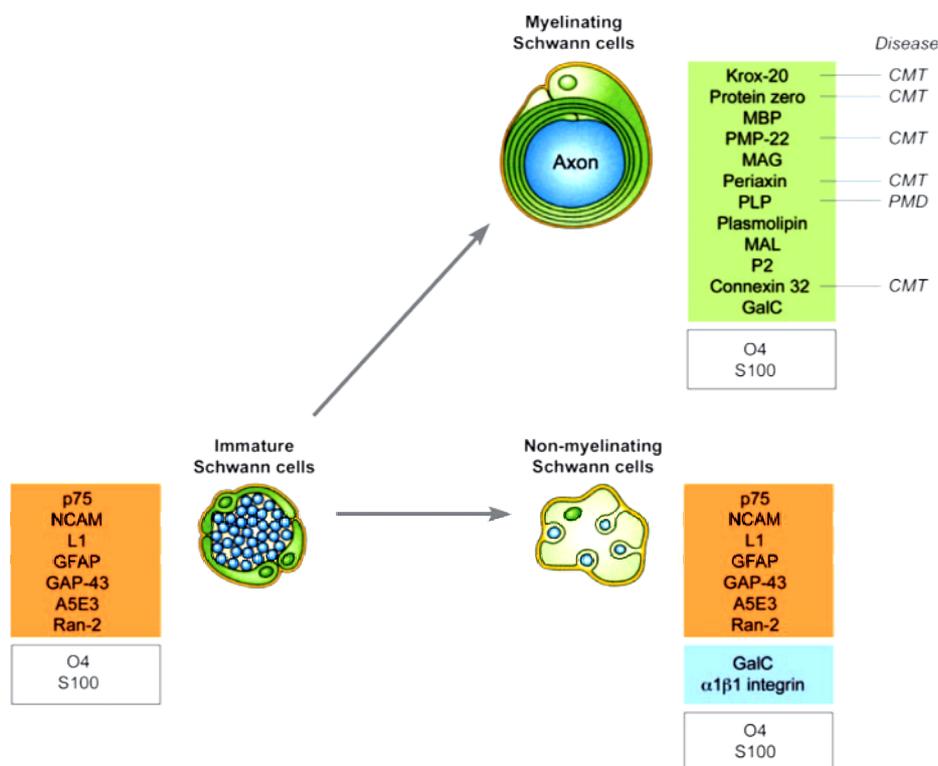


Figura 29. Esquema de diferenciación de las células de Schwann y los marcadores presentes durante el proceso. Nótese como los marcadores S100 y O4 se encuentran en los tres tipos de células de Schwann. (adaptado de Mirsky et al. 2008).

Las células gliales presentes tanto en los GM (Perez-Gonzalez et al., 2008), así como las células gliales en cultivo, presentan un marcaje positivo para la proteína S100 β (Fig. 27). De acuerdo al esquema presentado en la figura 29, este marcaje sólo nos indica que las células gliales corresponden a células de Schwann, por lo que necesitamos otros marcadores para poder deducir el fenotipo específico de las células gliales en cultivo.

Para diferenciar si las células de Schwann en cultivo correspondían al tipo mielinizante, se emplearon anticuerpos para identificar la presencia de la proteína básica de la mielina (MBP, por su acrónimo del inglés *Mielin Basic Protein*) y la presencia de KROX 20 (Dong et al., 1995; Mirsky et al., 2008). Como podemos observar en la figura 30, las células en cultivo no presentan marcaje para ambas proteínas.

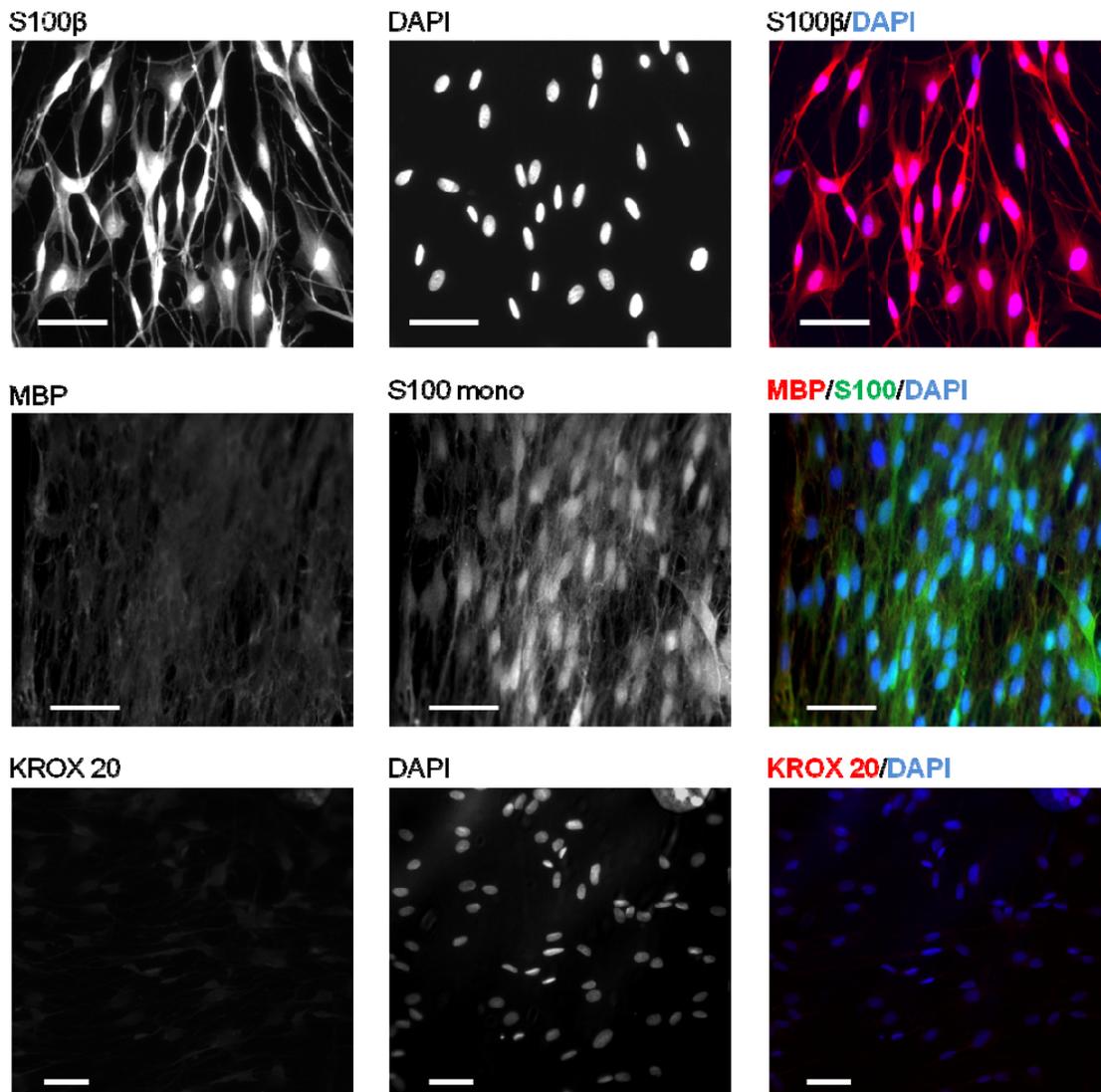


Figura 30. Caracterización de las células gliales en cultivo. Imágenes de células gliales del ganglio cervical superior en cultivo, marcadas para S100 β , proteína básica de la mielina (MBP) y Krox 20. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Nótese que las células gliales en cultivo presentan marcaje positivo para S100 β . Barra de calibración = 50 μ m.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir que las células de Schwann en cultivo no corresponden a células de Schwann mielinizantes, lo que nos sugiere que éstas podrían ser tanto células de Schwann inmaduras como células de Schwann no mielinizantes. Para diferenciar las células de Schwann maduras de las células de Schwann inmaduras, y de acuerdo a los marcadores señalados en la figura 29, se realizó un marcaje contra galactocerebrósido-C (Gal-C), el cual está presente en las células de Schwann maduras, tanto en las mielinizantes como en las no mielinizantes, resultando en un marcaje negativo en las células gliales en cultivo (figura 31). Finalmente, para identificar el fenotipo de las células gliales en cultivo y considerando que las células de Schwann inmaduras o dediferenciadas presentan una activación de NOTCH (Mirsky et al., 2008; Woodhoo et al., 2009), se realizó un marcaje para el dominio intracelular de NOTCH (NICD, por su acrónimo del inglés *NOTCH intracellular domain*) que corresponde a la forma activada de NOTCH. Las células gliales en cultivo presentaron un marcaje positivo para NICD (figura 31), lo que junto al marcaje positivo de S100 β , y de acuerdo a los estudios realizados por Jessen y Mirsky, podemos inferir que las células gliales en cultivo corresponden a células de Schwann inmaduras o dediferenciadas. Los marcajes realizados se resumen en la tabla 6.

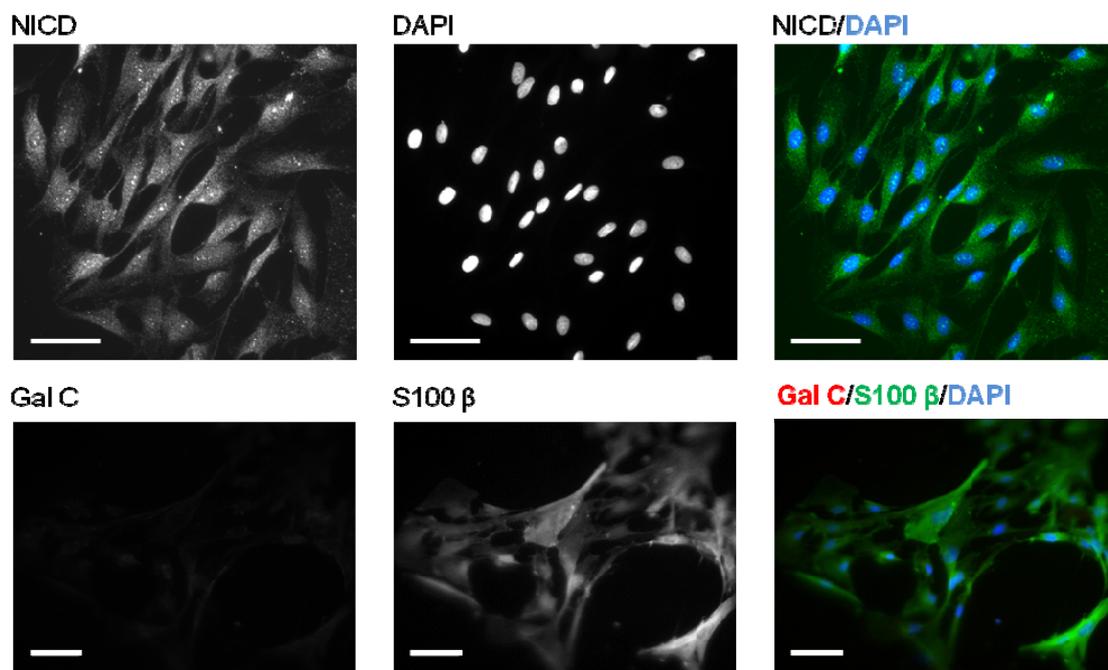


Figura 31. Las células gliales en cultivo corresponden a células de Schwann inmaduras. Imágenes de células gliales del ganglio cervical superior en cultivo, marcadas para el dominio intracelular de NOTCH (NICD) y para galactocerebrósido-C (Gal C). Los núcleos fueron marcados con DAPI. Nótese que las células gliales en cultivo presentan marcaje positivo para NICD. Barra de calibración = 50 μ m.

Marcador	¹ Células de Schwann Inmaduras	¹ Células de Schwann Mielinizantes	¹ Células de Schwann No Mielinizantes	² Células de Schwann en cultivo
S100β	+	+	+	+
NICD	+	-	-	+
Krox 20	-	+	-	-
MBP	-	+	-	-
Gal C	-	+	+	-

Tabla 6. Cuadro resumen con los marcajes realizados a las células de Schwann en cultivo. Comparación entre los marcajes caracterizados para las células de Schwann en distintos estados (1) y los resultados obtenidos de los marcajes realizados a las células gliales en cultivo (2). La presencia de marcaje se señala con un (+) y la ausencia con un (-). Nótese que las células de Schwann en cultivo presentan un marcaje positivo para S100 y para NICD y negativo para los otros marcadores, concordando con lo descrito para las células de Schwann inmaduras/diferenciadas. NICD = dominio intracelular de NOTCH, MBP = proteína básica de la mielina, Gal C = galactocerebrósido-C.

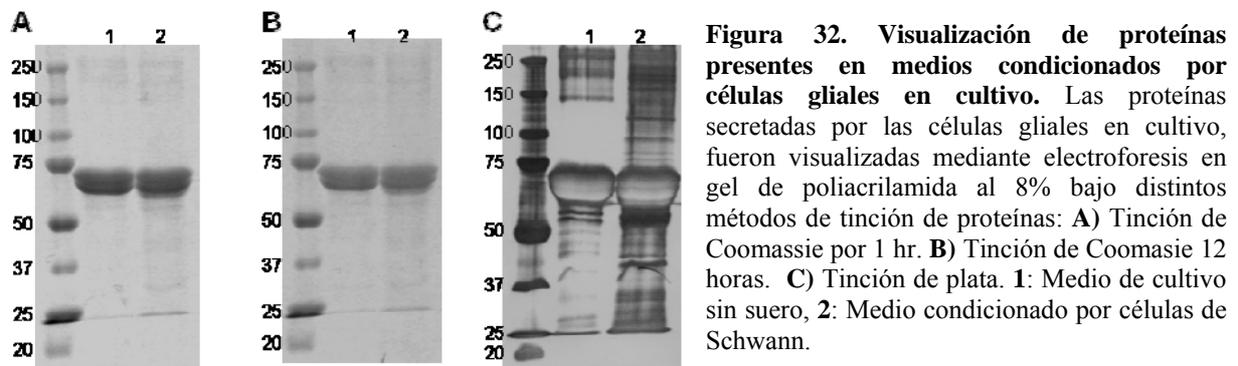
2 Identificación de productos secretados por las células de Schwann en cultivo.

Como hemos descrito en la introducción, las células gliales secretan factores que afectan la neurotransmisión (Pfrieger and Barres, 1997; Mauch et al., 2001; Nögler et al., 2001; Peng et al., 2003; Ullian et al., 2004b; Goritz et al., 2005; Feng and Ko, 2008), por lo que estudiamos la posibilidad que un factor secretado fuera responsable de los efectos observados en los GM.

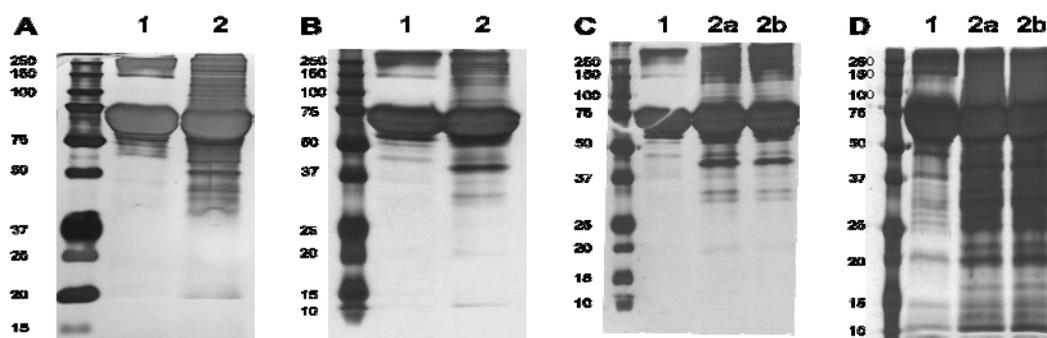
Para identificar estos factores, se cultivaron células de Schwann hasta confluencia en un medio de cultivo con suero, para luego cambiar el medio de cultivo por un medio sin suero de composición definida, SF, del inglés *serum free* (Bottenstein and Sato, 1979; Dong et al., 1995; Lopez and De Vries, 1999), recolectándolo al cabo de una semana. De esta forma se obtiene un medio condicionado de células de Schwann (MC-Sc) enriquecido en proteínas producidas por este tipo glial.

Inicialmente las proteínas se visualizaron con una tinción de Coomassie, pero con esta tinción sólo se observaron dos bandas de proteínas de entre 50 y 75 KDa. Para mejorar la visualización de las proteínas, a los geles se les realizó una tinción de plata (figura 32). Con esta última tinción pudimos identificar mejor las proteínas presentes tanto en el medio sin suero como

en el medio condicionado por las células de Schwann, por lo cual se empleó esta tinción en forma rutinaria para visualizar las proteínas en los geles de agarosa.



A fin de poder realizar una mejor separación de las proteínas de bajo peso molecular, los medios de cultivo sin suero y los medios condicionados se corrieron en geles al 12% de agarosa. En la figura 33 podemos ver el perfil proteico de seis MC-Sc obtenidos en cuatro experimentos independientes. Al comparar el perfil proteico de los medios condicionados respecto a los medios sin condicionar (control), se observa que los MC-Sc consistentemente presentan una mayor cantidad de proteínas respecto al medio sin condicionar, observándose un perfil reproducible en cada experimento. Este resultado nos demuestra que la células de Schwann secretan proteínas al medio de cultivo de forma constitutiva.



Barres y colaboradores han identificado que los astrocitos producen trombospondina-1 y trombospondina-2 *in vitro* e *in vivo* (Christopherson et al., 2005). Estas moléculas están implicadas tanto en la sinaptogénesis como en el aumento de la actividad sináptica espontánea en el sistema nervioso central. Previamente este grupo había demostrado que las células gliales inducen sinaptogénesis (Pfrieger and Barres, 1997; Ullian et al., 2001; Ullian et al., 2004a; Ullian et al., 2004b). Debido a estos antecedentes, se verificó la presencia de trombospondinas en los medios condicionados por las células de Schwann, para lo cual se realizó un *western blot* para la trombospondina 2, observándose una banda en torno a los 180 KDa, la cual no se observa en el medio control (figura 34).



Figura 34. Las células de Schwann del SCG producen trombospondina 2. En esta imagen se muestra un *western blot* para trombospondina 2 realizado a un MC-Sc. Se puede apreciar una banda a 180 KDa en el carril correspondiente al medio condicionado la cual no se observa en el carril del medio control correspondiente (SF).

Si bien la trombospondina ha sido descrita como una proteína que incrementa la formación de sinapsis, éstas son no funcionales, denominándolas sinapsis silentes. Como hemos descrito, las células de Schwann afectan tanto la neurotransmisión espontánea como la evocada, motivo por el cual descartamos la trombospondina y buscamos otros factores presentes en el medio condicionado. Para realizar una separación con una mayor resolución de las proteínas presentes en los MC-Sc's, se realizaron geles de dos dimensiones y las proteínas se visualizaron con tinción de plata.

En la figura 35 se observan geles de dos dimensiones representativos que se obtiene al analizar los medios sin suero (fig. 35 A y C) y los medios condicionados por las células de Schwann (fig. 35 B y D). En los geles de dos dimensiones correspondientes a los medios sin suero (control), podemos observar que las proteínas se concentran más entre los pHs 6 y 8. Por el contrario, en los geles de dos dimensiones correspondientes a los MC-Sc's se aprecia claramente

la presencia de nuevas proteínas en la zona ácida, respecto a las presentes en el medio sin condicionar, proteínas tanto de bajo peso como de alto peso molecular. Estos medios fueron analizados por triplicado en experimentos independientes para cada condición.

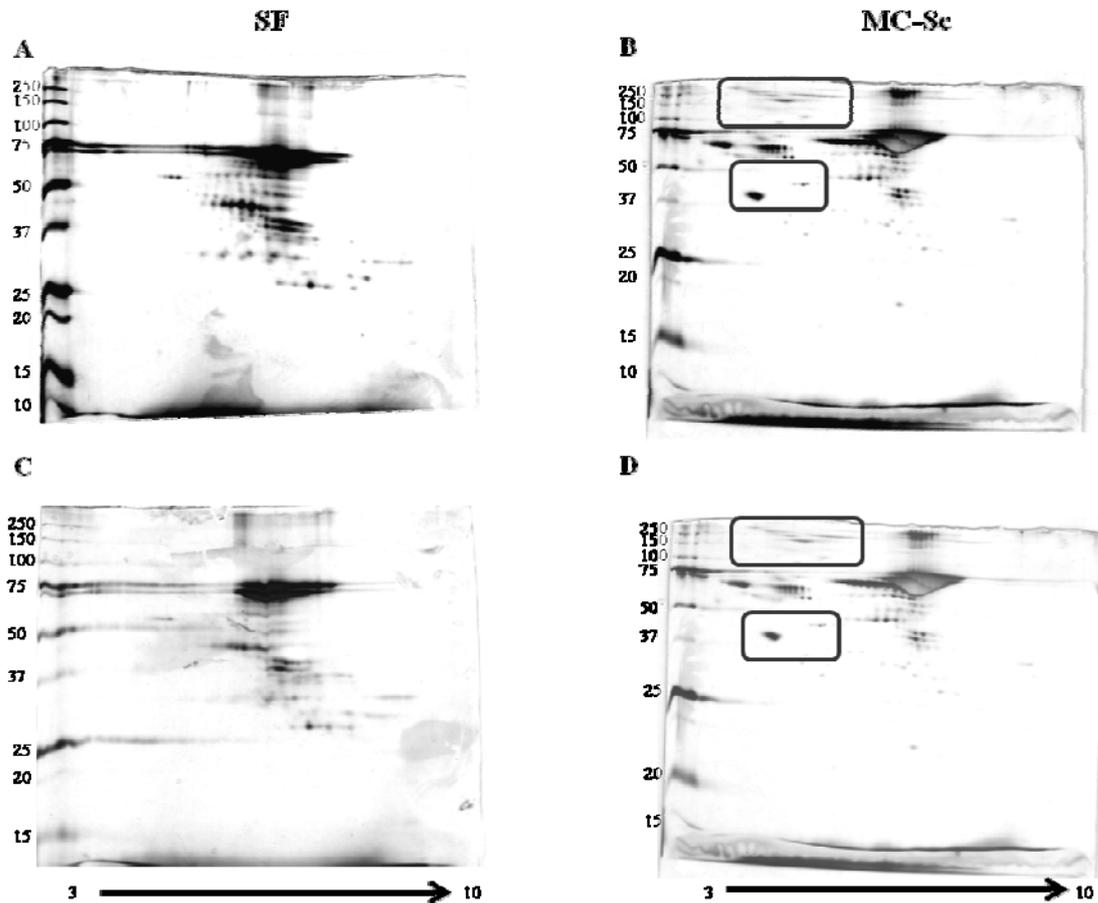


Figura 35. Gel de dos dimensiones de un MC-Sc. Gel de dos dimensiones de dos medios condicionados por células de Schwann. **A y C)** Medios de cultivo sin suero (SF). **B y D)** Medios condicionados por células gliales periféricas (MC-Sc).

El análisis comparativo de los geles de 2D de los MC-Sc respecto al control, permitió identificar 10 proteínas que no se observaban en los geles 2D de los medios controles. Estas proteínas fueron recortadas de aquellos geles en los cuales se tenían mejor resolución. Una vez obtenidos los puntos, éstos fueron enviados a la plataforma de proteómica del *Parc Científic* de Barcelona para su análisis e identificación.

En la Plataforma de proteómica del Parc Científic de Barcelona, las muestras fueron procesadas y contrastadas contra la base de datos del NCBI contra todas las especies y contra la base de datos de *Rodentia* (Rodents). Los resultados de estos análisis se resumen en la tabla 7.

Muestra	Peso Molecular (KDa)	Punto Isoeléctrico (pH)	Resultado
A1	42	4,8	SPARC (<i>Rattus norvegicus</i>)
B1	55	5,4	Proteína bovina
B3	60	5,2	Proteína bovina
B4	60	5,1	Proteína bovina
B5	60	5,0	Proteína bovina
B6	61	4,6	Proteína bovina
B8	64	5,6	Albumina bovina
C2	55	4,6	Proteína bovina
C3	45	5,5	Actina (<i>Mus musculus</i>)
C4	45	5,4	Actina (<i>Mus musculus</i>)

Tabla 7. Proteínas observadas en los geles 2D e identificadas por espectrometría de masa. Listado de proteínas identificadas como nuevos puntos en geles de dos dimensiones y enviadas a identificar por espectrometría de masa, con su respectivo resultado. En esta tabla se señalan el peso molecular y el punto isoeléctrico estimados a partir de los geles de dos dimensiones. Nótese que sólo una proteína corresponde a una proteína secretada y que el resto corresponderían a contaminación.

En las muestras B1, B3, B4, B5, B6 y C2 se identificaron solamente proteínas bovinas. La muestra B8 se identificó como albúmina bovina. Todas estas proteínas corresponderían a contaminación por parte del suero fetal de bovino empleado en el cultivo durante el período de crecimiento de las células hasta su confluencia; dichas proteínas habrían permanecido a pesar del lavado realizado antes del cambio de medio de cultivo al medio sin suero. Una posibilidad es que las proteínas hubiesen quedado retenidas en la capa de colágeno sobre la cual han crecido las células de Schwann. Las muestras A1, C3 y C4 contienen proteínas de roedores. Las muestras C3 y C4 corresponden a actina, la cual muy probablemente provenga de las células en cultivo.

La proteína correspondiente con la muestra A1 fue identificada como Osteonectina, también conocida como SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cistein*). Esta muestra presenta un punto isoeléctrico estimado de 4,87 y un peso molecular nominal de 35 KDa, con una puntuación de 495 y una cobertura de la secuencia de un 33%. La puntuación corresponde a $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la correspondencia observada responde a un evento aleatorio. Puntuaciones de proteínas mayores a 66 son significativas ($p < 0,05$).

Muestra	PI estimado	Peso Molecular nominal (Da)	Proteína	Puntuación Coverage	Acceso Gi
A1	4.87	35087	Osteonectin [Rattus Norvegicus]	495 Secuencia: 33%	gi 600381

Tabla 8. Identificación de SPARC/Osteonectina. Datos asociados a la identificación de la muestra A1 con la proteína SPARC/Osteonectina, mediante espectrometría de masa.

Estudios en modelos animales han demostrado que SPARC es una proteína involucrada en el desarrollo normal de *C. elegans* y *X. laevis* (Purcell et al., 1993; Fitzgerald and Schwarzbauer, 1998). Por el contrario, los ratones deficientes de SPARC no presentan diferencias al momento de nacer, tras lo cual desarrollan principalmente cataratas, sin afectación evidente en el sistema nervioso (Gilmour et al., 1998; Yan and Sage, 1999). Adicionalmente, se ha descrito que SPARC se distribuye en el sistema nervioso en desarrollo como en el adulto (Mendis and Brown, 1994; Mendis et al., 1995; Vincent et al., 2008), promueve el desarrollo y crecimiento de neuritas (Bampton et al., 2005; Au et al., 2007; Ma et al., 2009; Ma et al., 2010), y que incrementa su expresión tras un daño en el tejido nervioso (Mendis et al., 1998; Liu et al., 2005). Todas estas evidencias nos motivaron a estudiar el efecto de esta proteína matricelular en la neurotransmisión.

Antes de comenzar a estudiar la acción de SPARC en la transmisión sináptica, comprobamos la presencia de esta proteína en la condición control. Mediante *Western Blot* comprobamos que el medio de cultivo de las neuronas, el cual contiene un 2,5% de suero de rata y un 2,5% de suero fetal de bovino (MS), nos aporta una concentración basal de SPARC entre 0,1 y 0,3 nM. Mediante la técnica de ELISA indirecto se cuantificó la concentración de SPARC, siendo ésta de $0,10 \pm 0,03$ nM (promedio \pm SEM, n=5). Al usar un kit de ELISA, que emplea el método “sándwich ELISA”, la concentración cuantificada fue de $0,04 \pm 0,01$ (promedio \pm SEM, n=5). Considerando los valores obtenidos por ambos métodos, podemos afirmar que la concentración promedio de SPARC en el medio de cultivo con suero es de $0,07 \pm 0,02$ nM (figura 36).

A su vez, los medios condicionados por las células de glía periférica presentan concentraciones mayores a 1 nM de SPARC, al cuantificar por *Western Blot*. La concentración estimada por ELISA indirecto fue de $0,93 \pm 0,15$ nM (promedio \pm SEM, $n=3$), por lo que los MC-Sc presentan una concentración de un orden de magnitud mayor a la basal (figura 36). La cuantificación de SPARC presente en los medios de cultivos, no se pudo determinar con el kit comercial, ya que no se observó una respuesta creciente al incremento de la concentración de la proteína recombinante.

Con estos resultados concluimos que las concentraciones de SPARC secretadas por las células gliales, serían del orden nanomolar.

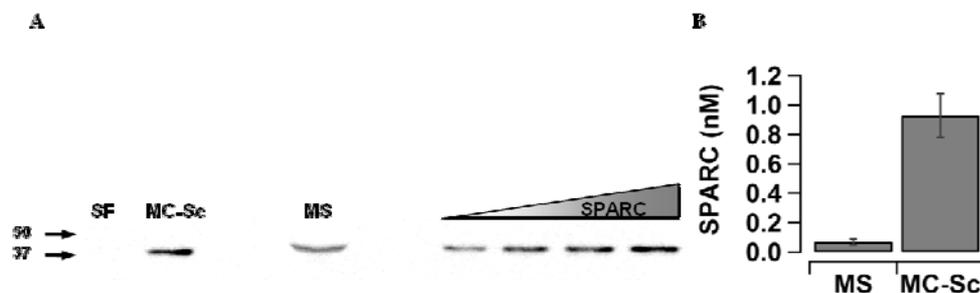


Figura 36. Cuantificación de SPARC en medios condicionados por células de Schwann.

A. Cuantificación de SPARC por *Western Blot*. SF: medio de cultivo sin suero. MC-Sc: medio de cultivo sin suero condicionado por células gliales periféricas. MS: medio de cultivo con 2,5% de suero de rata y 2,5% de suero fetal de bovino. SPARC: SPARC recombinante de ratón aplicada a 5 ng, 10 ng, 15 ng y 20 ng por carril, usado como estándar. **B.** Cuantificación de SPARC por ELISA. MS = $0,07 \pm 0,02$ nM. MC-Sc = $0,93 \pm 0,15$ nM. (promedio \pm SEM). Para SF no se pudo determinar la concentración.

3 Purificación de SPARC

Una vez identificado SPARC como proteína candidata, los experimentos planteados fueron estudiar el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión, empleando los SCM. Además de este estudio, surgió la necesidad de poner a punto un método que sirviese para purificar SPARC o cualquier otra proteína presente en los medios condicionados; poniéndose a punto un método de purificación de SPARC a partir de medio condicionado por la línea celular PYS-2 (materiales y métodos), reproduciendo y efectuando algunas modificaciones al protocolo descrito por Sage y colaboradores (Sage et al., 1989; Sage, 2003).

El establecimiento del protocolo y de las condiciones óptimas para la separación y purificación de esta proteína matricelular, se realizó con albúmina de suero bovina comercial (Sigma) y SPARC recombinante (R&D system, Minneapolis, EE.UU., ref: 942-SP), empleadas como referencias (fig. 37 y fig. 41), y medio condicionado por células PYS-2 cultivadas en dos flascos de 75 cm². La obtención del medio condicionado y la precipitación de las proteínas presentes en el mismo, se efectuó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, tras lo cual el medio condicionado resultante fue analizado mediante electroforesis de gel de poliacrilamida con tinción de proteínas por Coomassie y por la técnica de *Western blot* (fig. 37), utilizando como referencia la proteína SPARC recombinante.

Se puede observar como SPARC se identifica como una banda en torno a los 40 KDa de peso molecular tanto en el medio condicionado como en la proteína recombinante. El límite de detección se ubica en los carriles en donde se han aplicado 5 y 10 µL de muestra. La banda de proteína que se observa en torno a los 75 KDa, podría corresponder a albúmina, de forma similar a resultados obtenidos por otros autores (Sage, 2003). Los controles contienen BSA porque la casa comercial recomienda disolver la proteína recombinante en PBS en presencia de albúmina de suero al 0,1% (p/v). Partiendo de un stock de SPARC, a una concentración de 100 µg/mL, la cantidad de BSA en los carriles es de 0,1; 0,25; 0,5 y 1 µg de albúmina.

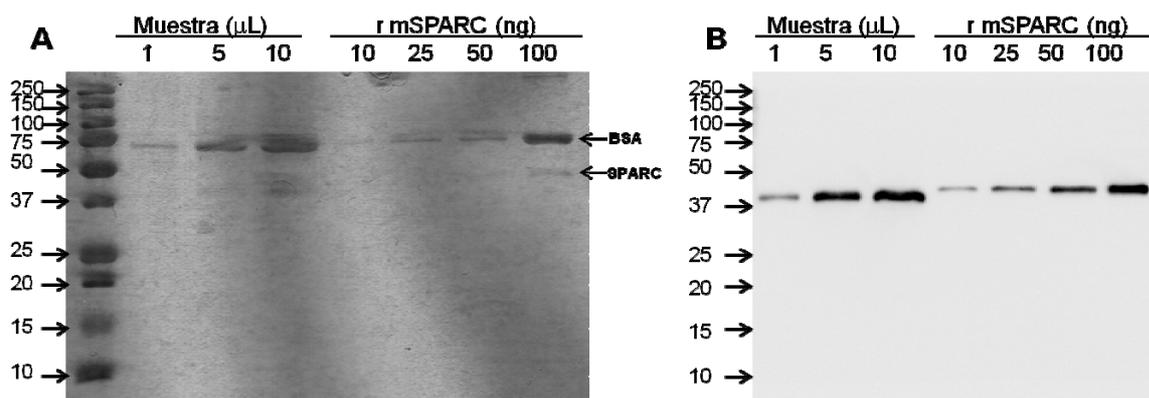


Figura 37. Análisis de medio condicionado por células PYS-2. A) Análisis de 1, 5 y 10 µL de medio condicionado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, la visualización de las proteínas se realizó mediante tinción de Coomassie. Nótese la presencia de una banda próxima a los 40 KDa, apreciable al aplicar 5 y 10 µL de muestra. B) Análisis mediante *Western blot* contra SPARC, en donde se identifica la banda de 40 KDa, como SPARC. Muestra: aplicación de medio condicionado al gel de poliacrilamida; 1 = 1 µL; 5 = 5 µL; 10 = 10 µL. r mSPARC: proteína SPARC recombinante utilizada como referencia; 10 = 10 ng/carril; 25 = 25 ng/carril; 50 = 50 ng/carril; 100 = ng/carril.

Tras comprobar que las células PYS-2 secretan SPARC al medio de cultivo, y que podemos identificar esta proteína mediante *Western blot*, el siguiente paso fue el establecimiento de las condiciones óptimas para la separación, primero por cromatografía de intercambio iónico mediante columna cromatográfica con una matriz estacionaria de dietilaminoetanol (DEAE) - sefarosa., seguido de una cromatografía de exclusión (materiales y métodos).

El primer paso consistió en la inyección de una muestra de albúmina de suero disuelta en tampón DEAE (ver materiales y métodos) a distintas concentraciones, para determinar la sensibilidad de este paso. El pico de BSA obtenido es muy similar a lo descrito por Sage y colaboradores en 1989 (Sage et al., 1989).

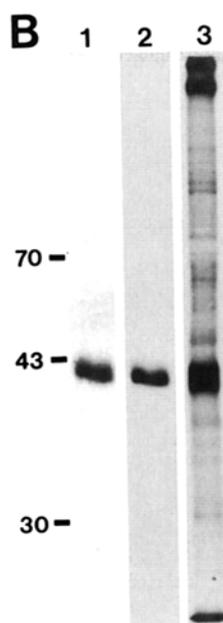
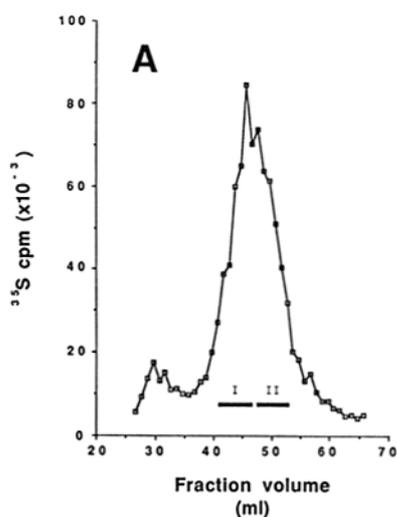


Figura 38. Purificación de SPARC (modificado de (Sage et al., 1989)). SPARC marcada con [^{35}S]-metionina fue aislada de medio de cultivo de células PYS, mediante precipitación por sulfato de amonio y cromatografía por una columna DEAE-celulosa. La fracción enriquecida en SPARC fue posteriormente purificada en TBS por una columna sefadex G-200 a 4° C. **A)** Perfil de elución que muestra dos subfracciones en el pico más grande. La subfracción II contiene la preparación más homogénea de SPARC. **B)** Análisis de la subfracción II mostrada en A, en un gel de poliacrilamida al 10%. Línea 1: tinción con Coomassie; línea 2: gel detectado por autoradiografía. Línea 3: autoradiografía de proteínas marcadas con [^{35}S]-metionina, secretadas por las células PYS antes de la purificación. Los pesos moleculares se indican a la izquierda del gel.

El siguiente paso consistió en la separación de SPARC de un medio condicionado por células PYS-2. Tras el primer paso de la purificación, con el fin de establecer el gradiente de elución con el tampón B óptimo para la separación de las fracciones enriquecidas en SPARC. El gradiente se aplicó a partir de los 10 minutos, en dos pasos: se incrementó del 1% al 17% B desde los 11 a los 20 minutos, para luego alcanzar el 100% B a los 150 minutos.

En la figura 39 podemos observar el cromatograma resultante, con el respectivo análisis de fracciones por *Western blot* determinándose que SPARC se encuentra en las fracciones 5 y 6, observando que la fracción 5 es la más enriquecida en SPARC.

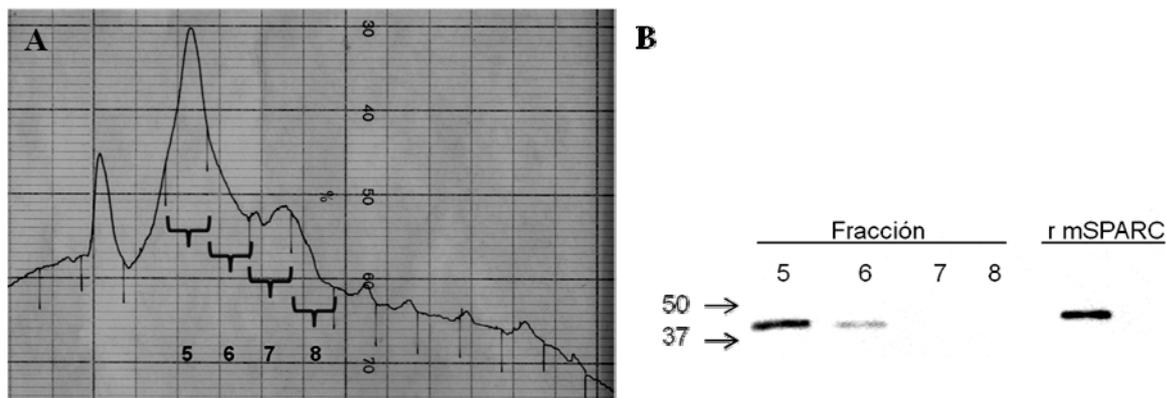


Figura 39. Cromatograma de intercambio iónico de medio enriquecido en SPARC (I). A) Cromatograma obtenido al correr una muestra de 200 μ L de medio condicionado por células PYS-2. Los números en la base del cromatograma indican el número de fracción. Los corchetes señalan las fracciones 5 - 8. La sensibilidad del registrador gráfico se ajustó a 20 mV, la velocidad de papel a 1 mm/min y las fracciones se recogieron cada 10 minutos. B) *Western blot* de las fracciones 5 - 8 obtenidas tras la cromatografía. Como referencia se empleó 20 ng de proteína recombinante (r mSPARC). A la izquierda se señalan los pesos moleculares.

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que SPARC empieza a eluir cuando el tampón B se encuentra en un 30% aproximadamente. Para poder obtener una mejor separación y aislamiento de las fracciones enriquecidas en SPARC, se modificó el gradiente de elución, pasando de un 17% B en el minuto 20, a un 70%B a los 100 minutos. Con este gradiente SPARC eluye en la sexta fracción (fig. 40). Tras repetir estas condiciones en forma independiente en dos experimentos más, pudimos determinar que SPARC eluye cuando el porcentaje del tampón B está entre el 36 y el 38%, obteniendo un cromatograma que se asemeja al descrito por Sage y colaboradores (ver figura 38)

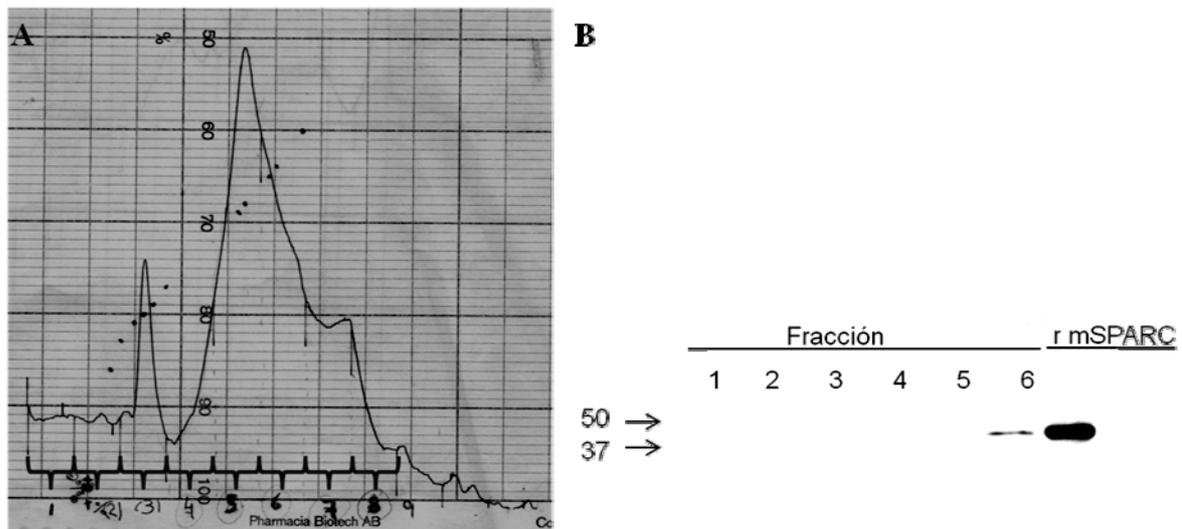


Figura 40. Cromatograma de intercambio iónico de medio enriquecido en SPARC (II). A) Cromatograma obtenido al correr una muestra de 200 μ L de medio condicionado por células PYS-2. Los números manuscritos en la base del cromatograma indican el número de fracción. Los puntos dibujados a partir de la segunda fracción, corresponde al gradiente de porcentaje del tampón B. Los corchetes señalan las fracciones 1 - 8. La sensibilidad del registrador gráfico se ajustó a 20 mV, la velocidad de papel a 1 mm/min y las fracciones se recogieron cada 10 minutos. B) *Western blot* de las fracciones 1 - 8 obtenidas tras la cromatografía. Como referencia se empleó 100 ng de proteína recombinante (r mSPARC). A la izquierda se señalan los pesos moleculares.

Una vez optimizada la cromatografía de intercambio iónico, continuamos con la cromatografía de exclusión de las fracciones en donde se ha recogido el SPARC (materiales y métodos) porque en estas condiciones, el SPARC eluye junto a otras proteínas tales como laminina y BSA (Sage et al., 1989). Como primer paso, realizamos un cromatograma de prueba para separar una mezcla de nuestras proteínas de interés, la muestra consistió en 15 μ L de albúmina de bovino (4 mg/mL) y 25 μ L de SPARC (1 μ g/mL). En el cromatograma mostrado en la figura 38, se aprecian dos picos claros, el primero de los cuales correspondería a la albúmina, por tener un peso molecular más alto respecto a la masa de SPARC, que eluye más tarde. Al realizar una cromatografía de exclusión para la sexta fracción obtenida en el paso anterior, la fracción enriquecida en SPARC, no se observa nada, a pesar que la fracción ha sido concentrada 20 veces. Este resultado podría deberse a una falta de sensibilidad en la detección y/o a que la concentración de SPARC en la muestra fracción no es lo suficientemente alta como para ser detectada, por consiguiente se realizó el mismo proceso pero partiendo de mayor cantidad de medio condicionado por las células PYS-2

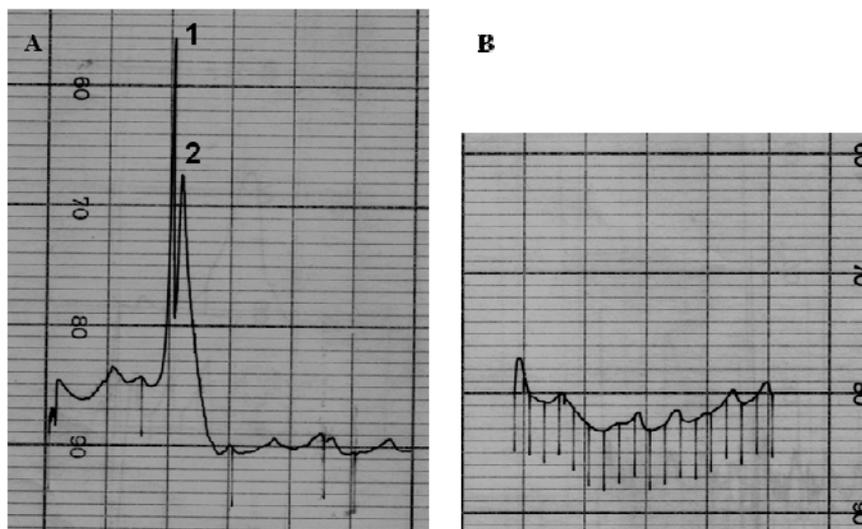


Figura 41. Cromatografía de exclusión. A) Separación de una mezcla de albúmina y SPARC estándar, consistente en 15 μL de albúmina de bovino (4 mg/mL) y 25 μL de SPARC (1 $\mu\text{g/mL}$) en tampón TBS-Ca. **1:** pico correspondiente a una proteína de mayor peso molecular, que pertenecería a la albúmina; **2:** pico correspondiente a una proteína de menor peso molecular, que pertenecería a SPARC. B) Separación de la fracción 6 obtenida en la cromatografía de intercambio iónico, concentrada 20 veces. El flujo se ajustó a 0,08 ml/min y el registrador gráfico a una sensibilidad de 0,1 V.

Nuestro siguiente paso fue la obtención de una mayor cantidad de medio de cultivo enriquecido en SPARC, por lo que recogimos el medio condicionado de células PYS-2 cultivadas en 20 placas de cultivo de 150 cm^2 , obteniendo un volumen de partida 20 veces mayor, unos 300 mL.

Después de realizar la precipitación de las proteínas del medio, el precipitado fue resuspendido en 10 mL finales de tampón DEAE (tampón A), inyectándose 1 mL de muestra por la columna de intercambio iónico DEAE-sefarosa. En la cromatografía de intercambio iónico se observaron 4 picos tras el inicio del gradiente de elución (fig. 42). El análisis por *Dot blot* reveló que SPARC se recogió en las fracciones 10, 11, 12 y 13 (fig. 43).

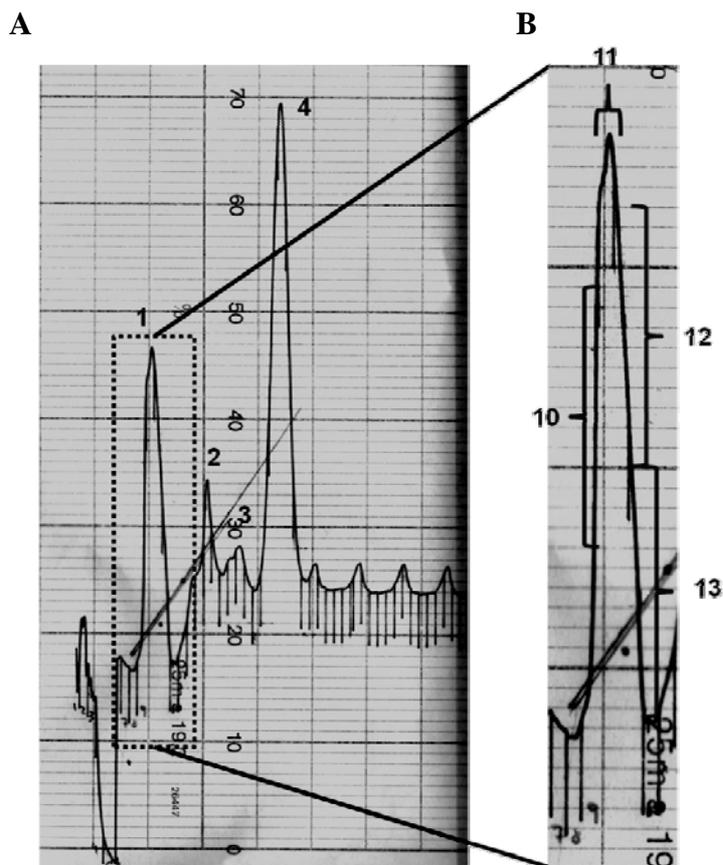


Figura 42. Cromatograma de intercambio iónico de medio enriquecido en SPARC (III). Cromatograma obtenido al correr una muestra de 1 mL de medio condicionado por células PYS-2 en una columna cromatográfica de DEAE-sefarosa. Los números manuscritos en la base al inicio del cromatograma indican el número de fracción. Se pueden observar la aparición de cuatro picos luego de comenzar con el gradiente de elución, numerados del 1 al 4. **B)** Ampliación de la zona del cromatograma señalado con el recuadro en A, correspondiente al primer pico. Los corchetes señalan las fracciones 10 - 13. La sensibilidad del registrador gráfico se ajustó a 100 mV, la velocidad de papel a 0,5 mm/min y las fracciones se recogieron cada 5 minutos.

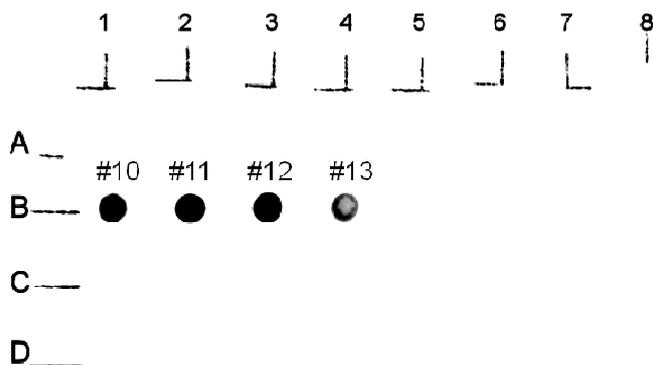


Figura 43. Dot blot contra SPARC. Identificación de SPARC en las fracciones 2 - 33 obtenidas mediante cromatografía por columna DEAE-sefarosa, en las que se recogieron los cuatro picos mostrados en el cromatograma de la figura 42. Nótese que las posiciones B1 - B4, que corresponde a las fracciones 10 - 13, dan una señal positiva para SPARC.

Tras la separación por intercambio iónico, las fracciones enriquecidas en SPARC (fracciones 10-13) se juntaron en una sola muestra, la cual se analizó por cromatografía de exclusión molecular. En el cromatograma resultante se aprecian claramente dos picos entre las fracciones 6 y 14 (fig. 44). El análisis por *Dot blot* y *Western blot* (fig. 45) nos muestran que SPARC se recogió en las fracciones 10 - 13, siendo la fracción 11 la más enriquecida en SPARC.

Al observar las proteínas presentes en las fracciones analizadas, mediante gel de poliacrilamida al 12% y con tinción de plata (fig. 46), apreciamos que las fracciones 7 - 9 presentan mayoritariamente una banda de proteína con un peso molecular en torno a los 70 KDa, que correspondería a albúmina; esta banda se encuentra presente en todas las muestras. Sin embargo, las fracciones 10 - 13 presentan una banda claramente visible, con un peso molecular cercano a los 40 KDa, la cual se corrobora como SPARC mediante *Western blot* (fig. 45). En la fracción 14 también se observa la banda en torno a los 40 KDa, pero mucho más débil.

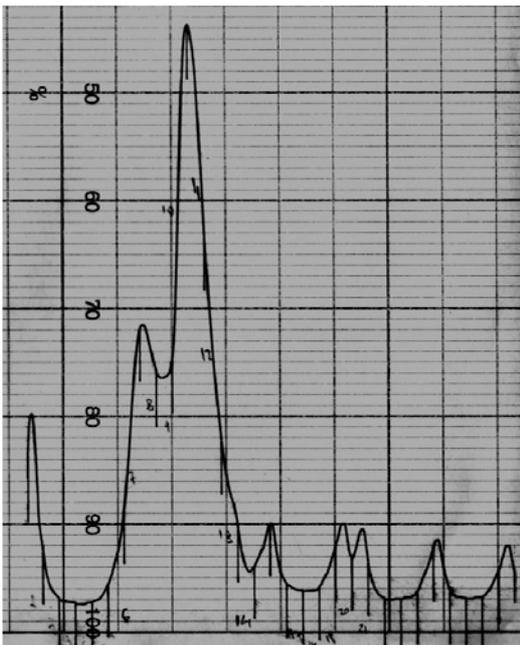


Figura 44. Cromatografía de exclusión. Separación de la fracción 10 - 13 obtenida en la cromatografía de intercambio iónico (III), concentrada 20 veces. Los números manuscritos corresponden al número de las fracciones. El flujo se ajustó a 0,06 ml/min, el registrador gráfico a una sensibilidad de 0,1 V, la velocidad del papel a 1 mm/min. Las fracciones se recogieron cada 3 minutos.

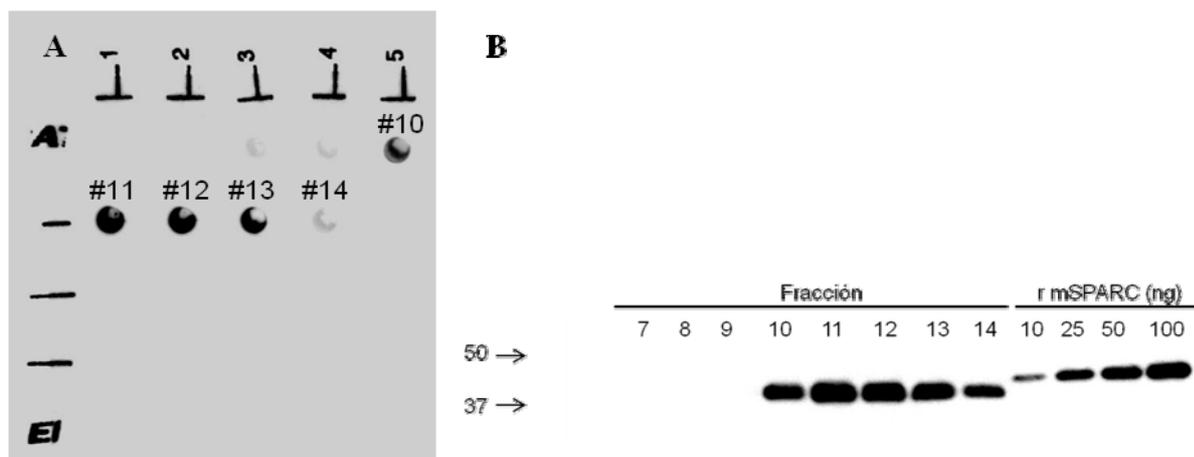


Figura 45. Identificación de las fracciones que contienen SPARC en cromatografía de exclusión. A) Imagen del *Dot blot* realizado a las fracciones indicadas en A. Nótese que las fracciones #10 - #13 presentan una señal mayor para SPARC. B) *Western blot* para las fracciones #7 - #14, con el cual se corroboran la presencia de SPARC en las fracciones.

Posteriormente, cuantificamos la cantidad de SPARC purificada con este método, mediante *Western blot*, empleando una curva de calibración con los valores de concentración y las densidades ópticas relativas obtenidas para r mSPARC, e interpolando los valores de SPARC presente en las muestras. Al sumar las fracciones 10 - 14, obtenidas por en la cromatografía de exclusión, la cantidad de SPARC total obtenida es de 7,88 μg , y su concentración es de 14,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con una pureza del 60%, calculada a partir del gel de poliacrilamida (fig. 46). Los cálculos para cada fracción se muestran en la tabla 9.

A	B	C	D	E
Fracción	Area	SPARC /carril (ng)	SPARC/ fracción (ng)	[SPARC] fracción
10	827,15	80,49	0,89	8,05
11	4287,03	331,33	3,64	33,13
12	1714,31	144,81	1,59	14,48
13	1396,84	121,79	1,34	12,18
14	245,26	38,30	0,42	3,83

Tabla 9. Estimación de la cantidad de SPARC purificado. A) número de la fracción. B) Área de la señal de SPARC estimada en el *Western blot*. C) Cantidad de SPARC por carril, en nanogramos, correspondiente a los 10 μL cargados. D) Cantidad de SPARC presente en la fracción, considerando que el volumen de esta es de 110 μL aprox. E) Concentración de SPARC por fracción, en mg/mL.

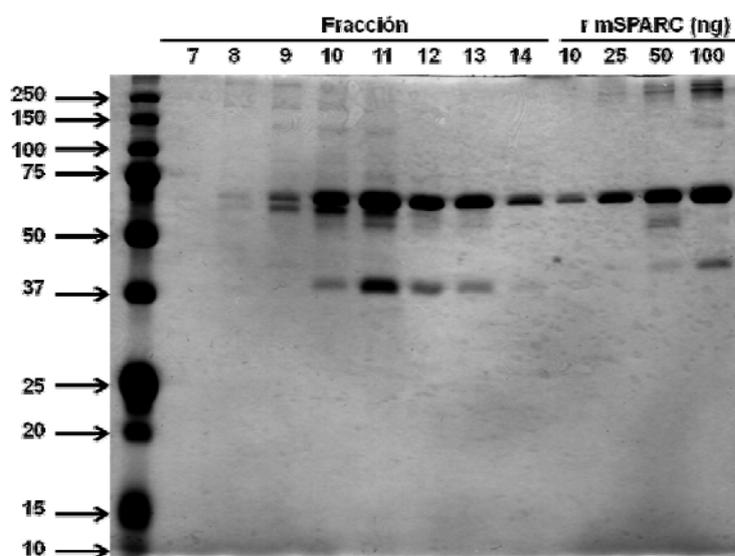


Figura 46. Gel de acrilamida con tinción de plata. Las proteínas presentes en las fracciones 7 - 14, fueron visualizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, con tinción de plata.

Si consideramos que esta cantidad ha sido purificada a partir de sólo un 10% del total de medio condicionado inicial, podemos estimar que a partir del medio de cultivo enriquecido correspondiente a 20 placas de cultivo de 150 cm², podríamos purificar aproximadamente 80 ug de SPARC. Variaciones de este método se podrían aplicar a otras proteínas secretadas por la glía en cultivo, tales como trombospondina, hevin, etc.

4 Efecto de SPARC sobre la neurotransmisión evocada y espontánea

La purificación de SPARC y el análisis del efecto de esta proteína sobre la neurotransmisión se hicieron en paralelo, por lo que el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión, se realizó con SPARC recombinante de ratón disponible comercialmente (r_mSPARC, R&D systems, identificador UNIPROT **P07214**). La proteína recombinante es un 95,8% idéntica y un 97,5% similar a SPARC de rata (número de acceso NCBI PROTEIN GI:600381), al comparar la secuencias con el programa *online* del Instituto Bioinformático Europeo (EMBL-EBI) *EMBOSS Needle-Pairwise sequence alignment* (www.ebi.ac.uk/tools/psa/emboss_needle/), cifras que concuerdan con valores previamente publicados (Brekken and Sage, 2000) . Estudios previos han demostrado que tanto SPARC humana y de ratón, que poseen una identidad del 92%, presentan una actividad biológica similar, tanto en la estimulación del crecimiento de neuritas como en la afinidad por el colágeno (Nischt et al., 1991; Maurer et al., 1995; Au et al., 2007). Todos estos antecedentes, junto a la disponibilidad comercial de la proteína, nos motivaron a emplear rmSPARC en nuestros estudios.

El análisis del efecto de SPARC sobre la neurotransmisión se realizó sobre SCMs. Las características de este tipo de microcultivos nos permitieron aplicar concentraciones nanomolares de SPARC, sin interferencia de la glía. La aplicación de SPARC se realizó durante el desarrollo de los microcultivos. Una vez registrados los microcultivos se les realizó un marcaje con DAPI, previa fijación, para certificar la presencia de un solo núcleo, correspondiente a la neurona, descartándose todos aquellos microcultivos que presentaron más de un núcleo. Los datos del grupo control (SCMs) utilizados en la caracterización de la adición de SPARC a los microcultivos, corresponden a datos generados por el laboratorio.

Para analizar el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión se aplicaron dos concentraciones de SPARC recombinante, considerando la concentración basal de SPARC cuantificada en el medio de cultivo (ver figura 36), una concentración subnanomolar de 10 ng/mL de r_mSPARC (~0,24 nM) dos veces mayor respecto a la concentración basal del medio de cultivo; y una concentración nanomolar de 100 ng/ml de rmSPARC (~2,4 nM).

La plasticidad a corto plazo fue estudiada mediante electrofisiología, aplicando un protocolo de pulsos pareados (Zucker and Regehr, 2002b). Al aplicar pulsos pareados despolarizantes, con un tiempo de intervalo de 1 segundo, se observó que los SCM desarrollados en presencia de una concentración subnanomolar de SPARC, presentaron una recuperación de $0,82 \pm 0,03$ ($EPSC_2/EPSC_1$) (n=9), comparable con la recuperación observada para los SCMs control ($0,88 \pm 0,03$, n=22) sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos ($p > 0,05$, fig. 47A). La cinética de recuperación desde la depresión, tanto de los SCM tratados con 10 ng/mL de SPARC como la de los SCMs controles, se ajustó a una exponencial simple. Los SCMs tratados presentaron una constante de tiempo de 22 ms, comparable con los 24 ms del grupo de los SCMs control (fig. 47B).

En términos de actividad espontánea, los SCMs tratados con concentración subnanomolares de SPARC no presentaron diferencias en la actividad respecto a los controles. La frecuencia promedio de los mEPSC (minis) para los SCM tratados con 0,24 nM de SPARC fue de $0,43 \pm 0,18$ s⁻¹ (promedio \pm SEM, n=9), y para los SCM controles de $0,33 \pm 0,14$ s⁻¹ (n=18, fig. 48). La aplicación de concentraciones nanomolares de SPARC diez veces superior a la concentración basal, resultó en un incremento de la actividad espontánea de los SCMs casi 20 veces respecto al grupo SCMs control, llegando ésta a una frecuencia promedio de $5,18 \pm 2,01$ s⁻¹ (n=17). El tratamiento con SPARC, tanto a baja como a altas concentraciones, no modificó la amplitud de los minis (fig. 48).

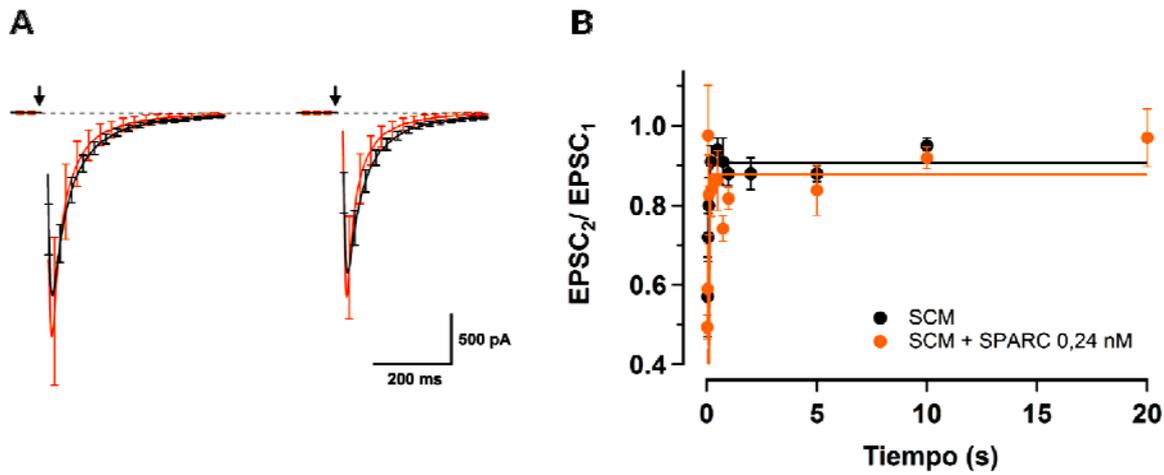


Figura 47. Acción de 0,24 nM SPARC sobre la neurotransmisión. **A)** Promedio de las respuestas evocadas por un protocolo de pulsos pareados, con 1 segundo de tiempo de intervalo, para SCM control (negro) y para SCM tratadas con 10 ng/mL SPARC (naranja). Las flechas indican la aplicación de un estímulo despolarizante. **B)** Cinética de recuperación desde la depresión para SCM control (negro) y para SCM tratadas con 10 ng/mL SPARC (naranja), al aplicar intervalos de tiempo desde 0,03 a 20 segundos. Las cinéticas de recuperación para el grupo SCM control y para el grupo SCM+SPARC 0,24 nM, se ajustan a una exponencial simple, con una constante de tiempo de 24 y 22 ms respectivamente.

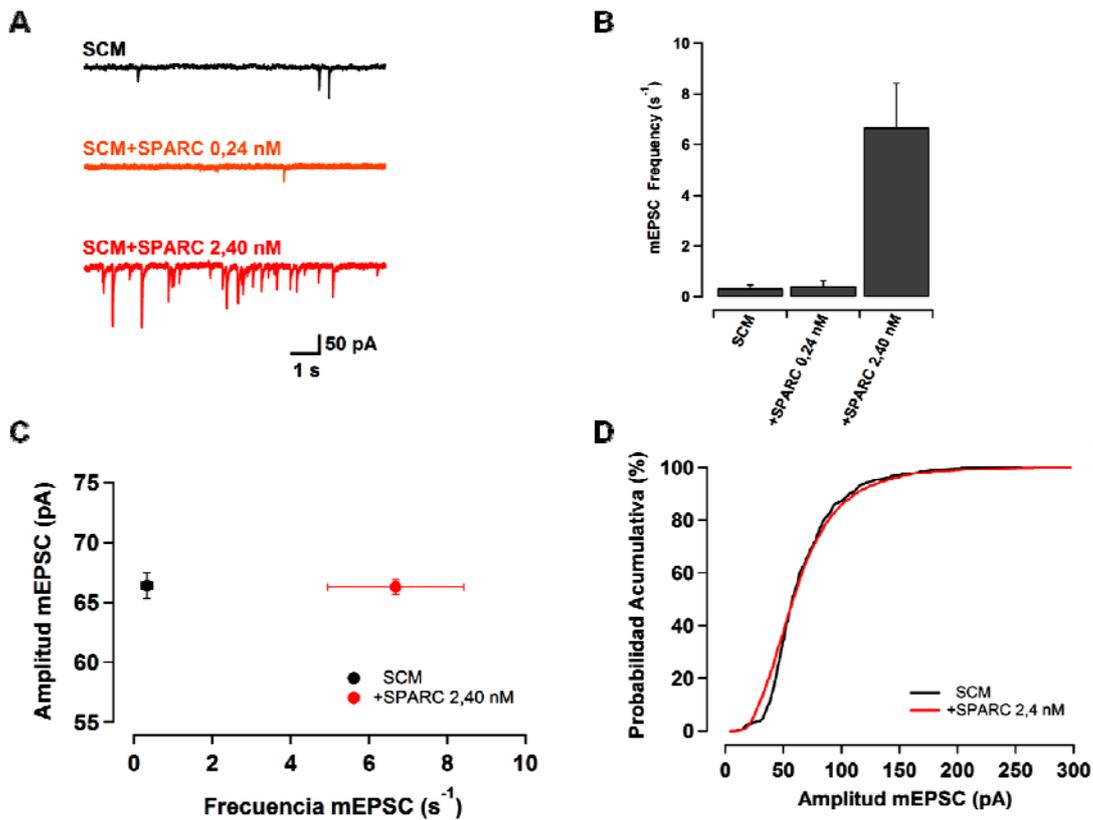


Figura 48. Efecto de SPARC sobre la actividad espontánea. **A)** Trazos representativos de actividad espontánea para los SCM control (negro), SCM tratados con 10 ng/mL SPARC (naranja) y con 100 ng/mL SPARC (rojo). **B)** Cuantificación de la frecuencia de la actividad espontánea para los tres grupos experimentales. Nótese cómo la frecuencia se ve incrementada en grupo de SCM tratadas con 100 ng/mL SPARC. **C)** Gráfica que relaciona la amplitud de los minis respecto a su frecuencia, para el grupo de SCM control (negro) y SCM + 100 ng/mL SPARC (rojo). **D)** Gráfico de la probabilidad acumulativa de las amplitudes de los minis, para el grupo SCM control y SCM + 100 ng/mL SPARC, nótese que no hay diferencias entre este grupo.

Los microcultivos desarrollados en presencia de altas concentraciones de SPARC presentaron una recuperación de $0,73 \pm 0,04$ ($n=12$) cuando se aplicó un pulso pareado con un intervalo de tiempo de 1 segundo (fig. 49A), valor significativamente menor al $0,88 \pm 0,03$, ($n=22$) observado en el grupo de los SCM control ($p < 0,05$). Adicionalmente, al estudiar la cinética de recuperación desde la depresión, observamos que la presencia de esta proteína matricelular a concentraciones nanomolares, hace que se enlentezca, ajustándose a una función de exponencial doble, con unas constantes de tiempo rápida y lenta de 45 ms y 97 s, respectivamente (fig. 49B). Junto con este efecto, también se observó un incremento en la potencia sináptica, la cual se define como la amplitud promedio de la primera corriente postsináptica excitatoria evocada al aplicar el protocolos de pulsos pareados. La potencia sináptica cambió de 2.418 ± 151 pA en el grupo de SCM control, a 3.025 ± 191 pA en los SCM desarrollados en presencia de SPARC a 2,4 nM ($n=12$).

De estos resultados podemos inferir que durante el desarrollo de los microcultivos, la presencia de SPARC a concentraciones nanomolares incrementó la frecuencia de eventos espontáneos y la depresión a corto plazo. Ambos parámetros podrían estar relacionados, ya que el aumento en la actividad espontánea podría estar dejando una menor cantidad de vesículas disponibles para liberarse, cuando se inducen las respuestas evocadas mediante la aplicación del protocolo de pulsos pareados. Si la depresión a corto plazo estuviera relacionada con el incremento de la actividad espontánea, aquellos microcultivos desarrollados en presencia 100 ng/ml SPARC que tuviesen una mayor actividad espontánea, presentarían una depresión más pronunciada.

Para estudiar esta posibilidad, relacionamos los datos individuales de la depresión a corto plazo, expresado como la recuperación de la respuesta al aplicar un pulso pareado con un segundo de tiempo de intervalo, frente a la frecuencia de la actividad espontánea. El análisis de la distribución de los datos reveló que no existe una relación, siendo la depresión a corto plazo independiente de la frecuencia de la actividad espontánea (fig. 50).

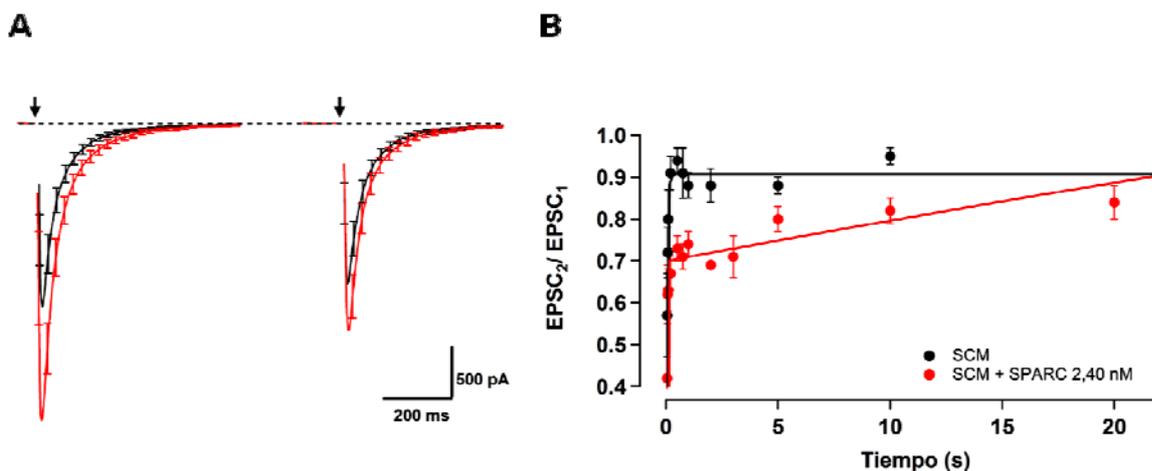


Figura 49. Acción de 2,4 nM SPARC sobre la neurotransmisión. A) Promedio de las respuestas evocadas por un protocolo de pulsos pareados, con 1 segundo de tiempo de intervalo, para SCM control (negro) y para SCM tratadas con 100 ng/mL SPARC (rojo). Las flechas indican la aplicación de un estímulo despolarizante. Nótese el incremento en la potencia y en la depresión por pulsos pareados para el grupo tratado con concentraciones nanomolares de SPARC B) Cinética de recuperación desde la depresión para SCM control (negro) y para SCM tratadas con 10 ng/mL SPARC (naranja), al aplicar intervalos de tiempo desde 0,03 a 20 segundos. La cinética de recuperación para el grupo SCM+SPARC 2,4 nM, se ajusta a una exponencial doble, con una constantes de tiempo rápida de 44,5 ms y una constante de tiempo lenta de 97,1 s.

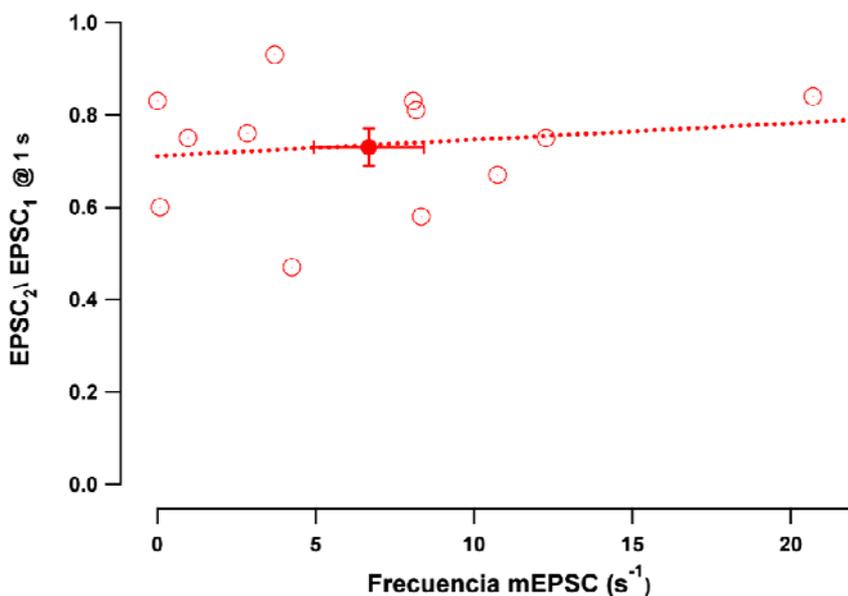


Figura 50. Relación entre recuperación frente a pulso pareado y frecuencia de la actividad espontánea. Gráfica que relaciona la recuperación del pulso pareado, a 1 segundo de intervalo de tiempo, con la frecuencia de la actividad espontánea para SCMs desarrollados en presencia de SPARC 0,24 nM. Como podemos observar, la relación entre pulsos pareados con un segundo de intervalo, es independiente de la frecuencia de los mEPSC.

5 Efecto de SPARC sobre la organización funcional de los depósitos de vesículas sinápticas

Como hemos demostrado anteriormente, concentraciones nanomolares de SPARC incrementan la depresión a corto plazo en los SCMs, cuando está presente durante el desarrollo neuronal. Dado que no encontramos ninguna relación entre el incremento de la frecuencia de la actividad espontánea y el aumento en la depresión a corto plazo, nos planteamos estudiar si la presencia de SPARC modificaba el tamaño de los depósitos de vesículas, en particular las vesículas de liberación rápida, dado que este depósito de vesículas y su vaciamiento contribuye al desarrollo de la plasticidad a corto plazo (Schneppenburger et al., 2002; Blitz et al., 2004; Xu-Friedman and Regehr, 2004; Fioravante and Regehr, 2011).

5.1 Estudio electrofisiológico

Se utilizó un tren de estímulos a 14 Hz, a una concentración de calcio extracelular de 2 mM. La aplicación de este tren de pulsos a alta frecuencia en estas condiciones, causa una depresión progresiva de la respuesta evocada, la cual es asociada mayoritariamente al vaciado de los depósitos de vesículas (Zucker and Regehr, 2002b), dicho vaciado fue cuantificado mediante la estimación de la relación entre la amplitud de la 12ª y la 1ª corriente postsináptica excitatoria. El valor promedio de este coeficiente de agotamiento para el grupo SCM control fue de $0,11 \pm 0,03$ (n=5). En base a este paradigma de estimulación se aplicaron dos protocolos diferentes para evaluar el efecto de SPARC sobre los depósitos de vesículas: 1) mediante la aplicación de dynasore, un inhibidor de dinamina, 2) mediante el cálculo del tamaño del RRP.

Para el primer protocolo se aplicaron dos trenes de estímulos a alta frecuencia, separados por 5 minutos, tras los cuales se aplicó 100 μ M de dynasore al medio extracelular y se estimuló dos veces más con un tren de estímulos a alta frecuencia (fig.51A), con el objetivo de obtener una disminución en el depósito de vesículas, ya que la endocitosis compensatoria se encuentra inhibida (Newton et al., 2006). En estas condiciones, el grupo de SCMs control presentó una disminución del 36,3% del valor promedio, hasta un $0,07 \pm 0,02$, al analizar el coeficiente de agotamiento en el segundo tren en presencia de dynasore, sin llegar a ser una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). En condiciones basales, las neuronas desarrolladas en presencia de 2,4 nM de SPARC, presentaron un coeficiente de agotamiento de $0,07 \pm 0,01$ (n=11), el cual fue muy similar al observado en el grupo de SCM control cuando se les ha reducido el

depósito de vesículas, mediante la aplicación de dynasore (fig. 51E). En la figura 51 podemos apreciar como el grupo de SCM tratados con SPARC, presentó una respuesta evocada por la aplicación de un tren de estímulos, que se asemejó a la respuesta que presentó el grupo control en presencia de dynasore.

Estos resultados nos sugieren que las neuronas desarrolladas con SPARC podrían tener un número menor de vesículas disponibles para ser liberadas, ya que en condiciones basales, presentaron un valor del coeficiente de agotamiento de un 38,2% menor respecto al grupo control, sin llegar a ser una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

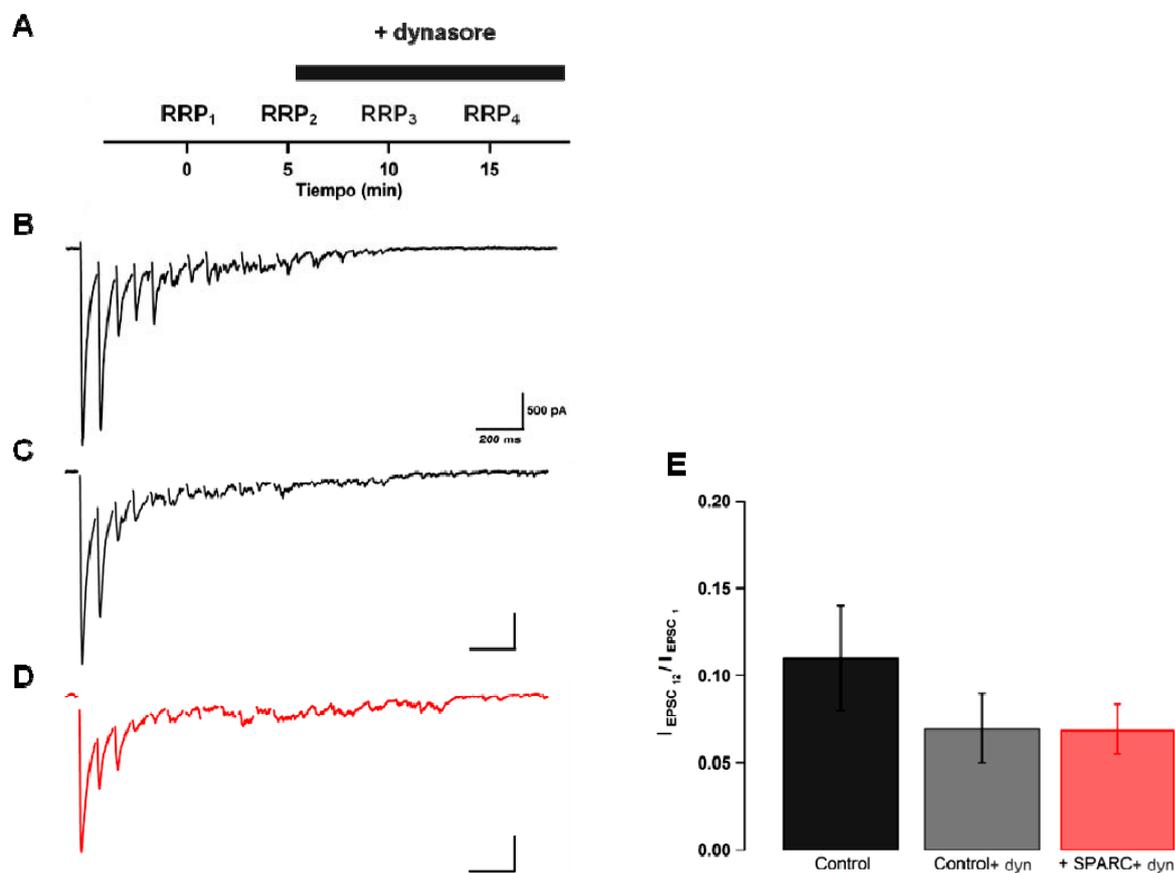


Figura 51. Estudio del agotamiento vesicular A) Protocolo de reducción del tamaño de vesículas presinápticas en SCM control. En este protocolo se aplican dos trenes de pulsos a alta frecuencia con un tiempo de intervalo de 5 minutos, como condición basal, seguido de la aplicación de dos trenes de pulsos a alta frecuencia, en presencia de dynasore. B-D) Trazos representativos de la respuesta evocada por un tren de estímulos de alta frecuencia para un SCM control en ausencia (RRP₁, B, negro) y en presencia de dynasore (RRP₄, C, gris) y para un SCM tratado con 2,4 nM de SPARC (RRP₁). Nótese que la depresión se encuentra acelerada en el SCM en presencia de dynasore y en el SCM tratado con SPARC. E) Análisis de la depresión durante un tren de estímulo para las condiciones descritas en la figura 48, mediante el cálculo del coeficiente entre la amplitud de la 12ª respuesta evocada del tren, respecto a la 1ª respuesta evocada. Las líneas de error indican sem.

Al incrementar el número de experimentos, uniendo mis observaciones a las obtenidas por los otros miembros del laboratorio considerando así todos los resultados, observamos que el grupo control presentó un coeficiente de $0,29 \pm 0,07$ ($n=17$) en condiciones basales, y un valor significativamente menor cuando se inhibió la endocitosis compensatoria ($0,08 \pm 0,01$, $n=14$, $p < 0,01$). El grupo de las neuronas tratadas con SPARC mostraron un coeficiente de $0,09 \pm 0,01$ ($n=25$), además se observó que al exponer estas neuronas al dynasore, el 50% de ellas fallaron en presentar una respuesta evocada, sugiriendo que este grupo experimental presenta una reducción en el número de vesículas disponibles para liberar (Albrecht et al., 2012). Estos resultados nos llevaron a proponer que el tratamiento con SPARC disminuyó la cantidad de vesículas disponibles para ser liberadas, presentes en el terminal presináptico.

Para estudiar si la presencia de SPARC modificó el número de las vesículas de liberación rápida, analizamos el efecto de SPARC sobre el depósito de vesículas de liberación rápida, o RRP, empleando el segundo protocolo. El RRP corresponde a aquellas vesículas del terminal presináptico que se encuentran acopladas a la zona activa, las cuales se liberan rápidamente frente a una estimulación (Denker and Rizzoli, 2010).

5.2 Estudio de electrofisiología y microscopía confocal correlativa.

El tamaño del RRP se puede determinar electrofisiológicamente (Sakaba et al., 2002), mediante la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia, el cual causa una depresión progresiva en la respuesta evocada. Para estimar el tamaño del RRP, se representa la amplitud acumulativa de las respuestas evocadas a través del tiempo, observándose una fase estacionaria tras la depresión, y se ajusta una función lineal en la fase estacionaria y se realiza una extrapolación hacia el eje de las ordenadas a tiempo cero, dándonos una estimación del tamaño del RRP (fig. 52). Este método ha sido empleado en distintas sinapsis: cáliz de Held (Schneggenburger et al., 1999), en sinapsis hipocámpales en microcultivos (Otsu et al., 2004) y en la unión neuromuscular (Millar et al., 2002).

Empleando este método, inicialmente encontramos que ambos grupos experimentales presentaban un tamaño de RRP comparables entre si. Si bien la aplicación de SPARC redujo el tamaño promedio de RRP en un 23%, en donde el RRP estimado para los SCMs tratados con SPARC 2,4 nM fue de 4.256 ± 398 pA ($n=18$), siendo un valor menor respecto a los 5.526 ± 738

pA ($n=20$) estimados para el RRP del grupo control, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0,14$). El tamaño de RRP medido con este método hace referencia a toda la población de sinapsis registradas, lo que no necesariamente implica un mismo número de sinapsis en ambas condiciones. La disminución en el tamaño del RRP total observado al tratar las neuronas con la proteína matricelular se podría deber a que este grupo presentó un terminal presináptico con el mismo tamaño de RRP respecto al control, pero en menor cantidad, o por el contrario, que tuviese el mismo número o un número mayor de terminales presinápticos pero con un valor individual de RRP menor. Para explorar estas posibilidades y para estimar el número de vesículas que forman el RRP de una autapsis individual, realizamos experimentos correlativos de electrofisiología y microscopía confocal.

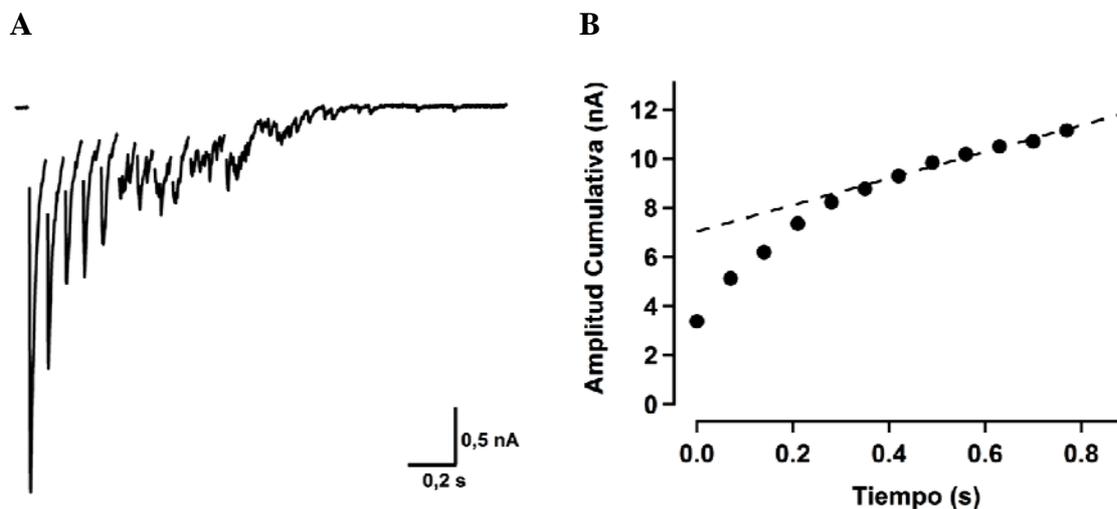


Figura 52 Cálculo del tamaño del RRP mediante la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia. A) Un tren de 12 pulsos despolarizantes, aplicado a una frecuencia de 14 Hz, sobre un SCM control, a una concentración de calcio extracelular de 2 mM. Nótese como se desarrolla una depresión progresiva. B) Gráfica de las amplitudes evocadas acumulativas en función del tiempo de estimulación aplicado. El primer punto de la gráfica corresponde a la amplitud de la primera respuesta evocada, el segundo punto corresponde a la suma de las amplitudes de la primera y de la segunda respuesta evocada, etc.

Para este grupo de experimentos, la neurona fue fijada en paraformaldehído, inmediatamente después del registro electrofisiológico, y marcada para las proteínas presinápticas bassoon, una proteína del citoesqueleto de la zona activa, y sinaptofisina, un marcador de vesículas presinápticas (fig. 53). La cuantificación de los terminales presinápticos ubicados en la región del soma, que se realizó según lo descrito en materiales y métodos, nos proporcionó una estimación del número de terminales que participan mayoritariamente en las respuestas evocadas. Los terminales presinápticos ubicados en los procesos dendríticos, no fueron considerados porque

la contribución de las sinapsis localizadas en estos procesos se ve disminuida por la limitación espacial de la fijación del voltaje y porque las corrientes sinápticas en las dendritas son filtradas progresivamente por las propiedades resistivas y capacitativas de la membrana dendrítica (Williams and Mitchell, 2008). Como podemos observar en la figura 54, el número de sinapsis axosomáticas entre los microcultivos fue variable, las cuales se distribuyeron dentro de un rango entre 8 y 55 sinapsis, con un promedio de 23 ± 3 sinapsis para el grupo control. El siguiente paso fue representar el tamaño del RRP obtenido mediante la aplicación del tren de estímulos, contra el número de terminales axosomáticos para cada neurona registrada. La relación entre estos dos valores nos da una estimación del aporte de una autapsis individual al total del RRP calculado (fig. 54).

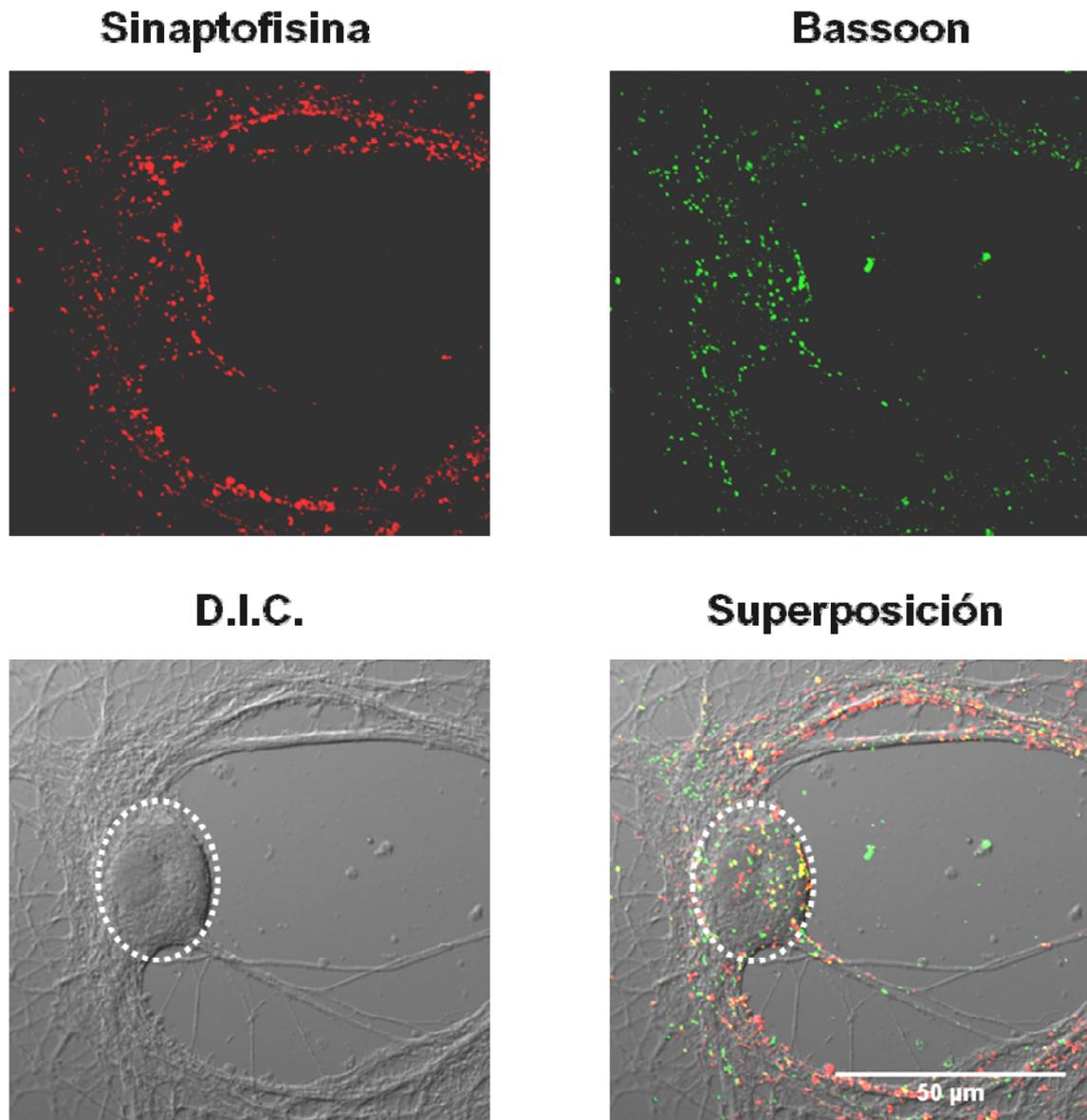


Figura 53 Cálculo del tamaño del número de terminales presinápticos. Proyecciones de secciones de confocal, obtenidas de una neurona registrada y marcada para sinaptofisina (rojo) y bassoon (verde). El área correspondiente al soma de la neurona se señala con un círculo blanco y fue delimitado en la imagen de la imagen de contraste de fase.

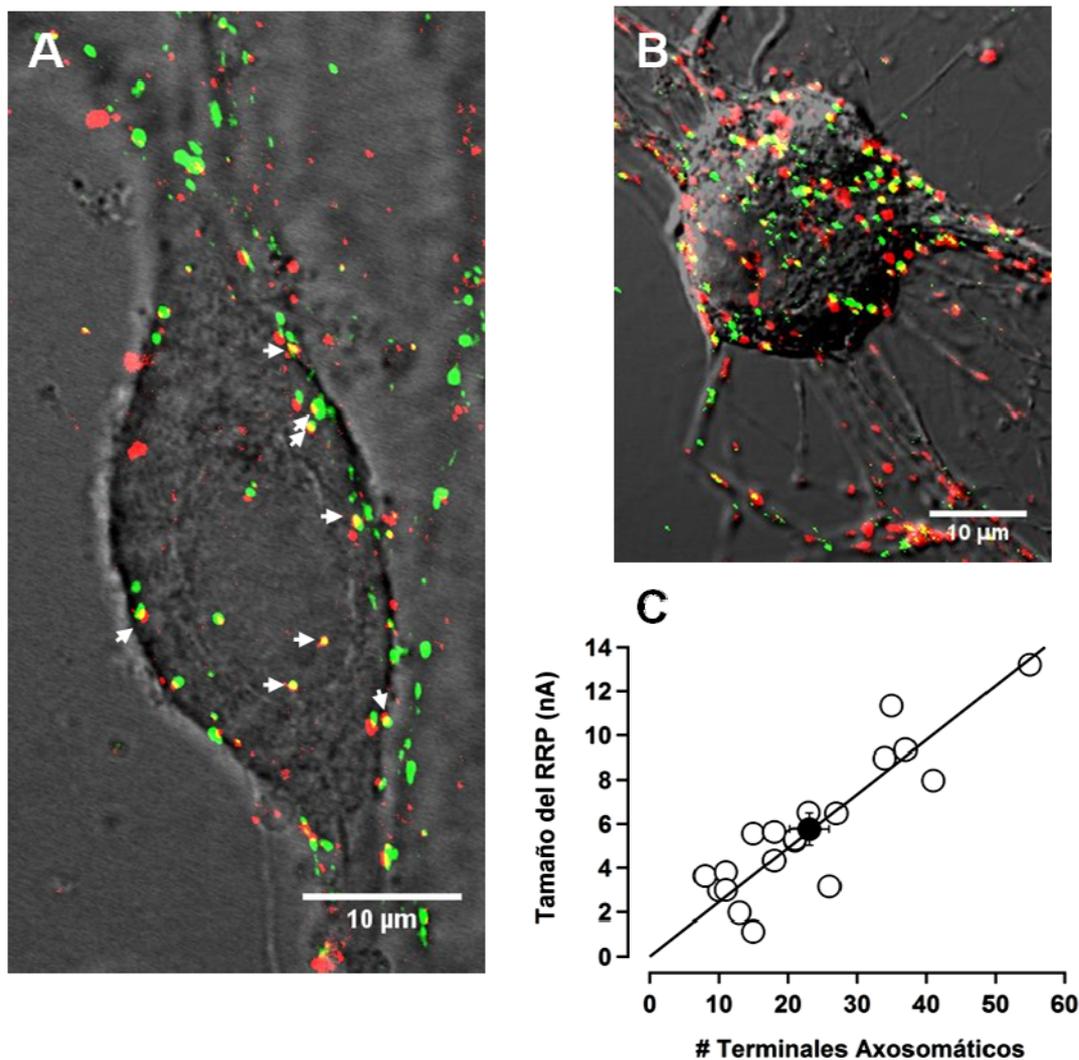


Figura 54. Distribución de sinapsis axosomáticas. **A)** Microcultivo del grupo control en el cual se cuantifica un bajo número de sinapsis axosomáticas, señaladas por las flechas blancas. **B)** Microcultivo del grupo control con un mayor número de sinapsis axosomáticas, respecto a la señalada en A. **C)** Representación gráfica entre la relación el tamaño del RRP obtenido mediante la aplicación del tren de estímulos, contra el número de terminales axosomáticos, correspondiente para el grupo SCM control. La distribución de los valores individuales, se ajustan a una función lineal.

Los microcultivos tratados con 2,4 nM SPARC, presentaron un número de sinapsis variable, entre 10 y 58 sinapsis axosomáticas, con un promedio de 29 ± 3 sinapsis axosomáticas, lo que representó un incremento de un 25,7% en el número de terminales presinápticos ubicados en el soma, diferencia que no es estadísticamente significativa respecto al promedio de 23 ± 3 terminales axosomáticos cuantificados en el grupo SCM control ($p=0,2$). Por lo tanto, las neuronas tratadas con SPARC presentan un tamaño promedio de RRP menor y un número de sinapsis axosomáticas promedio mayor respecto a las neuronas que conforman el grupo control, aunque estos valores son comparables entre los grupos ya que las diferencias no son

estadísticamente significativas. Al representar en un gráfico los valores individuales del tamaño de RRP respecto al número de sinapsis axosomáticas, observamos que el grupo SCM control y el grupo de neuronas tratadas con SPARC se distribuyen en dos poblaciones, las cuales se ajustan a dos funciones lineales independientes entre sí (fig. 55). El valor de la pendiente de estas funciones, nos proporcionan una estimación de la contribución de una autapsis individual al valor total del tamaño del RRP, así obtenemos que una autapsis el grupo SCM control contribuye con 245 pA ($r = 0,89$), y que una autapsis de las neuronas desarrolladas en presencia de SPARC, contribuyen con casi la mitad de este valor, 134 pA ($r = 0,67$).

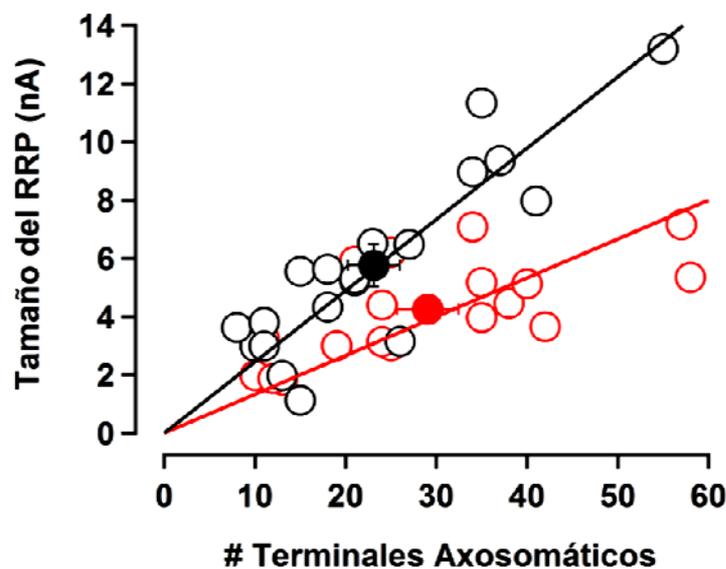


Figura 55. SPARC reduce el tamaño de RRP, medido electrofisiológicamente. Gráfico entre el tamaño del RRP contra el número de terminales axosomáticos. El grupo de SCM control (negro) y el del grupo de SCM desarrollados en presencia de 2,4 nM SPARC (rojo) se ajustan a dos funciones lineales independientes, cuya pendiente determina que un terminal axosomático individual contribuye con 245 pA y 134 pA, respectivamente. Círculos sólidos corresponden al valor promedio \pm el error estándar para cada grupo

Asumiendo que: 1) las sinapsis visualizadas son una población homogénea, por ejemplo contienen un número parecido de vesículas en sus depósitos, y 2) considerando que la liberación de una sola vesícula genera una corriente con una amplitud promedio de 66 pA para ambos grupos (fig. 48), podemos estimar el valor de RRP para una sola autapsis, dividiendo el valor de la pendiente obtenido para cada grupo experimental por el valor de la amplitud promedio de un mini, obtenemos que el tamaño de RRP para una autapsis del grupo SCM control contienen 4

vesículas. El tamaño se ve disminuido a la mitad en el grupo de SCM + 2,4 nM SPARC; donde una autapsis presenta un tamaño de RRP de 2 vesículas.

El cálculo del tamaño de RRP mediante la aplicación de un tren de pulsos, puede resultar en una estimación a la baja debido que no se consideran los otros fenómenos que contribuyen a la depresión observada, tales como la saturación de los sensores de calcio presinápticos (Mochida et al., 2008) o la inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje presinápticos (Xu et al., 2007). Para salvar estas limitaciones y para confirmar estos resultados, en el laboratorio se realizó el mismo estudio, pero determinando el tamaño del RRP mediante la aplicación local de una solución hipertónica de sucrosa (Albrecht et al., 2012).

Con estos resultados pudimos concluir que el tamaño del RRP en un terminal presináptico del grupo SMC control, contiene entre 4 y 9 vesículas, número que se ve reducido a casi la mitad cuando los SCM son tratados con concentraciones nanomolares de SPARC, cuyos terminales poseen un tamaño de RRP que contiene ente 2 y 6 vesículas.

6 Efecto de SPARC sobre la ultraestructura del terminal presináptico

Para confirmar el efecto de SPARC sobre el tamaño del RRP, se realizaron experimentos correlativos de electrofisiología y microscopía electrónica (fig. 56, ver materiales y métodos). El principal objetivo fue la cuantificación de las vesículas ancladas a la zona activa, las cuáles determinan el tamaño del RRP en los terminales presinápticos de las neuronas hipocampales (Schikorski and Stevens, 2001), o en las neuronas bipolares de la retina (vonGersdorff et al., 1996).

La cuantificación de los terminales presinápticos, en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica, mostro que tanto el grupo de los SCM control, como el grupo de SCM tratados con 2,4 nM SPARC, no presentaron diferencias en el tamaño del botón sináptico (fig. 57). El grupo control exhibió un diámetro promedio de $1,13 \pm 0,1 \mu\text{m}$ y un perímetro promedio de $3,78 \pm 0,26 \mu\text{m}$ ($n= 4$ neuronas, 6 terminales presinápticos), comparable con los $1,10 \pm 0,13 \mu\text{m}$ de diámetro y los $3,51 \pm 0,43 \mu\text{m}$ observados en los terminales presinápticos tratados con la proteína matricelular ($n=3$ neuronas, 10 terminales presinápticos). Tampoco se observaron diferencias en el tamaño y el número de las zonas activas entre ambos grupos, las

cuales presentaron una longitud de $342\pm 88\ \mu\text{m}$ y un área de $0,029\pm 0,014\ \mu\text{m}^2$ en el caso de los controles, comparables con los $403\pm 0,03\ \mu\text{m}$ de longitud ($p= 0,52$) y a los $0,033\pm 0,005\ \mu\text{m}^2$ de área ($p= 0,74$) observados en el grupo de los SCM + 2,4 nM SPARC (fig. 57).

Al cuantificar el número total de vesículas presentes en el terminal presináptico, se observó que la presencia de SPARC disminuyó en casi tres veces el número de vesículas totales presentes en el botón presináptico, resultado que concuerda con lo observado en los experimentos con dynasore. El conteo de las vesículas totales, cuantificadas en secciones de 60 nm, reveló que los botones presinápticos del grupo control contienen en promedio 139 ± 16 vesículas y que el grupo tratado con concentraciones nanomolares de SPARC contienen 53 ± 13 vesículas, unas 2,6 veces menor respecto al grupo control ($p<0,001$). Asimismo, la presencia de SPARC también modificó el número de vesículas ancladas a la zona activa, disminuyendo su cantidad desde las 6 ± 1 vesículas cuantificadas en el grupo control, a las 2 ± 1 vesículas presentes en los terminales presinápticos tratados con SPARC (fig. 58), valores que se asemejan a los estimados en los experimentos correlativos de electrofisiología y microscopía confocal.

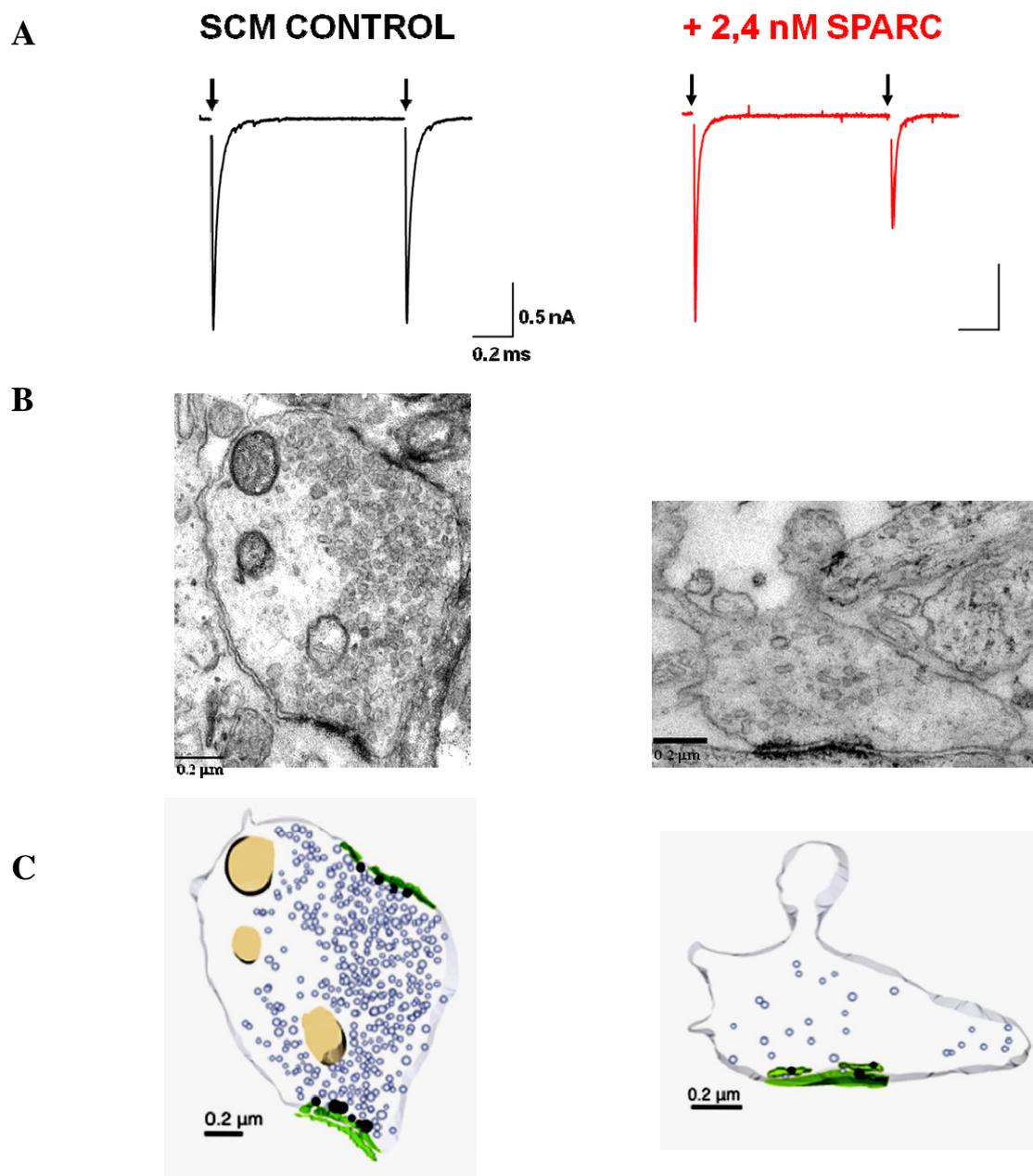


Figura 56. Electrofisiología y Microscopía electrónica correlativa. A) pulsos pareados con un intervalo de un segundo, aplicado a una neurona del grupo SCM control (negro) y a un SCM tratado con SPARC, con 16 y 15 DIC respectivamente. B) Imágenes de microscopía electrónica de un terminales presináptico correspondientes a las neuronas control (izquierda) y la tratada con SPARC (derecha) cuyo registro se muestra en A. C) Modelo en tres dimensiones de los terminales presinápticos mostrados en B.

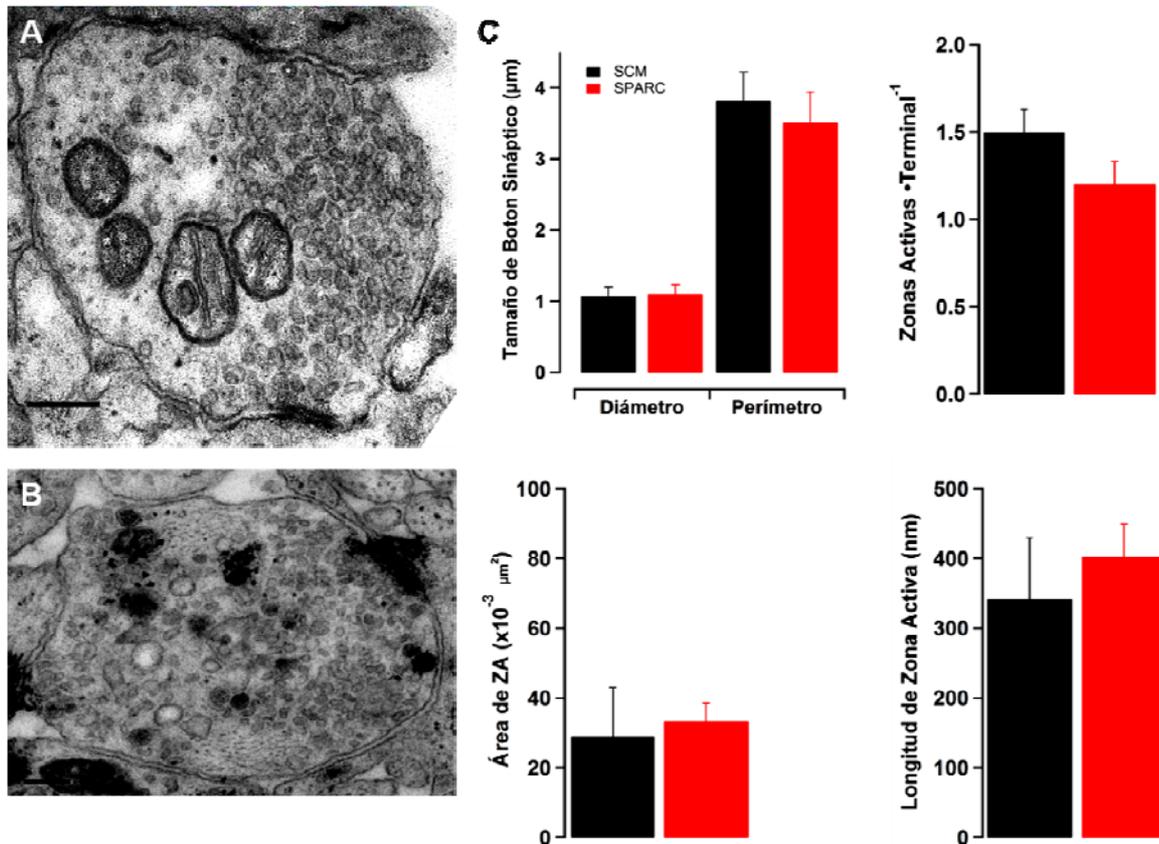


Figura 57. Resumen de los efectos de SPARC en el botón sináptico. A, B) Micrografía de microscopía electrónica de un terminal presináptico de un SCM control (A) y de un terminal presináptico de un SCM tratado con 2,4 nM SPARC por 14 DIV, barra de calibración = 200 nm. C) Representación gráfica para los grupos SCM control (barras en negro) y SCM + 2,4 nM SPARC (barras en rojo), que reflejan las cuantificaciones de las imágenes de microscopía electrónica, relativas al tamaño del terminal presináptico y las zonas activas.

Considerando el número de vesículas ancladas en la zona activa y que la zona activa permanece sin variación entre ambos grupos, podemos concluir que en el grupo tratado con SPARC, una vesícula anclada a la zona activa ocupa un espacio que se correspondería con un cuadrado de 105x105 nm, ocupando aproximadamente tres veces más espacio de zona activa respecto a una vesícula del grupo control, la cual se ubicaría en un espacio correspondiente a un cuadrado de 58x58. En otras palabras, la densidad de vesículas ancladas a la zona activa es tres veces menor a la densidad de vesículas observada en las zonas activas del grupo control (fig. 58).

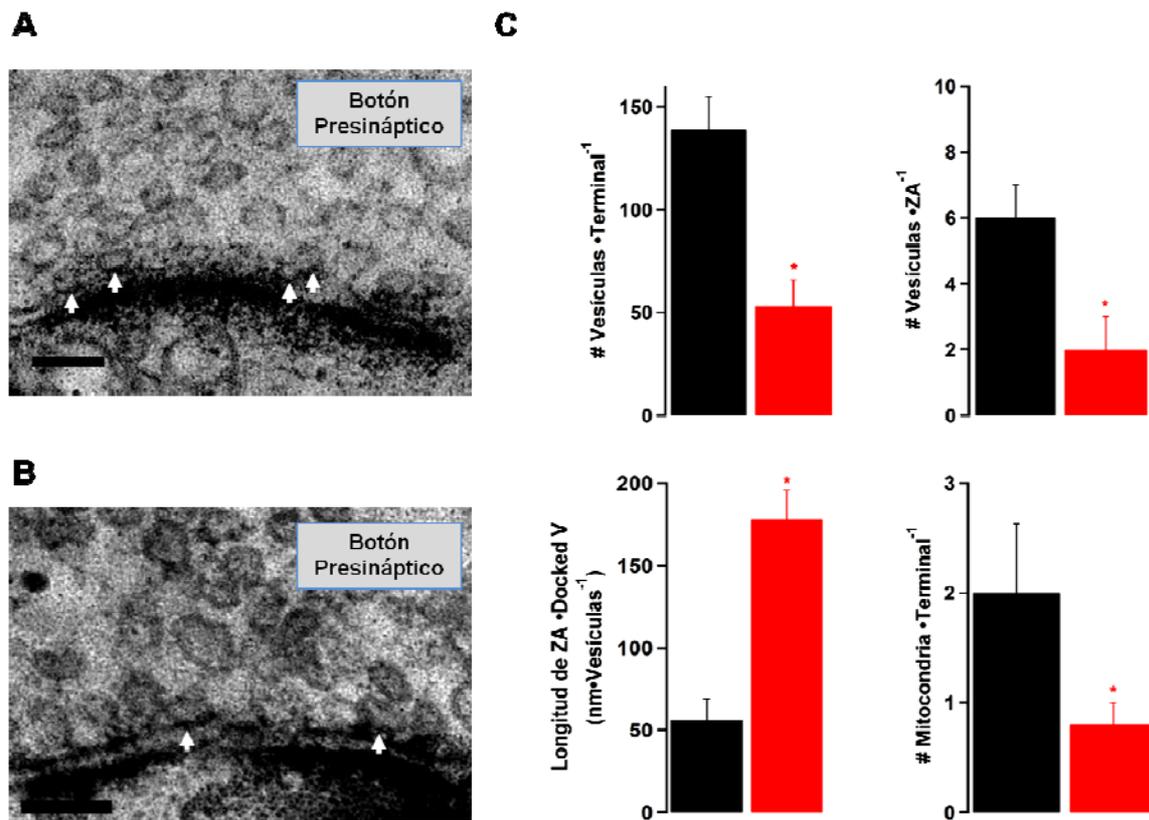


Figura 58. Resumen de los efectos de SPARC en el número de vesículas del botón sináptico. **A, B)** Micrografía de microscopía electrónica de la zona activa de un terminal presináptico de un SCM control (A) y de un terminal presináptico de un SCM tratado con 2,4 nM SPARC por 14 DIV. Las flechas blancas señalizan las vesículas acopladas a la zona activa. Barra de calibración = 100 nm. **C)** Representaciones gráficas de las cuantificaciones realizadas en las imágenes de microscopía electrónica, relativas al número de vesículas totales y al de vesículas ancladas a las zonas activas. Nótese como la presencia de SPARC disminuye la cantidad de vesículas observadas en el terminal presináptico.

7 Efecto de la aplicación local de SPARC sobre la plasticidad sináptica

A fin de establecer si esta proteína matricelular ejerce una acción sobre la neurotransmisión en sinapsis ya desarrolladas, se aplicó SPARC sobre los SCMs en forma local mediante dos protocolos distintos. El primer protocolo consistió en la aplicación aguda de 2.4 nM de SPARC sobre SCMs durante 20 minutos con un sistema de perfusión local. El segundo protocolo consistió en transferir COS-7, previamente transfectadas con GFP o con GFP y SPARC, sobre microcultivos con 14 o más días *in vitro*. Los microcultivos se registraron 24-36 hrs después del pase de las células COS-7 sobre los SCMs.

Para determinar un posible efecto agudo de SPARC (segundos-minutos), se empleó un protocolo de aplicación aguda de 100 ng/mL SPARC por perfusión local sobre SCMs de 14-18 *DIV* que presentaran respuesta autáptica. El efecto de SPARC se cuantificó aplicando un protocolo de pulsos pareados con un intervalo de tiempo de 1 segundo a 0,02 Hz. Los pulsos pareados basales se promediaron y se les denominó **T0** (pulsos 1-10). Los pulsos pareados obtenidos durante la aplicación local de SPARC fueron separados en tres grupos de 5 minutos cada uno: **T1**, **T2**, y **T3**, correspondientes a los 5 minutos finales de aplicación de SPARC. Para cada grupo se determinó el promedio y la media del error estándar de la relación $EPSC_2/EPSC_1$ (n=7). Como control se aplicó el mismo protocolo de pulsos pareados durante 25 minutos, agrupándose las respuestas de la misma forma que en el caso anterior (n=3).

Al normalizar las respuestas por el promedio de recuperación de los primeros 10 minutos basales (T1), pudimos observar que la aplicación aguda de SPARC durante 15 minutos no modificó la plasticidad sináptica a corto plazo de las neuronas desarrolladas en microcultivos, ya que no se observaron diferencias respecto a los controles (fig. 59).

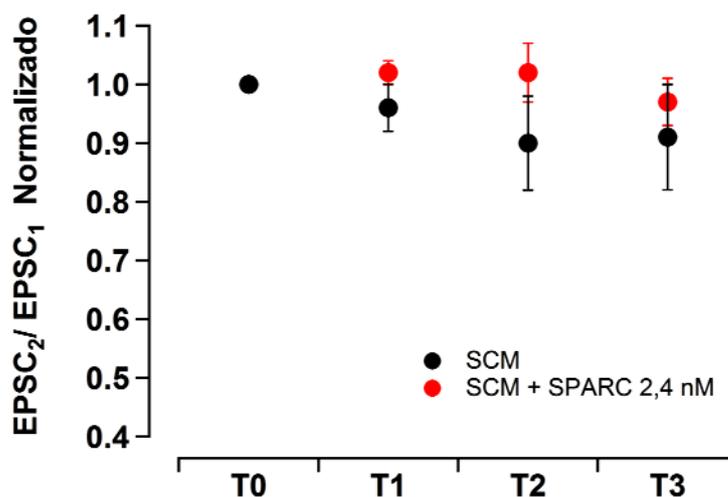


Figura 59. Efecto de la aplicación local de SPARC. La aplicación local de SPARC a 2,4 nM, no afecta la recuperación frente a un pulso pareado con un intervalo de tiempo de 1 segundo, aplicándose este pulso pareado cada un minuto. **T0**, pulsos pareados basales aplicados durante 10 minutos iniciales **T1**, promedio de los primeros 5 pulsos; **T2**, promedio de los 5 pulsos intermedios; y **T3**, promedio de los 5 pulsos. Negro, SCM control; rojo, SCM control al que se le aplicó localmente SPARC en T1, T2 y T3.

Previamente, en el laboratorio se había demostrado que la adición de células de Schwann sobre un SCM por 24-36 horas, incrementaba la actividad espontánea y la depresión a corto plazo (Pérez González, 2011). Considerando este antecedente, estudiamos la acción de la secreción de SPARC durante 24-36 horas directamente sobre los SCM. En este estudio se emplearon COS-7 transfectadas con plásmidos de SPARC y de GFP conjuntamente (COS-GFP/SPARC), las que fueron transferidas a los cubreobjetos que contienen SCM a las 48 horas posteriores a la transfección. Para el grupo control se emplearon células COS7 transfectadas con un plásmido de GFP exclusivamente (COS-GFP). En ambos casos la eficiencia de transfección obtenida fue del 20-50%.

Antes de determinar el efecto de la liberación local de SPARC sobre los microcultivos, se comprobó que las células transfectadas con GFP y SPARC efectivamente secretaran esta proteína matricelular al medio de cultivo, y que las transfectadas sólo con GFP no produjeran SPARC. La presencia o ausencia de SPARC en el medio de cultivo condicionado de las células COS7-GFP o COS7-GFP/SPARC se realizó por *Western blot*. Las células COS7-GFP/SPARC, 48 horas después de la transfección, secretaron al medio de cultivo una cantidad de SPARC equivalente a la secretada por las células de Schwann en cultivo en el mismo período de tiempo (fig. 60). También pudimos observar que ni el SF ni el medio condicionado por las células COS7-GFP secretaron SPARC. La concentración de SPARC cuantificada por el método de ELISA indirecto a 24, 40 y 48 horas en los medios condicionados por las COS7-GFP/SPARC (en nM), fue de: $0,2 \pm 0,05$; $0,27 \pm 0,02$ y $0,31 \pm 0,06$ respectivamente (promedio \pm SEM, $n=6$ para cada punto), las cuales fueron significativamente mayores a los $0,06 \pm 0,02$ nM de SPARC cuantificado en el medio de cultivo tras 14-18 días de cultivo neuronal ($p < 0,01$).

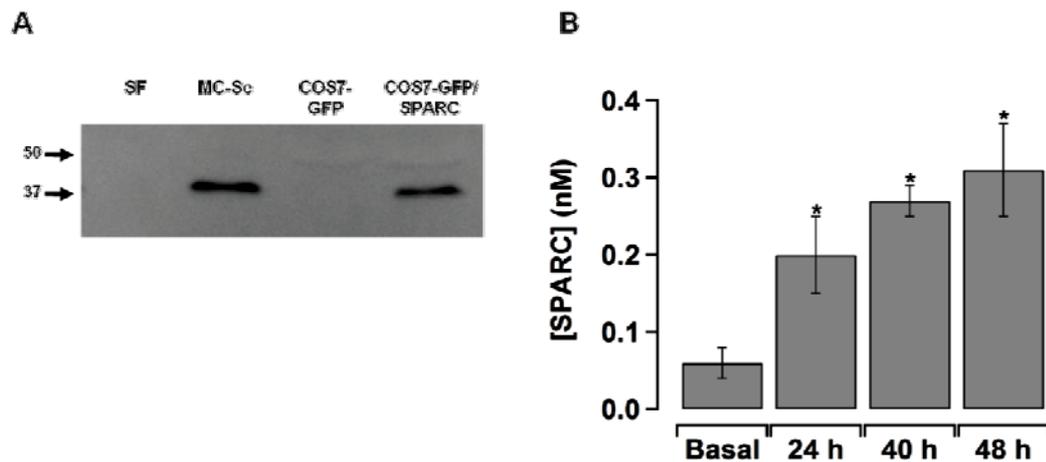


Figura 60. Secreción de SPARC por células COS7 transfectadas. A) *Western blot* que muestra la habilidad de las células COS7 transfectadas con los plásmidos que codifican para GFP y para SPARC, para secretar la proteína matricelular al medio de cultivo, a las 36 horas posteriores a la transfección. Los carriles fueron cargados con los siguientes medios: SF, medio de cultivo sin suero; MC-Sc, medio sin suero condicionado por células de Schwann durante 36 horas; COS7-GFP, medio sin suero condicionado por células COS7 transfectadas con GFP; COS7-GFP-SPARC, medio sin suero condicionado por células COS7 cotransfectadas con GFP y SPARC. Los sobrenadantes se obtuvieron de un pocillo de 3,6 cm² y concentrado 10 veces. B) Concentración de SPARC en medio de cultivo neuronal tras 14-18 DIV (Basal) y de medios sobrenadantes de células COS7 cotransfectadas con GFP y SPARC en una relación 1:4, recogidas a las 20, 40 y 48 horas posteriores a la transfección (n=4), determinada mediante ELISA ($p < 0,01$).

Tras determinar que las células COS7 transfectadas con GFP y SPARC secretaban esta proteína matricelular al medio de cultivo, se prosiguió con el segundo protocolo. Las células COS7 fueron transfectadas con un plásmido de GFP para la condición control y con los plásmidos GFP y de SPARC, con el método de lipofectamina (invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver materiales y métodos). A las 48 horas posteriores a la transfección, las células COS7 fueron levantadas y traspasadas sobre cubreobjetos con microcultivos de 14 DIV. Aquellos microcultivos que presentaron como mínimo una célula COS7 verde, fueron registrados electrofisiológicamente a las 24-36 horas posteriores al pase de las células COS7. Una vez efectuado el registro, las células fueron fijadas, tratadas con DAPI y montadas sobre un portaobjetos, para contar los núcleos (fig. 61). Sólo se consideraron como resultados válidos los obtenidos en aquellos microcultivos que presentaban un núcleo correspondiente a la neurona y uno o más núcleos de células COS7 que fuesen GFP positivas.

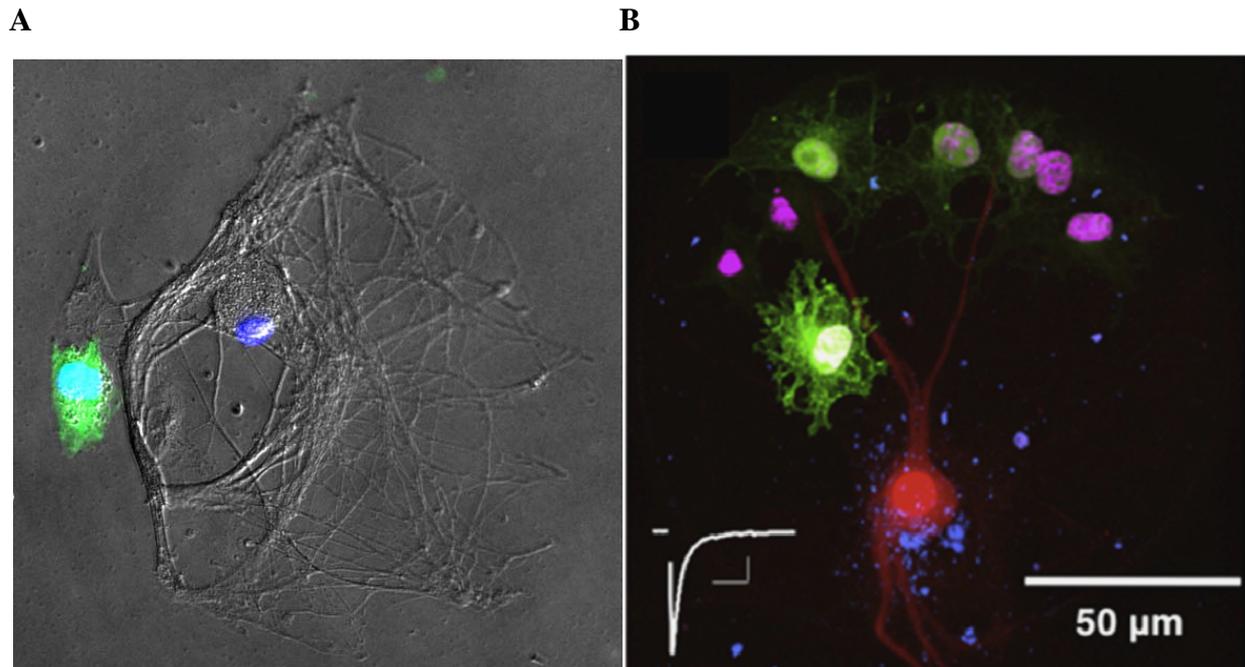


Figura 61. Imágenes de SCM con células COS7. **A)** Imagen de un SCM que contiene al menos dos células COS7 que expresan GFP dentro de la gota de colágeno. **B)** Imagen de un SCM que contiene al menos tres células COS7 que expresan GFP, dentro de la gota de colágeno. Las células transfectadas con GFP y SPARC en una relación 1:4, fueron transferidas a microcultivos mayores a 14 DIV. La neurotransmisión se realizó a las 24-48 horas posteriores a la adición de las células. La corriente autáptica generada en este caso particular, se muestra en el recuadro (barras de calibración 1 nA, 0,1 s). Los procesos neuronales se observan en rojo, debido a la inyección del colorante Alexa 555 a través de la pipeta de registro. La localización de los terminales presinápticos se indican mediante tinción contra Bassoon (azul). Los ácidos nucleídos fueron teñidos con DAPI (magenta).

El grupo control de esta serie de experimentos, los SCM + COS7-GFP ($n=5$), no presentaron diferencias respecto a los SCMs control. El promedio de la recuperación al aplicar un pulso pareado de 1 segundo de intervalo de tiempo obtenido fue de $0,80 \pm 0,07$, valor comparable al $0,88 \pm 0,03$ obtenido en el grupo de los SCM control ($p=0,35$). La cinética de recuperación desde la depresión se ajustó a una función mono exponencial con un tiempo de recuperación rápida de 38 ms, valor muy similar a los 24 ms observados en el grupo de los SCM control.

El grupo correspondiente a los SCM + COS7-GFP/SPARC ($n=7$) presentó una recuperación de los pulsos pareados, con un segundo de intervalo de tiempo de $0,67 \pm 0,05$; lo que reflejó un incremento en la depresión a corto plazo, diferencia que no fue significativa respecto al grupo control ($p=0,17$). La representación gráfica de la cinética de recuperación desde la depresión por pulsos pareados, mostró una cinética de recuperación diferente respecto al grupo SCM control y al grupo SCM + COS7_GFP, a pesar de lo cual ésta se ajustó a una función de exponencial simple. Al incrementar las observaciones, uniendo mis resultados a los obtenidos por los otros miembros del laboratorio, observamos que la actividad espontánea y la actividad

evocada de la condición control, SCM+ COS7- GFP, no presentan diferencias respecto a los SCM control, como podemos observar en la figura 62. La recuperación de la depresión por pulsos pareados se ajusta a una cinética mono exponencial con una constante de tiempo de 50 ms, comparable con los 24 ms presentado por los SCMs.

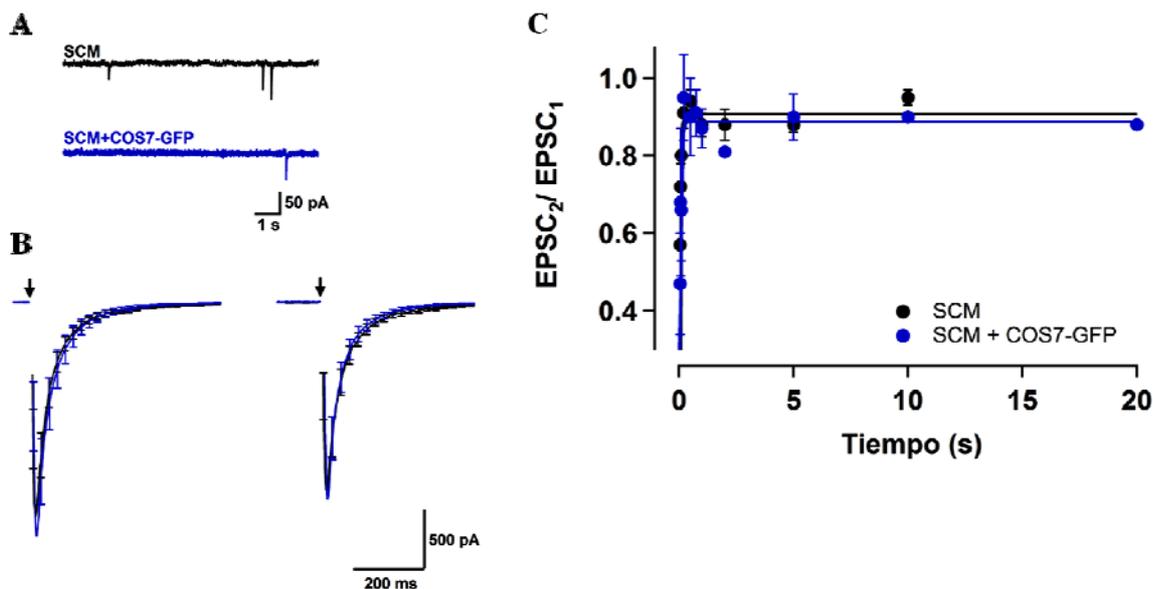


Figura 62. Neurotransmisión en SCM con células COS7. **A)** Trazos representativos de la actividad espontánea para los SCM con células COS7_GFP (azul), nótese que no hay diferencia respecto al grupo control (negro). **B)** Promedio de las respuestas evocadas por un protocolo de pulsos pareados, con 1 segundo de tiempo de intervalo, para SCM control (negro) y para SCM con células COS7 (azul). Las flechas indican la aplicación de un estímulo despolarizante. **C)** Cinética de recuperación desde la depresión para SCM control (negro) y para SCM con células COS7_GFP (azul), al aplicar intervalos de tiempo desde 0,03 a 20 segundos. Estos dos grupos muestran unos valores de recuperación frente a un pulso pareado de un segundo y una cinética de recuperación similares.

La adición de células COS-7 que expresaron GFP o de COS-7 que expresaron GFP y SPARC no modificó la actividad espontánea de los SCMs, como podemos observar en los trazos representativos de cada condición de la figura 63A.

Los SCM que contuvieron COS-7-GFP/SPARC presentaron un aumento de la depresión a corto plazo, medido por el protocolo de pulsos pareados (fig. 63B), mostrando un perfil de neurotransmisión casi idéntico a cuando se aplica esta proteína matricelular durante el desarrollo neuronal. La cinética de recuperación de la depresión por pulsos pareados se ajustó a una doble exponencial, con unas constantes de tiempo rápida y lenta de 12 ms de 22,4 s; respectivamente, comparable con la cinética de recuperación observada en los SCM desarrollados en presencia de

2,4 nM de SPARC. (fig. 63C). De estos resultados pudimos inferir que el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión es dependiente tanto de la concentración como del tiempo en la cual se aplica. La aplicación crónica a altas concentraciones incrementa la depresión a corto plazo y la actividad espontánea, pero una aplicación limitada a 24-36 horas, incrementa la depresión a corto plazo, sin afectar la actividad espontánea.

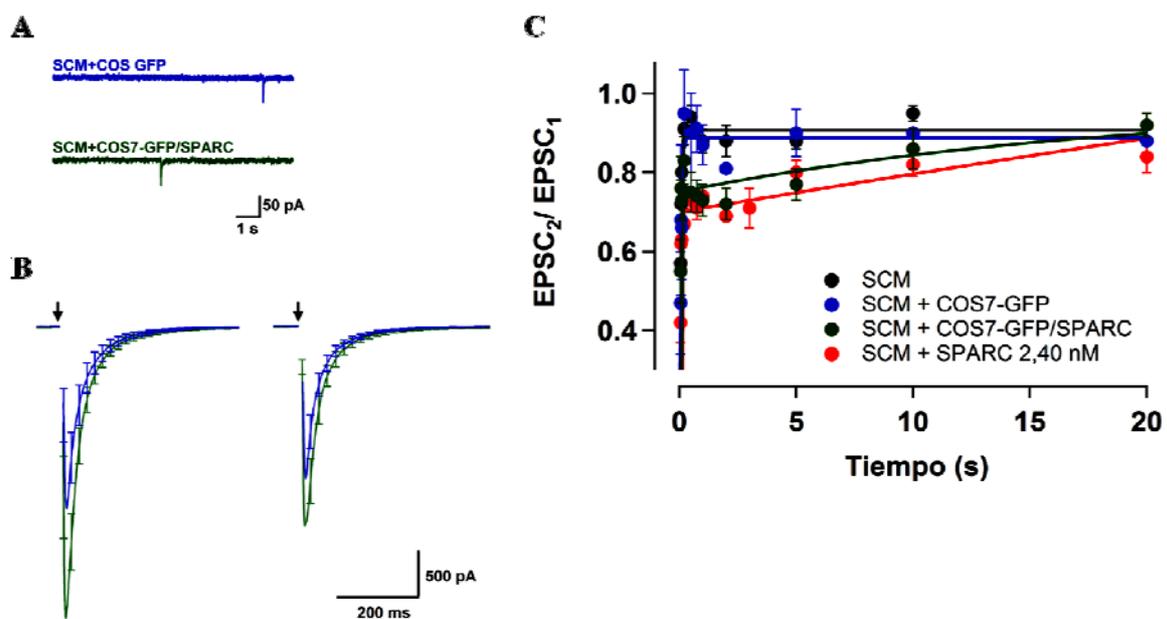


Figura 63. Efecto sobre la de la liberación local de SPARC por células COS7 sobre la neurotransmisión en SCM. **A)** Trazos representativos de la actividad espontánea para los SCM con células COS7_GFP (azul), y para SCM con células COS7_GFP/SPARC (verde). Nótese que no se aprecian diferencias. **B)** Promedio de las respuestas evocadas por un protocolo de pulsos pareados, con 1 segundo de tiempo de intervalo, para SCM con células COS7_GFP (azul), y para SCM con células COS7_GFP/SPARC (verde). Nótese el incremento en la potencia y en la depresión por pulsos pareados para el grupo SCM con células COS7_GFP/SPARC. Las flechas indican la aplicación de un estímulo despolarizante. **C)** Cinética de recuperación desde la depresión para SCM con células COS7 (azul) y para SCM con células COS7_GFP/SPARC (verde) al aplicar intervalos de tiempo desde 0,03 a 20 segundos. La cinética de recuperación para el grupo SCM+SPARC 2,4 nM, se ajusta a una exponencial doble, con una constantes de tiempo rápida de 12 ms y una constante de tiempo lenta de 22,44 s. Los tiempos de recuperación obtenidos para los SCM control (negro) y para los SCM desarrollados en presencia de 2,4 nM SPARC (rojo), se muestran en la gráfica para comparación (los mismos que en la gráfica 49).

8 Expresión de SPARC durante la maduración de las sinapsis del Ganglio Cervical Superior *in vivo*.

Tras caracterizar el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión *in vitro*, quisimos explorar la correlación de nuestros hallazgos con un rol fisiológico, apoyándonos en los antecedentes que describen que SPARC se distribuye ampliamente en el sistema nervioso y que es expresada por diferentes tipos de glía en una forma espacio-temporal, por lo que se la ha relacionado con un rol en la migración celular, neurogénesis, plasticidad sináptica y angiogénesis (Vincent et al., 2008). Para este estudio analizamos la expresión de SPARC en cortes histológicos del Ganglio Cervical Superior, mediante inmunofluorescencia (ver materiales y métodos), durante los primeros días postnatales. Como demostramos anteriormente, las células de Schwann cultivo, obtenidas del Ganglio Cervical Superior, secretan SPARC y muestran un marcaje positivo para Notch activo (NICD), por lo cual, junto con estudiar la expresión de SPARC, analizamos el nivel de expresión de NICD a 0, 2, 6, 10 y 15 días post parto (P0, P2, P6, P10 y P15, respectivamente, figura 64).

La expresión de SPARC en el ganglio se pudo detectar a P2, siendo esta expresión casi indetectable a P15, sugiriendo que la expresión de esta proteína disminuye en el tiempo. Por el contrario, la expresión de NICD es detectable en ambas situaciones, aunque el patrón de expresión varía con el tiempo. En los primeros días postnatales se observó una expresión más extendida abarcando tanto los núcleos más pequeños y condensados que corresponderían a células de la glía, como aquellos núcleos más grandes y de cromatina más descondensada que corresponderían a neuronas. En los últimos días postnatales analizados, se encuentra un marcaje positivo para NICD mayoritariamente en las áreas del ganglio que concuerdan con los somas neuronales, de donde podemos inferir que las células gliales han disminuido o no presentan marcaje para Notch activo.

Al cuantificar la expresión de estas proteínas, observamos que SPARC tiene un pico de expresión al segundo día post parto (P2), después del cual disminuye su expresión a lo largo del tiempo (fig. 65). La expresión de Notch activo permanece constante en el tiempo.

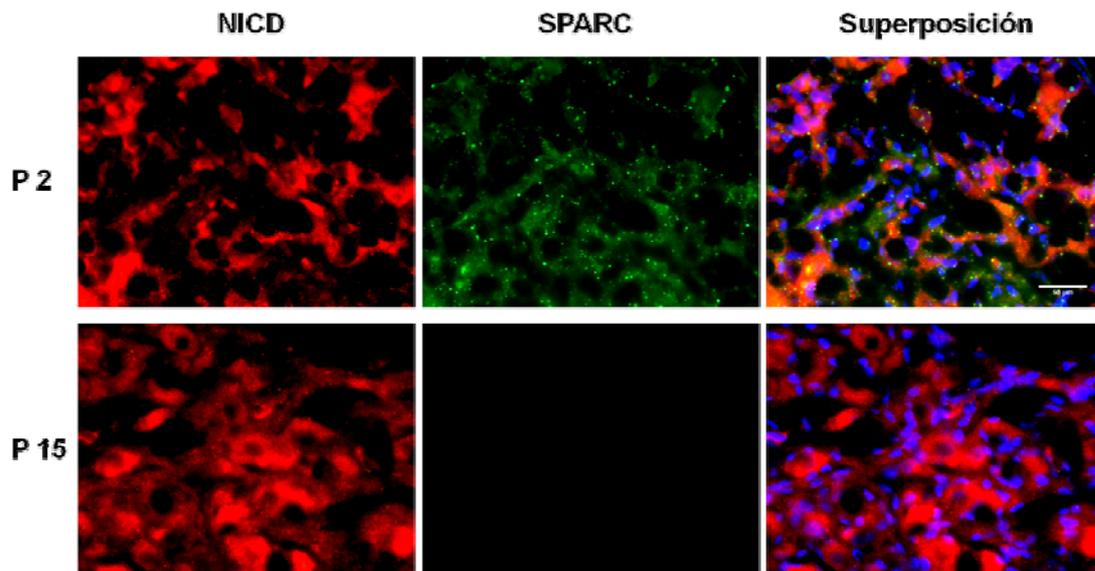


Figura 64. Expresión de SPARC y NICD en el Ganglio Cervical Superior. Expresión de NICD (rojo) y de SPARC (verde) a P2 y P15. Nótese como a P15 la expresión de SPARC disminuye en el tiempo y que la expresión de NICD permanece constante

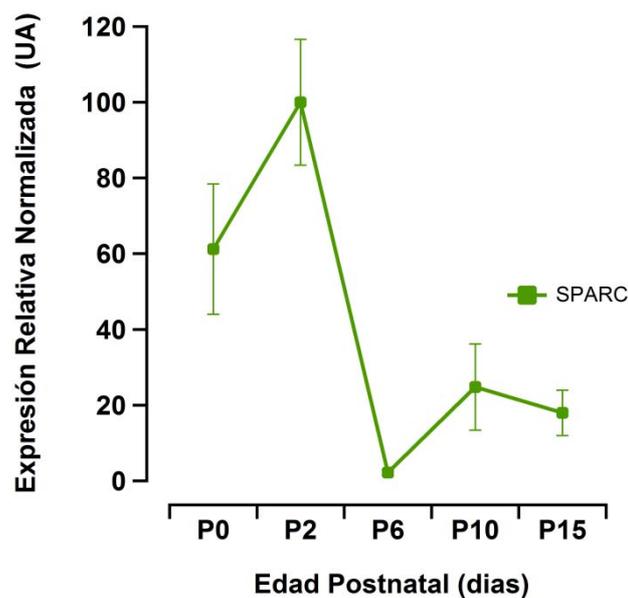


Figura 65. Cuantificación de la expresión de SPARC. Esta gráfica refleja la cuantificación normalizada de la expresión de SPARC a distintas edades postnatales. Las expresiones de la intensidad de la señal se han normalizado respecto a la intensidad promedio de P2, por ser éste el punto de máxima expresión para SPARC.

El patrón de expresión de SPARC concuerda con lo descrito por Vincent y colaboradores (Vincent et al., 2008), indicándonos que SPARC está siendo secretada por células de Schwann inmaduras.

9 Producción de SPARC y maduración de las células gliales

Los resultados expuestos hasta el momento, nos indican que SPARC es una proteína secretada por las células de la glía durante la primera etapa del desarrollo del ganglio cervical superior y que en *in vitro*, las células de Schwann que la secretan presentan un fenotipo inmaduro o dediferenciado. Finalmente estudiamos la relación entre el estado de maduración de la glía y la capacidad de ésta para secretar SPARC.

Para estudiar esta relación, tratamos las células de Schwann con DAPT, un inhibidor de la gama-secretasa, el cual es capaz de inhibir Notch hasta en un 50% cuando se aplica dentro del rango de concentración 1–10 μM (Yang et al., 2008). La expresión de Notch en las células de Schwann, se ha correlacionado con un fenotipo de células de Schwann inmaduras o dediferenciadas (Li et al., 2004; Jessen and Mirsky, 2008; Mirsky et al., 2008; Woodhoo et al., 2009), por lo que una inhibición de la forma activa de Notch induciría la diferenciación de las células de Schwann.

El primer paso fue comprobar la viabilidad de este método, para lo cual evaluamos la capacidad de DAPT para inducir la diferenciación de las células de Schwann en cultivo, mediante la aplicación de 1 ó 10 μM durante 24 horas (fig. 66). La diferenciación de las células de Schwann se asocia a un cambio en su morfología, las que pasan de una forma más circular a una más alargada cuando se diferencian (Yu et al., 2009). Para cuantificar este cambio, medimos el diámetro mayor y el diámetro menor de los núcleos de las células de Schwann, marcados con DAPI, para luego hacer una relación entre ellos. Aquellos núcleos que tengan una morfología mas circular, presentarán un valor cercano a uno. Aquellos núcleos que pertenecen a células presumiblementediferenciadas, presentan una forma más alargada, por lo que la relación entre sus diámetros será mayor a uno. La cuantificación de estos diámetros se realizó con el programa Image J.

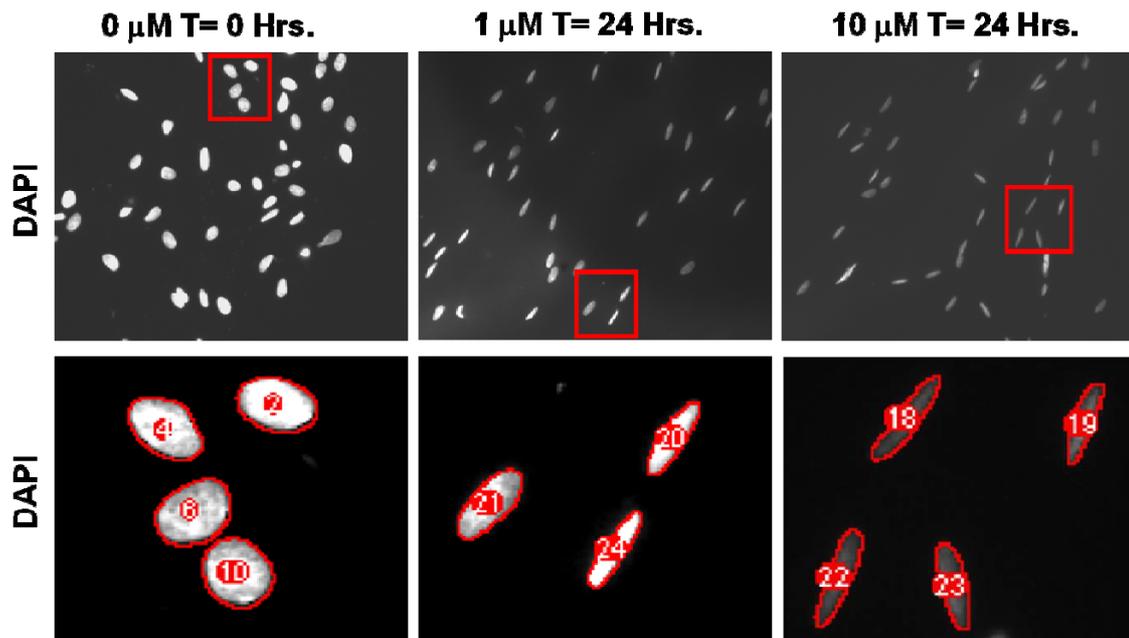


Figura 66. Efecto de DAPT en la morfología de las células de Schwann. En los cuadros superiores se muestran imágenes de núcleos de células de Schwann tratados con DAPT y sin tratar. La aplicación de DAPT induce un cambio en la morfología de las células, la cual fue cuantificada mediante la relación entre el diámetro mayor respecto al diámetro menor de los núcleos, medidos por Image J.

Como podemos observar en la figura 66, concentración de 1 y de 10 μM DAPT, inducen un cambio en la morfología de las células de Schwann, lo que se refleja en un aumento en el coeficiente promedio entre el diámetro mayor y el diámetro menor (fig. 67).

El tratamiento con DAPT induce la diferenciación de las células de Schwann, conjuntamente con disminuir la viabilidad celular, disminuyendo el número de células en un 20%. Por este motivo al estudiar la relación entre la maduración glial y la secreción de SPARC, empleamos una concentración de 1 μM DAPT. En este set de experimentos, las células fueron tratadas por 1 semana con DAPT o con 1% DMSO, que es la concentración final de este disolvente, con cambios parciales de medio. Al término de la semana, las células de Schwann fueron cambiadas a un medio sin suero, recogiendo el medio condicionado tras 48 horas. A continuación, las células fueron fijadas y sus núcleos marcados con DAPI, para determinar el número de células en cada pocillo. Las concentraciones de SPARC fueron normalizadas a 100,000 células, para corregir el efecto del DAPT sobre la viabilidad celular. Estos experimentos se realizaron en 4 cultivos independientes.

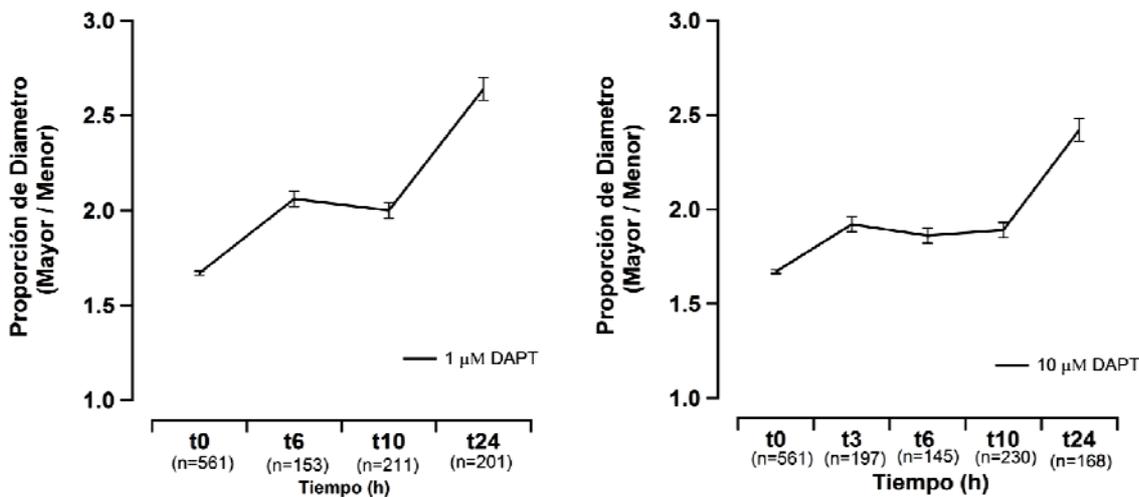


Figura 67. Concentraciones nanomolares de DAPT inducen la diferenciación de las células de Schwann. Efecto de DAPT sobre la morfología de las células de Schwann, las cuales presentan una morfología mas alargada tras 24 horas de tratamiento con 1 ó 10 μM de DAPT.

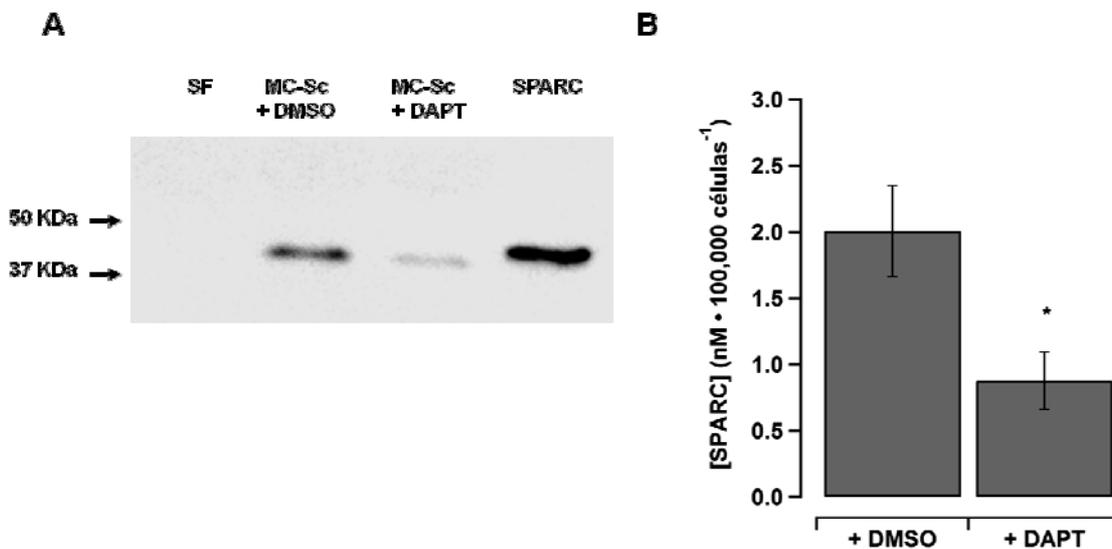


Figura 68. DAPT disminuye la secreción de SPARC. Efecto del tratamiento con DAPT sobre la secreción de SPARC. **A)** Cuantificación de la secreción de SPARC mediante *Western blot*. SF: medio sin suero; MC-Sc + DMSO: medio condicionado de células de Schwann tratadas con DMSO; MC-Sc + DAPT: medio condicionado de células de Schwann tratadas con 1 μM DAPT; SPARC: 20 ng de SPARAC recombinante usada como control positivo. **B)** Concentración de SPARC en medios condicionados tratados con DMSO (+ DMSO) o con DAPT (+DAPT). El tratamiento disminuye en un 51,8% la concentración de SPARC en el medio sobrenadante.

La concentración de SPARC en los medios condicionados tratados con DMSO fue de $1,00 \pm 0,17$ nM cada 100,000 células ($n=4$), valores que son comparables con los observados previamente. Sin embargo, los medios condicionados de las células de Schwann tratadas con $1 \mu\text{M}$ DAPT presentaron una concentración de SPARC un 51,8% menor respecto al grupo control, disminuyendo la concentración hasta $0,408 \pm 0,09$ nM cada 100,000 células ($n=5$; $p=0,036$; fig. 68).

Estos resultados indican que la maduración / diferenciación de las células de Schwann está asociada a una disminución en la secreción de SPARC.

DISCUSIÓN

“La duda es el principio de la sabiduría”

Aristóteles

DISCUSIÓN

Las funciones clásicamente atribuidas a las células gliales consisten básicamente en ser un soporte físico del sistema nervioso, con algunas funciones relevantes tales como la formación de la vaina de mielina y el tamponamiento del medio extracelular. En las últimas décadas, distintos estudios han demostrado que la neuroglia, y principalmente el astrocito, juega un papel más activo en el sistema nervioso, participando en la formación, mantenimiento, maduración y eliminación de la sinapsis, certificando que las células gliales no sólo poseen funciones pasivas en el sistema nervioso. Un papel que aún queda por determinar es si la glía puede participar en el procesamiento de la información (Hamilton and Attwell, 2010).

Previamente, nuestro laboratorio ha demostrado que en los microcultivos autápticos colinérgicos, la presencia de las células de Schwann modifica la neurotransmisión neuronal mediante mecanismos presinápticos, aumentando la frecuencia de la actividad espontánea e incrementando la depresión a corto plazo, evaluada mediante la aplicación de pulsos pareados (Perez-Gonzalez et al., 2008). Mi trabajo de tesis es la continuación de estos resultados, en donde quisimos determinar tanto el fenotipo de las células de Schwann así como los mecanismos mediante los cuales esta tipo celular ejerce su efecto en la neurotransmisión.

El uso de microcultivos autápticos de neuronas del SCG responde a que esta preparación posee una serie de ventajas experimentales: 1) Los microcultivos de neuronas autápticas forman un circuito simple, presentando el componente presináptico y el postsináptico, lo que permite registrar la actividad sináptica con un solo electrodo de registro. 2) La formación de un circuito monosináptico en los microcultivos autápticos, asegura que la actividad sináptica registrada proviene de la neurona en estudio, evitando así la interferencia de otras neuronas en el circuito sináptico, facilitando la interpretación de los resultados obtenidos. 3) Contrariamente a los microcultivos de neuronas del SCN, las neuronas del SCG en microcultivos sólo requieren de NGF para crecer, permitiendo la obtención de microcultivos de neuronas individuales que se desarrollan en ausencia de células gliales. Esta característica hace que esta preparación se única para el estudio de la interacción neurona-glia. 4) Los microcultivos autápticos en ausencia de glía nos brindan la ventaja de poder estudiar el efecto que tienen sobre la neurotransmisión las moléculas secretadas por las células gliales.

Este trabajo comenzó con la caracterización del fenotipo de la glía periférica en cultivo. Mediante el uso de marcadores específicos para distintos estadios de maduración de las células de Schwann pudimos demostrar que en cultivo éstas presentan un fenotipo inmaduro, caracterizado por un marcaje positivo para S100 y para NICD. Adicionalmente, y mediante el empleo de geles de acrilamida de dos dimensiones, identificamos la proteína SPARC como un factor secretado en grandes cantidades por estas células. Tras la identificación de SPARC como una proteína secretada por las células de Schwann potencialmente relevante para la función sináptica, se estableció un protocolo de purificación de SPARC a partir de medios condicionados por células en cultivo. SPARC se puede obtener de forma natural desde de medios enriquecidos por células de mamíferos en cultivo, o de forma recombinante a partir de la sobreexpresión en *E. coli* o células de insectos (Sage et al., 1989; Sage, 2003). La purificación de SPARC recombinante presenta la ventaja de obtener una gran cantidad de SPARC a un coste más bajo respecto a la obtención de SPARC natural; pero presenta la desventaja de que el SPARC recombinante presenta una glicosilación menor respecto a SPARC natural, lo que parece ser crítico para la actividad de esta proteína. Además, la purificación de SPARC producida por *E. coli* o por células de insectos puede presentar problemas potenciales con el plegamiento y las modificaciones postraduccionales de SPARC, hecho que se traducirían en una menor actividad biológica del SPARC recombinante, respecto al SPARC purificado de células de mamíferos en cultivo (Sage, 2003).

Adicionalmente a las ventajas que presenta la purificación de SPARC desde células mamíferas, la elección de este protocolo de purificación respondió a la necesidad de establecer un método de purificación mediante HPLC, con el cual se pudiesen purificar otras proteínas presentes en el medio condicionado por las células de Schwann, tales como trombospondinas, glipicanos, hevin, etc. El establecimiento de este protocolo es esencial para mantener la competitividad del laboratorio en la caracterización de las proteínas secretadas por las células de Schwann sobre la maduración y plasticidad sináptica. Como se ha expuesto en la introducción, en el último año se han publicado diversos trabajos que estudian el efecto de las proteínas secretadas por la glía sobre la actividad neuronal, en donde los laboratorios que realizan la investigación han puesto a punto sus propios protocolos de purificación de proteínas (Mauch et al., 2001; Allen et al., 2012). Con el protocolo de purificación de proteínas por HPLC, puesto a punto en este trabajo, establecemos una herramienta clave para el laboratorio.

Paralelamente a la purificación de SPARC; se estudió la relación entre el fenotipo glial y la secreción de SPARC, así como el efecto que tiene esta proteína matricelular sobre la neurotransmisión. Al analizar los niveles de expresión de esta proteína en el SCG a distintas edades postnatales, observamos que SPARC posee una alta expresión en los primeros días postnatales, bajando su nivel de expresión con el desarrollo, coincidiendo con trabajos publicados anteriormente para otras regiones del sistema nervioso (Vincent et al., 2008; Jones et al., 2011).

Nuestros datos concuerdan con lo descrito para las proteínas matricelulares, que poseen una alta expresión durante el desarrollo y un bajo nivel de expresión en los tejidos adultos (Bornstein and Sage, 2002; Frangogiannis, 2012). De acuerdo al trabajo realizado por Jessen y Mirsky, en los últimos días del estado embrionario las células precursoras de células de Schwann se diferencian a células de Schwann inmaduras, para posteriormente diferenciarse a células de Schwann maduras en los primeros días postnatales (Woodhoo et al., 2009), las cuales al ser disociadas para establecer cultivos primarios de células gliales, se dediferencian a células de Schwann inmaduras. Estas observaciones nos llevaron a plantear que las células de Schwann inmaduras / dediferenciadas secretaban SPARC tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta observación la pudimos demostrar mediante el tratamiento con DAPT de las células de Schwann en cultivo. Mediante este tratamiento observamos que la secreción de SPARC disminuye, confirmando nuestra observación inicial, de que SPARC es secretada por las células de Schwann inmaduras, hecho cuya posible relevancia fisiológica será discutida más adelante.

Como primer paso para analizar el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión, se estimó la concentración basal de SPARC en los medios de cultivos, determinándose que SPARC se encuentra a una concentración de $0,07 \pm 0,02$ nM en la condición control. Adicionalmente, en el laboratorio se desarrolló un modelo de difusión de la proteína matricelular para estimar las concentraciones teóricas biológicamente relevantes de SPARC (Albrecht et al., 2012), determinándose que la liberación de SPARC desde una vesícula puede cubrir al menos $30 \mu\text{m}^2$ de superficie neuronal a una concentración ≥ 1 nM, por lo que la liberación de 6-7 vesículas de SPARC por parte de la glía, puede generar concentraciones nanomolares de SPARC sobre toda la superficie neuronal en una neurona con un soma de $10 \mu\text{m}$ de diámetro (Albrecht et al., 2012).

En este trabajo observamos que la aplicación de SPARC a concentraciones nanomolares durante el desarrollo, se observa un incremento en la frecuencia de la actividad espontánea y un

incremento en la depresión a corto término. Estos resultados se asemejan a los observados en los GM (Perez-Gonzalez et al., 2008). Tanto en el caso de los GM, como en SCM desarrollados en presencia de concentraciones nanomolares de SPARC, la frecuencia de la actividad espontánea se incrementa. La frecuencia en el grupo SCM control es de $\sim 0,3$ mEPSCs s^{-1} , viéndose incrementada a $\sim 1,5$ mEPSCs s^{-1} en el caso de GM y a $\sim 5,2$ mEPSCs s^{-1} para los SCM tratados con SPARC a concentraciones nanomolares. Adicionalmente, tanto la presencia de las células de Schwann en los microcultivos como la adición de concentración nanomolares de SPARC, incrementan la depresión a corto plazo, medido mediante protocolo de pulsos pareados. Observamos que cuando se aplica un pulso pareado con un segundo de intervalo, el grupo SCM control presenta una recuperación del 88%; los SCM tratados con SPARC, una recuperación del 73%; y los GM presentan una recuperación del 62%. Al comparar la cinética de recuperación desde la depresión, observamos que el grupo SCM control se ajusta a una exponencial simple, en tanto que los GMs y el grupo de SCM tratados con SPARC a altas concentraciones presentan una recuperación que se ajusta a una doble exponencial, con unas constantes de tiempo rápida y lenta de 14 ms y 2 s, respectivamente, para el caso de los GM (Perez-Gonzalez et al., 2008) y unos valores de 44 ms y 97 s, respectivamente, para los SCM tratados con SPARC. Como podemos apreciar en la figura 69, si bien los GM y las neuronas tratadas con SPARC presentan una cinética de recuperación que se ajusta a una doble exponencial, la recuperación del grupo SCM+SPARC es mucho más lenta. Adicionalmente, en ambos casos no se observa una relación entre el incremento de la frecuencia de la actividad espontánea y el incremento de la depresión.

Estas observaciones nos llevan a especular que SPARC es uno de los factores por el cual la glía interacciona con las neuronas, afectando la plasticidad sináptica, en donde la acción de las células de Schwann estaría dada por la sumatoria de distintas moléculas, como por ejemplo por la trombospondina, proteína que en nuestras condiciones experimentales también es secretada por las células de Schwann en cultivo. Estos resultados concuerdan con trabajos previos, en donde se describe que las células gliales secretan diversos factores que intervienen en el desarrollo de la sinapsis (Lafon-Cazal et al., 2003; Cahoy et al., 2008; Dowell et al., 2009; Allen et al., 2012), tales como TGF β -1, colesterol, trombospondinas o glipicanos-4 y -6 (Mauch et al., 2001; Pfrieger, 2003; Feng and Ko, 2008; Nieweg et al., 2009; Allen et al., 2012), los cuales en forma individual no reproducen los efectos sobre las sinapsis que producen los medios condicionados por las células gliales (Nägler et al., 2001; Christopherson et al., 2005; Cao and Ko, 2007).

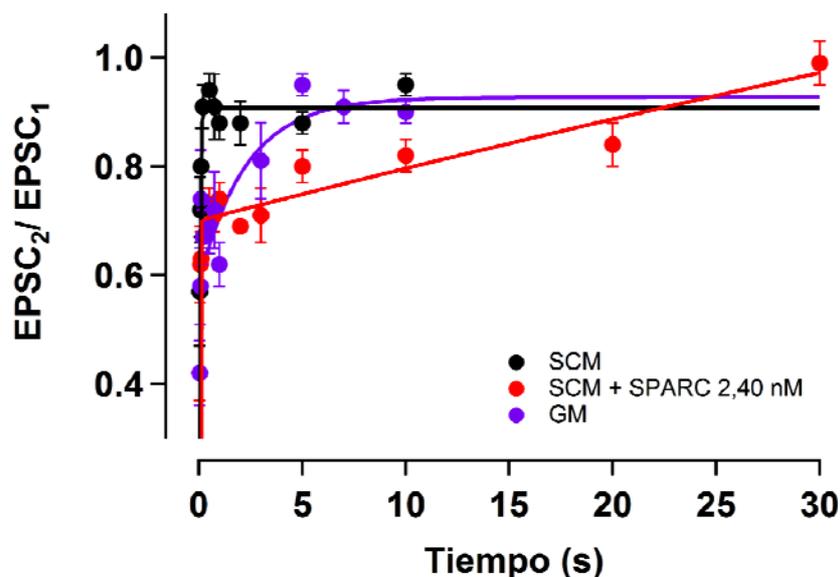


Figura 69. Efecto de las células de Schwann y de SPARC sobre la neurotransmisión. Representación gráfica de la cinética de recuperación desde la depresión para SCM control (negro), para SCM que se han desarrollado con células de Schwann (GM, lila) y para SCM tratados con 100 ng/mL SPARC (rojo).

Dado que el RRP está implicado en la plasticidad a corto término, estudiamos el efecto de SPARC sobre este depósito de vesículas, determinando el tamaño del RRP mediante experimentos correlativos de: 1) electrofisiología y microscopía confocal y 2) electrofisiología y microscopía electrónica, independientes entre sí. Con ambos métodos establecimos que los valores obtenidos para el tamaño del RRP son comparables entre sí. Observamos que SPARC disminuye el número de vesículas que componen el RRP entre dos y tres veces, comparado con el grupo control. Inicialmente este dato no se correlaciona con lo observado en los GM, en donde no se apreciaba una diferencia en el tamaño del RRP entre los SCM control y los GM (Perez-Gonzalez et al., 2008), discrepancia que puede estar dada porque en el trabajo previo comparamos los valores promedios de cada grupo. Al estudiar el efecto de SPARC sobre este depósito de vesículas observamos que el valor promedio del grupo SCM tratado con SPARC no difiere del valor promedio obtenido para el grupo SCM control, pero cuando estimamos el aporte individual de cada autapsis en el tamaño total del RRP mediante la primera técnica, observamos una gran variabilidad en el número sinapsis en grupo SCM control como en el grupo SCM+SPARC. Al estimar el valor individual del RRP para cada autapsis, observamos una clara diferencia entre los grupos, tanto en la distribución de los valores individuales como en la

estimación del RRP. Por lo que para poder saber cuál es el efecto real de la glía en el tamaño del RRP habría que estimar el aporte individual de cada autapsis, como hemos hecho en este trabajo.

Con los experimentos correlativos de electrofisiología y microscopía electrónica, pudimos correlacionar una respuesta electrofisiológica con las características determinadas de un terminal presináptico. Como antecedentes previos, estudios realizados en neuronas de hipocampo en cultivo muestran una correlación entre la organización ultraestructural de las vesículas en el terminal presináptico y la actividad funcional de la sinapsis, en donde se observan un aumento progresivo en el número de vesículas, tanto del número total de vesículas como de aquellas que forman el RRP. Adicionalmente se observa que los terminales inmaduros poseen una discapacidad funcional, correspondiéndose a una sinapsis silente, las cuales se convierten gradualmente en sinapsis funcionales a medida que van incrementando el número de vesículas (Mozhayeva et al., 2002; Mohrmann et al., 2003).

Nuestros resultados muestran que los terminales desarrollados en presencia de concentraciones nanomolares de SPARC presentan una disminución en el número de vesículas, tanto en el número total como en el número de vesículas adosadas a la zona activa. Al comparar las características de los terminales presinápticos control, cuantificadas por microscopía electrónica, con aquellas ya descritas para las neuronas del SCG en cultivo, podemos observar que los terminales presinápticos de los microcultivos control no presentan diferencias respecto a los botones sinápticos maduros (Furshpan et al., 1986). Sin embargo, en la figura 70 podemos observar cómo los terminales presinápticos de los microcultivos desarrollados con SPARC, presentan características propias de un terminal inmaduro (Furshpan et al. 1986, Rees et al., 1976).

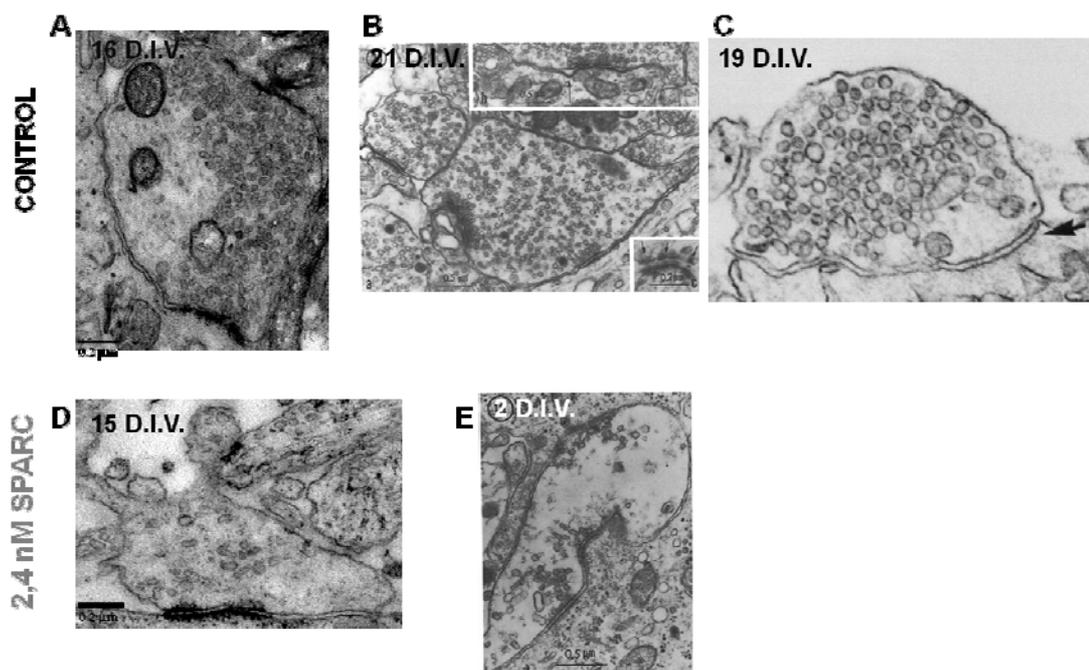


Figura 70. Terminales presinápticos desarrollados con SPARC muestran un fenotipo inmaduro. **A)** terminal presináptico de un SCM control fijado después de 16 DIV, el cual presenta características similares a los terminales mostrados en **B** y **C**, que corresponden a terminales maduros. **D)** terminal presináptico de un SCM fijado después de 15 DIV, tratado con SPARC. Nótese cómo este terminal presenta un fenotipo muy similar al terminal mostrado en **E**, que corresponde a un terminal inmaduro.

En las sinapsis excitatorias del SNC, se observan cambios en la plasticidad sináptica a corto término durante el desarrollo, indicando que la maduración sináptica es un factor crítico que influye en las funciones presinápticas. Algunas de estas propiedades asociadas al terminal presináptico tales como la plasticidad a corto término y la probabilidad de liberación, han sido asociadas a la disponibilidad funcional de las vesículas para ser liberadas, por lo que el número de vesículas disponibles, especialmente durante las primeras etapas del desarrollo sináptico, afectan la respuesta del terminal (Thomson, 2000; Zucker and Regehr, 2002a).

En el sistema nervioso central, la transmisión sináptica en la corteza del cerebro de edad postnatal es casi inefectivo, en donde una estimulación moderada genera una marcada depresión. De hecho, en muchas conexiones de la corteza cerebral inmaduro, al aplicar un protocolo de estimulación de pulsos pareados, se observa una marcada depresión. Cuando estas sinapsis maduran, la depresión a corto término observada da paso a una depresión débil o incluso una facilitación. Estos cambios han sido interpretados como resultado de la disminución de la probabilidad de liberación de neurotransmisor que se observa durante el desarrollo (Feldmeyer

and Radnikow, 2009). Por otro lado, estudios recientes sugieren diversos roles fisiológicos para la neurotransmisión espontánea, demostrando que la actividad espontánea suprime la traslación local de proteínas en la dendritas y ayuda a mantener la estabilidad de la respuesta sináptica (Ramírez and Kavalali, 2011).

Por lo tanto, considerando todas las evidencias experimentales descritas en este trabajo, demostramos que SPARC mantiene los terminales presinápticos en un estado caracterizado por: a) un tamaño de RRP pequeño, b) un número reducido de vesículas totales del terminal presináptico, c) una frecuencia de actividad espontánea aumentada y d) un incremento en la depresión a corto plazo, además de observar un aumento en la probabilidad de liberación (Albrecht et al., 2012), características que son propias de una sinapsis inmadura (Mozhayeva et al., 2002; Feldmeyer and Radnikow, 2009; Andreae et al., 2012).

Al estudiar el efecto de la aplicación local de SPARC durante 48 horas, observamos una modificación en la plasticidad a corto término, sin observar cambios en la neurotransmisión espontánea, por lo que el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión estaría segregado en el tiempo. Un modelo que podría explicar el efecto segregado de SPARC sobre la neurotransmisión espontánea y evocada, sería la existencia de dos depósitos de vesículas independientes, en donde las vesículas que forman el RRP y el depósito de reciclaje participarían en la actividad evocada y las vesículas del depósito de reserva en la neurotransmisión espontánea (figura 14B). Una posibilidad es que SPARC ejercería un efecto diferenciado en el tiempo sobre cada uno, observándose un efecto sobre las vesículas que participan en la actividad evocada tras 48 horas de exposición del terminal presináptico a concentraciones nanomolares de SPARC, efecto que se revierte a las 48 horas después de retirar el SPARC del medio de cultivo (Albrecht et al., 2012). El efecto de SPARC sobre el depósito de reserva, y por lo tanto sobre la actividad espontánea, requeriría una mayor exposición, razón por la cual se observa un incremento en la actividad espontánea sólo cuando existe una exposición prolongada en el tiempo. La proposición de la existencia de dos depósitos separados responsables de la neurotransmisión evocada y de la espontánea es consistente con la observación de que las sinapsis inmaduras sólo mantienen la neurotransmisión espontánea y el reciclado de las vesículas que participan en esta transmisión (Mozhayeva et al., 2002; Mohrmann et al., 2003; Wittenmayer et al., 2009; Andreae et al., 2012)

Nuestros resultados muestran cómo la concentración a la que se encuentre SPARC, una proteína matricelular, es determinante para la función sináptica, tanto para las sinapsis en desarrollo como para las sinapsis maduras. En sinapsis del SNC, se ha demostrado que SPARC, trombospondina y hevin, afectan la formación de nuevas sinapsis. Si bien hevin es una proteína que pertenece a la familia de SPARC, que produce una proteína muy similar a SPARC mediante proteólisis. Los resultados obtenidos por Kucukdereli y colaboradores, muestran un efecto antagónico entre ambas proteínas, donde trombospondina y hevin incrementan el número de contactos sinápticos, y SPARC antagoniza el efecto mediado por hevin (Kucukdereli et al., 2011). En un estudio reciente se ha demostrado que hevin y SPARC presentan un patrón de expresión similar durante el desarrollo, no obstante la expresión de hevin no se incrementa en los ratones deficientes en SPARC, como cabría esperar si las funciones de estas proteínas fuesen redundantes (Lloyd-Burton and Roskams, 2012), reforzando el planteamiento de que hevin y SPARC no ejercen el mismo efecto sobre la maduración sináptica, a pesar de pertenecer a una misma familia de molécula y a la semejanza estructural que comparten.

La acción de SPARC sobre las neuronas estaría mediado por la capacidad que tiene esta proteína para interactuar con las integrinas, un receptor de la MEC, específicamente con las subunidades β (Weaver et al., 2008; Jones et al., 2011). La presunción de que SPARC ejerce su acción sobre el terminal presináptico por su interacción con las integrinas se sustenta en que las integrinas $\alpha\beta 1$ se expresan ampliamente en el SCG (DeFreitas et al., 1995) y en que en las sinapsis nicotínicas del órgano eléctrico del pez torpedo las subunidades $\alpha 3$ de las integrinas forman un complejo con los canales de calcio dependientes de voltaje presinápticos, que se une a la zona activa y a proteínas del citoesqueleto (Carlson et al., 2010). Si bien aún no se conoce cómo los receptores de integrina modificarían la organización de los depósitos de vesículas, estos cambios podrían estar mediados por una alteración en la actina presináptica, la cual interacciona con los receptores de integrina y es un elemento clave para la organización de los depósitos de vesículas (Sakaba and Neher, 2003; Pechstein and Shupliakov, 2010). Habría que explorar por tanto, si SPARC esté mediando un cambio en la actina presináptica, ya que se ha descrito que esta proteína modifica el citoesqueleto de actina en células endoteliales en cultivo (Murphy-Ullrich et al., 1995).

Otro mecanismo potencial por el cual SPARC estaría mediando su efecto sobre la maduración sináptica se debería a una interacción directa o indirecta con las moléculas de adhesión celular presentes en las sinapsis. Esta proposición se basa en que se ha descrito que las sinapsis nicotínicas presenta cadherinas y el complejo neurexina-neuroliquina (Conroy et al., 2007; Ross and Conroy, 2008; Triana-Baltzer et al., 2008; Neff et al., 2009), en donde las neuroliquinas inducen la maduración del terminal presináptico de estas sinapsis, (Conroy et al., 2007), de forma similar a como ocurre con la NL-1 en las sinapsis excitatorias del sistema nervioso central (Scheiffele et al., 2000; Varoqueaux et al., 2006; Futai et al., 2007; Wittenmayer et al., 2009).

Estos resultados sugieren que SPARC podría estar disminuyendo o inhibiendo el nivel de expresión de NL1 en la sinapsis. Podría existir una interacción directa entre SPARC y NL, induciendo una disminución de NL disponible y, por lo tanto, una ruptura de la adhesión celular entre neurexina y neuroliquina; o a un mecanismo indirecto que indujera la inhibición de NL, como cuando se inhibe la N-cadherina (Stan et al., 2010; Aiga et al., 2011). A favor de este segundo mecanismo existe el antecedente de que SPARC inhibe la expresión de E-cadherina y P-cadherina en células no neuronales, efecto que estaría mediado por el módulo I ó II de SPARC, ya la falta del módulo III de SPARC no afecta la capacidad de esta proteína para inhibir la expresión de las cadherinas (Robert et al., 2006; Smit et al., 2007; Fenouille et al., 2012). La E-cadherina y la N-cadherina son miembros de las cadherinas clásicas, específicamente del subgrupo de tipo I (Suzuki et al., 1991). Los integrantes de ese subgrupo de cadherinas poseen un dominio citoplasmático altamente conservado, mediante el cual las cadherinas interaccionan con las proteínas citoplasmáticas cateninas (Aberle et al., 1994; Jou et al., 1995). La β -catenina es la proteína mediante la cual N-cadherina recluta NL-1 hacia la sinapsis, induciendo la maduración del terminal presináptico, sugiriendo que cualquier miembro de las cadherinas del subgrupo del tipo I podría ejercer esta acción.

Si bien N-cadherina es la cadherina clásica más estudiada en el sistema nervioso, hay estudios que demuestran que E-cadherina se expresa en las neuronas ganglionares de la retina, en donde participaría en el crecimiento de las neuritas (Xu et al., 2002; Oblander et al., 2007; Oblander and Brady-Kalnay, 2010), así como en el hipocampo, en donde la inhibición de E-cadherina disminuye la LTP (Tang et al., 1998). En un estudio reciente, se ha demostrado que E-cadherina se expresa en las neuronas inhibitorias de la corteza cerebral, en donde la inhibición de la expresión de E-cadherina conlleva una disminución del número de sinapsis gabaérgicas, sin

alterar el número de sinapsis glutamatérgicas, además de una disminución en la frecuencia de la actividad espontánea y de la amplitud de la respuesta evocada, características que son comparables a las observadas en las neuronas corticales inmaduras (Fiederling et al., 2011).

Por lo tanto, los efectos de SPARC sobre la maduración de los terminales presinápticos, en nuestras condiciones, podría deberse a la inhibición en la expresión de cadherina, lo que disminuiría el reclutamiento de neuroligandinas en la sinapsis, hecho que generaría terminales presinápticos inmaduros. Un antecedente que respalda este mecanismo propuesto es que NL-1 regula la plasticidad sináptica a corto plazo en las neuronas corticales, derivadas de células madre, en donde la inhibición de NL1 genera un incremento en la depresión a corto plazo y un terminal presináptico inmaduro (Jüngling et al., 2006).

Nuestros resultados sugieren que SPARC posee un rol fisiológico en la formación de nuevos contactos sinápticos durante el desarrollo del SCG, en donde el patrón de expresión de esta proteína concuerda con la última etapa sinaptogénica del SCG. Al momento de nacer, las neuronas del ganglio cervical superior proyectan los axones hacia los tejidos diana, inervándolos. Al mismo tiempo, las neuronas ganglionares reciben contactos de las neuronas preganglionares, formando contactos axosomáticos principalmente, porque a esta edad, las neuronas del ganglio poseen unos procesos dendríticos poco desarrollados, los cuales comienzan a crecer en este punto, incrementando el número de contactos axodendríticos a medida que se desarrollan (Rubin, 1985a, b, c). Estas observaciones concuerdan con lo caracterizado para SPARC en el hipocampo, en donde la máxima expresión de SPARC coincide con el período de mayor formación y reorganización de las sinapsis (Jones et al., 2011). Adicionalmente, la expresión de Notch nuclear, ha sido relacionado con el inicio del crecimiento de los procesos dendríticos (Redmond et al., 2000), reforzando la hipótesis de que SPARC estaría manteniendo los terminales presinápticos en un estado inmaduro, para favorecer la formación de nuevos contactos axodendríticos. La mayor fiabilidad y eficacia en la transmisión sináptica de las sinapsis inmaduras, estarían enfocadas para dar unas señales sinápticas más grandes y prolongadas, para así estabilizar las sinapsis inmaduras, por lo tanto, SPARC favorecería la estabilización de los nuevos contactos formados.

Finalmente, los efectos de SPARC sobre las sinapsis maduras, podrían ser de importancia para eventos particulares que puedan ocurrir después del establecimiento y maduración de las sinapsis, como por ejemplo en el caso de una lesión, porque los niveles de esta proteína aumentan

tras un daño en la corteza cerebral, en el hipocampo o en el bulbo olfatorio (Mendis et al., 1998; Liu et al., 2005; Au et al., 2007). En estos casos, las células gliales podrían emplear la habilidad de SPARC de inducir un estado inmaduro en las sinapsis, para generar un ambiente favorable para el establecimiento y/o la consolidación de los nuevos contactos sinápticos.

CONCLUSIONES

“Algún día en cualquier parte, en cualquier lugar indefectiblemente te encontrarás a tí mismo, y ésa, sólo ésa, puede ser la más feliz o la más amarga de tus horas”

Pablo Neruda

CONCLUSIONES

Tras la evaluación de los resultados obtenidos, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) Las células gliales obtenidas a partir del SCG, presentan en cultivo un fenotipo de célula de Schwann inmadura / indiferenciado.
- 2) Las células de Schwann inmaduras, secretan SPARC al medio extracelular *in vitro* e *in vivo*.
- 3) Las células de Schwann inmaduras ejercen múltiples efectos neuronales debido a la secreción de diversas proteínas con efectos sinápticos, tales como trombospondina o SPARC.
- 4) En el ganglio cervical superior de rata, la máxima producción de SPARC ocurre entre P0 y P2.
- 5) La maduración de las células de Schwann en cultivo está controlada por notch, cuya inactivación está asociada a una disminución de la producción de SPARC.
- 6) La Proteína SPARC se puede purificar del medio condicionado de células, mediante la técnica de HPLC.
- 7) SPARC es una proteína matricelular que incrementa la potencia sináptica, la frecuencia de la actividad espontánea y la depresión a corto término en las sinapsis autápticas colinérgicas.
- 8) Concentraciones nanomolares de SPARC durante el desarrollo neuronal, generan terminales presinápticos que contienen de dos a tres veces menos vesículas acopladas a las zonas activas y a nivel citoplasmático.

- 9) La liberación local de SPARC durante 48 horas, incrementa la potencia sináptica y la depresión a corto término, sin modificar la frecuencia de la neurotransmisión espontánea.

- 10) El efecto de SPARC sobre la neurotransmisión es tiempo y concentración dependiente.

Considerando todos estas evidencias experimentales, la conclusión final de esta tesis doctoral es que SPARC es una proteína capaz de retener los terminales presinápticos colinérgicos en un estado inmaduro. La relevancia de esta observación se conseguirá con más estudios a nivel del sistema nervioso central, durante diferentes etapas del desarrollo, o en condiciones patológicas.

BIBLIOGRAFÍA

“En la razón sólo entraran las dudas que tengan llave”

Mario Benedetti

BIBLIOGRAFÍA

- Abe K, Chisaka O, Van Roy F, Takeichi M (2004) Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci* 7:357-363.
- Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 107 (Pt 12):3655-3663.
- Abraham WC, Williams JM (2008) LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem* 89:260-268.
- Adams JC (2004) Functions of the conserved thrombospondin carboxy-terminal cassette in cell-extracellular matrix interactions and signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1102-1114.
- Aiga M, Levinson JN, Bamji SX (2011) N-cadherin and neuroligins cooperate to regulate synapse formation in hippocampal cultures. *J Biol Chem* 286:851-858.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) Molecular biology of the cell. Fifth edition. *Molecular biology of the cell* Fifth edition.
- Albrecht D, Lopez-Murcia FJ, Perez-Gonzalez AP, Lichtner G, Solsona C, Llobet A (2012) SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals. *Molecular and cellular neurosciences* 49:364-374.
- Alexopoulou AN, Multhaupt HA, Couchman JR (2007) Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* 39:505-528.
- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457:675-677.
- Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, Smith SJ, Barres BA (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486:410-414.
- Alliel PM, Perin JP, Jollès P, Bonnet FJ (1993) Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *Eur J Biochem* 214:347-350.
- Alpár A, Gärtner U, Härtig W, Brückner G (2006) Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Res* 1120:13-22.
- Andersson F, Jakobsson J, Löw P, Shupliakov O, Brodin L (2008) Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *J Neurosci* 28:3925-3933.
- Andreae LC, Ben Fredj N, Burrone J (2012) Independent Vesicle Pools Underlie Different Modes of Release during Neuronal Development. *Journal of Neuroscience* 32:1867-1874.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998a) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822-6829.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998b) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Asher RA, Scheibe RJ, Keiser HD, Bignami A (1995) On the existence of a cartilage-like proteoglycan and link proteins in the central nervous system. *Glia* 13:294-308.
- Atwood HL, Govind CK, Wu CF (1993) Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* 24:1008-1024.
- Au E, Richter MW, Vincent AJ, Tetzlaff W, Aebersold R, Sage EH, Roskams AJ (2007) SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci* 27:7208-7221.
- Aumailley M et al. (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24:326-332.

- Bamji SX, Shimazu K, Kimes N, Huelsken J, Birchmeier W, Lu B, Reichardt LF (2003) Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron* 40:719-731.
- Bampton ET, Ma CH, Tolkovsky AM, Taylor JS (2005) Osteonectin is a Schwann cell-secreted factor that promotes retinal ganglion cell survival and process outgrowth. *Eur J Neurosci* 21:2611-2623.
- Bartsch S, Bartsch U, Dörries U, Faissner A, Weller A, Ekblom P, Schachner M (1992) Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci* 12:736-749.
- Bartsch U (1996) The extracellular matrix molecule tenascin-C: expression in vivo and functional characterization in vitro. *Prog Neurobiol* 49:145-168.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
- Bekku Y, Su WD, Hirakawa S, Fässler R, Ohtsuka A, Kang JS, Sanders J, Murakami T, Ninomiya Y, Oohashi T (2003) Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci* 24:148-159.
- Benson DL, Tanaka H (1998) N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6892-6904.
- Benson DL, Colman DR, Huntley GW (2001) Molecules, maps and synapse specificity. *Nat Rev Neurosci* 2:899-909.
- Bertolotto A, Rocca G, Schiffer D (1990) Chondroitin 4-sulfate proteoglycan forms an extracellular network in human and rat central nervous system. *J Neurol Sci* 100:113-123.
- Bhoopathi P, Gondi CS, Gujrati M, Dinh DH, Lakka SS (2011) SPARC mediates Src-induced disruption of actin cytoskeleton via inactivation of small GTPases Rho-Rac-Cdc42. *Cell Signal* 23:1978-1987.
- Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, Chen XD, Young MF (2005) Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 280:30481-30489.
- Biederer T (2006) Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics* 87:139-150.
- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531.
- Bignami A, Hosley M, Dahl D (1993) Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol (Berl)* 188:419-433.
- Birks R, Macintosh FC (1961) Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 39:787-827.
- Bix G, Iozzo RV (2008) Novel interactions of perlecan: unraveling perlecan's role in angiogenesis. *Microsc Res Tech* 71:339-348.
- Blitz DM, Foster KA, Regehr WG (2004) Short-term synaptic plasticity: A comparison of two synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 5:630-640.
- Bonnet F, Perin JP, Charbonnier F, Camuzat A, Roussel G, Nussbaum JL, Alliel PM (1996) Structure and cellular distribution of mouse brain testican - Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *Journal of Biological Chemistry* 271:4373-4380.
- Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417:649-653.
- Bornstein P (1995) Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 130:503-506.

- Bornstein P (2001) Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *Journal of Clinical Investigation* 107:929-934.
- Bornstein P, Sage EH (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology* 14:608-616.
- Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR (2004) The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1115-1125.
- Bottenstein JE, Sato GH (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:514-517.
- Bradshaw AD (2012) Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:480-488.
- Bradshaw AD, Sage EH (2001) SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107:1049-1054.
- Bradshaw AD, Graves DC, Motamed K, Sage EH (2003a) SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6045-6050.
- Bradshaw AD, Francki A, Motamed K, Howe C, Sage EH (1999) Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol Biol Cell* 10:1569-1579.
- Bradshaw AD, Puolakkainen P, Dasgupta J, Davidson JM, Wight TN, Helene Sage E (2003b) SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol* 120:949-955.
- Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, Böckers TM, Zhou X, Kreutz MR, Montag D, Gundelfinger ED, Fässler R (2002) Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol* 22:7417-7427.
- Brauer K, Härtig W, Bigl V, Brückner G (1993) Distribution of parvalbumin-containing neurons and lectin-binding perineuronal nets in the rat basal forebrain. *Brain Res* 631:167-170.
- Brekken RA, Sage EH (2000) SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol* 19:569-580.
- Brekken RA, Sage EH (2001) SPARC, a matricellular protein: At the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biology* 19:816-827.
- Brellier F, Ruggiero S, Zwolanek D, Martina E, Hess D, Brown-Luedi M, Hartmann U, Koch M, Merlo A, Lino M, Chiquet-Ehrismann R (2011) SMOC1 is a tenascin-C interacting protein over-expressed in brain tumors. *Matrix Biology* 30:225-233.
- Bristow J, Tee MK, Gitelman SE, Mellon SH, Miller WL (1993) Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol* 122:265-278.
- Brodkey JA, Laywell ED, O'Brien TF, Faissner A, Stefansson K, Dörries HU, Schachner M, Steindler DA (1995) Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J Neurosurg* 82:106-112.
- Brose N (1999) Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system. *Naturwissenschaften* 86:516-524.
- Brückner G, Morawski M, Arendt T (2008) Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* 151:489-504.
- Brückner G, Seeger G, Brauer K, Härtig W, Kacza J, Bigl V (1994) Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the Mongolian gerbil and rat. *Brain Res* 658:67-86.

- Brückner G, Grosche J, Schmidt S, Härtig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M (2000) Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 428:616-629.
- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A (1993) Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8:183-200.
- Budreck EC, Scheiffele P (2007) Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci* 26:1738-1748.
- Bukalo O, Schachner M, Dityatev A (2001) Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of Tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 104:359-369.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience* 28:264-278.
- Calzada MJ, Sipes JM, Krutzsch HC, Yurchenco PD, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD (2003) Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by alpha6beta1 integrin. *J Biol Chem* 278:40679-40687.
- Calzada MJ, Annis DS, Zeng B, Marcinkiewicz C, Banas B, Lawler J, Mosher DF, Roberts DD (2004a) Identification of novel beta1 integrin binding sites in the type 1 and type 2 repeats of thrombospondin-1. *J Biol Chem* 279:41734-41743.
- Calzada MJ, Zhou L, Sipes JM, Zhang J, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD (2004b) Alpha4beta1 integrin mediates selective endothelial cell responses to thrombospondins 1 and 2 in vitro and modulates angiogenesis in vivo. *Circ Res* 94:462-470.
- Cao G, Ko C-P (2007) Schwann cell-derived factors modulate synaptic activities at developing neuromuscular synapses. *Journal of Neuroscience* 27:6712-6722.
- Carbonetto S (1984) The extracellular matrix of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 7:382-387.
- Carlson CB, Lawler J, Mosher DF (2008) Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci* 65:672-686.
- Carlson SS, Valdez G, Sanes JR (2010) Presynaptic calcium channels and $\alpha 3$ -integrins are complexed with synaptic cleft laminins, cytoskeletal elements and active zone components. *J Neurochem* 115:654-666.
- Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW (2007) Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *Journal of Comparative Neurology* 501:83-94.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *Journal of Comparative Neurology* 494:559-577.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JCF, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133:2331-2347.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: past and present. *Trends in Neurosciences* 21:510-514.
- Charbonnier F, Chanoine C, Cifuentes-Diaz C, Gallien CL, Rieger F, Alliel PM, Périn JP (2000) Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. *Mech Dev* 90:317-321.

- Chen C, Blitz DM, Regehr WG (2002) Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. *Neuron* 33:779-788.
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307:1324-1328.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2004) Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1085-1089.
- Choi Y, Chung H, Jung H, Couchman JR, Oh E-S (2011) Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity. *Matrix Biology* 30:93-99.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120:421-433.
- Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Südhof TC (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54:919-931.
- Chung C, Barylko B, Leitz J, Liu X, Kavalali ET (2010) Acute Dynamin Inhibition Dissects Synaptic Vesicle Recycling Pathways That Drive Spontaneous and Evoked Neurotransmission. *Journal of Neuroscience* 30:1363-1376.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Cochilla AJ, Angleson JK, Betz WJ (1999) Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci* 22:1-10.
- Cognato H, Yurchenco PD (2000) Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics* 218:213-234.
- Conroy WG, Nai Q, Ross B, Naughton G, Berg DK (2007) Postsynaptic neuroligin enhances presynaptic inputs at neuronal nicotinic synapses. *Dev Biol* 307:79-91.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Couchman JR (2003) Syndecans: Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:926-937.
- Craig AM, Kang Y (2007) Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 17:43-52.
- Crossin KL, Hoffman S, Grumet M, Thiery JP, Edelman GM (1986) Site-restricted expression of cytactin during development of the chicken embryo. *J Cell Biol* 102:1917-1930.
- Crowther JR (1995) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 42. ELISA: Theory and practice. *Methods in Molecular Biology*; ELISA: Theory and practice 42.
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS (2007) Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 8:206-220.
- Danen EHJ, Yamada KM (2001) Fibronectin, integrins, and growth control. *Journal of Cellular Physiology* 189:1-13.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.
- de Lange RP, de Roos AD, Borst JG (2003) Two modes of vesicle recycling in the rat calyx of Held. *J Neurosci* 23:10164-10173.
- De Simoni A, Griesinger CB, Edwards FA (2003) Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol* 550:135-147.
- Dean DA, Gasiorowski JZ (2011) Liposome-mediated transfection. *Cold Spring Harbor protocols* 2011:prot5583. doi: 5510.1101/pdb.prot5583.
- Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain - A different

- disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 281:17789-17800.
- DeFreitas MF, Yoshida CK, Frazier WA, Mendrick DL, Kypta RM, Reichardt LF (1995) Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron* 15:333-343.
- Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- Delany AM, Kalajzic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E (2003) Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology* 144:2588-2596.
- Delgado R, Maureira C, Oliva C, Kidokoro Y, Labarca P (2000) Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron* 28:941-953.
- Delpech B, Delpech A, Brückner G, Girard N, Maingonnat C (1989) Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system. *Ciba Found Symp* 143:208-220; discussion 221-232, 281-205.
- Denker A, Rizzoli SO (2010) Synaptic vesicle pools: an update. *Frontiers in synaptic neuroscience* 2:135.
- Denker A, Kröhnert K, Rizzoli SO (2009) Revisiting synaptic vesicle pool localization in the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Physiol* 587:2919-2926.
- Dityatev A, Schachner M (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 4:456-468.
- Dityatev A, Rusakov DA (2011) Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol* 21:353-359.
- Dityatev A, Frischknecht R, Seidenbecher CI (2006) Extracellular matrix and synaptic functions. *Results Probl Cell Differ* 43:69-97.
- Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M (2010a) Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci* 33:503-512.
- Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P (2010b) The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 11:735-746.
- Dityatev A, Brückner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, Schachner M (2007) Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Developmental Neurobiology* 67:570-588.
- Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR (1995) Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15:585-596.
- Dours-Zimmermann MT, Maurer K, Rauch U, Stoffel W, Fässler R, Zimmermann DR (2009) Versican V2 Assembles the Extracellular Matrix Surrounding the Nodes of Ranvier in the CNS. *Journal of Neuroscience* 29:7731-7742.
- Doussau F, Humeau Y, Benfenati F, Poulain B (2010) A novel form of presynaptic plasticity based on the fast reactivation of release sites switched off during low-frequency depression. *J Neurosci* 30:16679-16691.
- Dowell JA, Johnson JA, Li L (2009) Identification of Astrocyte Secreted Proteins with a Combination of Shotgun Proteomics and Bioinformatics. *Journal of Proteome Research* 8:4135-4143.
- Edgell CJS, BaSalamah MA, Marr HS (2004) Testican-1: A differentially expressed proteoglycan with protease inhibiting activities. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 236 236:101-122.

- Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ (2005) Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J Neurosci* 25:3638-3650.
- Elmqvist D, Quastel DMJ (1965) A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *Journal of Physiology-London* 178:505-529.
- Elmqvist D, Kugelberg J, Hofmann WW, Quastel DMJ (1964) An electrophysiological investigation of neuromuscular transmission in myasthenia gravis. *Journal of Physiology-London* 174:417-434.
- Elste AM, Benson DL (2006) Structural basis for developmentally regulated changes in cadherin function at synapses. *J Comp Neurol* 495:324-335.
- Elzie CA, Murphy-Ullrich JE (2004) The N-terminus of thrombospondin: the domain stands apart. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1090-1101.
- Eroglu C, Barres BA (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468:223-231.
- Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Oezkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA (2009) Gabapentin Receptor alpha 2 delta-1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell* 139:380-392.
- Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bosl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M (2002) Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *Journal of Neuroscience* 22:7177-7194.
- Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, Gundelfinger ED, Seidenbecher C (2010) Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev* 63:26-38.
- Fassel TA, Edmiston CE (1999) Ruthenium red and the bacterial glycocalyx. *Biotechnic & Histochemistry* 74:194-212.
- Fatt P, Katz B (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 115:320-370.
- Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117:109-128.
- Feldmeyer D, Radnikow G (2009) Developmental alterations in the functional properties of excitatory neocortical synapses. *Journal of Physiology-London* 587:1889-1896.
- Feng Z, Ko C-P (2008) Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor-beta 1. *Journal of Neuroscience* 28:9599-9609.
- Fenouille N, Tichet M, Dufies M, Pottier A, Mogha A, Soo JK, Rocchi S, Mallavialle A, Galibert MD, Khammari A, Lacour JP, Ballotti R, Deckert M, Tartare-Deckert S (2012) The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* 7:e40378.
- Ferhat L, Chevassus au Louis N, Jorquera I, Niquet J, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y, Represa A (1996) Transient increase of tenascin-C in immature hippocampus: astroglial and neuronal expression. *J Neurocytol* 25:53-66.
- Fernández-Alfonso T, Kwan R, Ryan TA (2006) Synaptic vesicles interchange their membrane proteins with a large surface reservoir during recycling. *Neuron* 51:179-186.
- Ferrari do Outeiro-Bernstein MA, Nunes SS, Andrade AC, Alves TR, Legrand C, Morandi V (2002) A recombinant NH(2)-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biol* 21:311-324.

- Fiederling A, Ewert R, Andreyeva A, Jüngling K, Gottmann K (2011) E-cadherin is required at GABAergic synapses in cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 501:167-172.
- Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17537-17542.
- Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 21:269-274.
- Fitzgerald MC, Schwarzbauer JE (1998) Importance of the basement membrane protein SPARC for viability and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 8:1285-1288.
- Fogel AI, Stagi M, Perez de Arce K, Biederer T (2011) Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation. *EMBO J* 30:4728-4738.
- Fogel AI, Akins MR, Krupp AJ, Stagi M, Stein V, Biederer T (2007) SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J Neurosci* 27:12516-12530.
- Forsberg E, Hirsch E, Frohlich L, Meyer M, Ekblom P, Aszodi A, Werner S, Fassler R (1996) Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6594-6599.
- Francki A, McClure TD, Brekken RA, Motamed K, Murri C, Wang T, Sage EH (2004) SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 91:915-925.
- Frangogiannis NG (2012) Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev* 92:635-688.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123:4195-4200.
- Fredj NB, Burrone J (2009) A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nature Neuroscience* 12:751-U102.
- Freitag S, Schachner M, Morellini F (2003) Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Behav Brain Res* 145:189-207.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience* 12:897-U115.
- Fukamauchi F, Mataga N, Wang YJ, Sato S, Youshiki A, Kusakabe M (1996) Abnormal behavior and neurotransmissions of tenascin gene knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 221:151-156.
- Funk SE, Sage EH (1993) Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 154:53-63.
- Furshpan EJ, Landis SC, Matsumoto SG, Potter DD (1986) Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J Neurosci* 6:1061-1079.
- Futai K, Kim MJ, Hashikawa T, Scheiffle P, Sheng M, Hayashi Y (2007) Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroigin. *Nat Neurosci* 10:186-195.
- Galtrey CM, Fawcett JW (2007) The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 54:1-18.
- Galtrey CM, Kwok JC, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW (2008) Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 27:1373-1390.

- Galvin NJ, Vance PM, Dixit VM, Fink B, Frazier WA (1987) Interaction of human thrombospondin with types I-V collagen: direct binding and electron microscopy. *J Cell Biol* 104:1413-1422.
- Gao G, Westling J, Thompson VP, Howell TD, Gottschall PE, Sandy JD (2002) Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem* 277:11034-11041.
- Garner CC, Waites CL, Ziv NE (2006) Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. *Cell and Tissue Research* 326:249-262.
- Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, Götz B, Silver J, Steindler DA (1995) Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J Comp Neurol* 361:249-266.
- Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 271:5768-5776.
- Gersdorff N, Mueller M, Schall A, Miosge N (2006) Secreted modular calcium-binding protein-1 localization during mouse embryogenesis. *Histochemistry and Cell Biology* 126:705-712.
- Giamanco KA, Matthews RT (2012) Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. *Neuroscience* 218:367-384.
- Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MBL, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, Hogan BLM, Evans MJ, Colledge WH (1998) Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *Embo Journal* 17:1860-1870.
- Giudici C, Raynal N, Wiedemann H, Cabral WA, Marini JC, Timpl R, Baechinger HP, Farndale RW, Sasaki T, Tenni R (2008) Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *Journal of Biological Chemistry* 283:19551-19560.
- Goicoechea S, Orr AW, Pallero MA, Eggleton P, Murphy-Ullrich JE (2000) Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 275:36358-36368.
- Golembieski WA, Thomas SL, Schultz CR, Yunker CK, McClung HM, Lemke N, Cazacu S, Barker T, Sage EH, Brodie C, Rempel SA (2008) HSP27 mediates SPARC-induced changes in glioma morphology, migration, and invasion. *Glia* 56:1061-1075.
- Gongidi V, Ring C, Moody M, Brekken R, Sage EH, Rakic P, Anton ES (2004) SPARC-like 1 regulates the terminal phase of radial glia-guided migration in the cerebral cortex. *Neuron* 41:57-69.
- Goritz C, Mauch DH, Pfrieder FW (2005) Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci* 29:190-201.
- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013-1026.
- Greenwood JA, Murphy-Ullrich JE (1998) Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility. *Microsc Res Tech* 43:420-432.
- Groemer TW, Klingauf J (2007) Synaptic vesicles recycling spontaneously and during activity belong to the same vesicle pool. *Nat Neurosci* 10:145-147.
- Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM (1985) Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8075-8079.
- Guimarães A, Zaremba S, Hockfield S (1990) Molecular and morphological changes in the cat lateral geniculate nucleus and visual cortex induced by visual deprivation are revealed by monoclonal antibodies Cat-304 and Cat-301. *J Neurosci* 10:3014-3024.

- Gulick T (2003) Transfection using DEAE-dextran. *Current protocols in cell biology* / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 20.
- Gundelfinger ED, Frischknecht R, Choquet D, Heine M (2010) Converting juvenile into adult plasticity: a role for the brain's extracellular matrix. *Eur J Neurosci* 31:2156-2165.
- Gupton SL, Waterman-Storer CM (2006) Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell* 125:1361-1374.
- Gurevicius K, Kuang F, Stoenica L, Irintchev A, Gureviciene I, Dityatev A, Schachner M, Tanila H (2009) Genetic Ablation of Tenascin-C Expression Leads to Abnormal Hippocampal CA1 Structure and Electrical Activity In Vivo. *Hippocampus* 19:1232-1246.
- Haddock G, Cross AK, Allan S, Sharrack B, Callaghan J, Bunning RA, Buttle DJ, Woodroffe MN (2007) Brevican and phosphacan expression and localization following transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Biochem Soc Trans* 35:692-694.
- Hambrock HO, Nitsche DP, Hansen U, Bruckner P, Paulsson M, Maurer P, Hartmann U (2003) SC1/hevin - An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I. *Journal of Biological Chemistry* 278:11351-11358.
- Hambrock HO, Kaufmann B, Muller S, Hanisch FG, Nose K, Paulsson M, Maurer P, Hartmann U (2004) Structural characterization of TSC-36/Flik - Analysis of two charge isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 279:11727-11735.
- Hamilton NB, Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews Neuroscience* 11:227-238.
- Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S (2005) Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 5:51-63.
- Harata N, Ryan TA, Smith SJ, Buchanan J, Tsien RW (2001) Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12748-12753.
- Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002) A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat Genet* 32:411-414.
- Harroch S, Palmeri M, Rosenbluth J, Custer A, Okigaki M, Shrager P, Blum M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2000) No obvious abnormality in mice deficient in receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Mol Cell Biol* 20:7706-7715.
- Hartline DK, Colman DR (2007) Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Current Biology* 17.
- Hasselaar P, Sage EH (1992) SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 49:272-283.
- Haunso A, Ibrahim M, Bartsch U, Letiembre M, Celio MR, Menoud PA (2000) Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. *Brain Research* 864.
- Heine M, Groc L, Frischknecht R, Beique J-C, Lounis B, Rumbaugh G, Haganir RL, Cognet L, Choquet D (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320.
- Herndon ME, Stipp CS, Lander AD (1999) Interactions of neural glycosaminoglycans and proteoglycans with protein ligands: assessment of selectivity, heterogeneity and the participation of core proteins in binding. *Glycobiology* 9:143-155.
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315-344.
- Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L (1979) Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81:275-300.

- Hilfiker S, Schweizer FE, Kao HT, Czernik AJ, Greengard P, Augustine GJ (1998) Two sites of action for synapsin domain E in regulating neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 1:29-35.
- Hirakawa S, Oohashi T, Su WD, Yoshioka H, Murakami T, Arata J, Ninomiya Y (2000) The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276.
- Hirano S, Suzuki ST, Redies C (2003) The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci* 8:d306-355.
- Hohenester E, Maurer P, Timpl R (1997) Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *Embo Journal* 16:3778-3786.
- Hohenester E, Sasaki T, Giudici C, Farndale RW, Baechinger HP (2008) Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:18273-18277.
- Holt M, Cooke A, Neef A, Lagnado L (2004) High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse. *Curr Biol* 14:173-183.
- Hoon M, Soykan T, Falkenburger B, Hammer M, Patrizi A, Schmidt KF, Sassoè-Pognetto M, Löwel S, Moser T, Taschenberger H, Brose N, Varoqueaux F (2011) Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3053-3058.
- Hua Y, Sinha R, Martineau M, Kahms M, Klingauf J (2010) A common origin of synaptic vesicles undergoing evoked and spontaneous fusion. *Nat Neurosci* 13:1451-1453.
- Huang WT, Chiquet-Ehrismann R, Moyano JV, Garcia-Pardo A, Orend G (2001) Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Research* 61.
- Hughes EG, Elmariah SB, Balice-Gordon RJ (2010) Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci* 43:136-145.
- Humeau Y, Doussau F, Vitiello F, Greengard P, Benfenati F, Poulain B (2001) Synapsin controls both reserve and releasable synaptic vesicle pools during neuronal activity and short-term plasticity in *Aplysia*. *J Neurosci* 21:4195-4206.
- Huynh MH, Sage EH, Ringuette M (1999) A calcium-binding motif in SPARC/osteonectin inhibits chordomesoderm cell migration during *Xenopus laevis* gastrulation: Evidence of counter-adhesive activity in vivo. *Development Growth & Differentiation* 41:407-418.
- Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326:1216-1219.
- Härtig W, Brauer K, Brückner G (1992) *Wisteria floribunda* agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* 3:869-872.
- Härtig W, Singer A, Grosche J, Brauer K, Ottersen OP, Brückner G (2001) Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Res* 899:123-133.
- Ichtchenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, Südhof TC (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81:435-443.
- Iida J, Hirabayashi S, Sato Y, Hata Y (2004) Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroligin. *Mol Cell Neurosci* 27:497-508.
- Inoue T, Tanaka T, Suzuki SC, Takeichi M (1998) Cadherin-6 in the developing mouse brain: expression along restricted connection systems and synaptic localization suggest a potential role in neuronal circuitry. *Dev Dyn* 211:338-351.

- Iozzo RV, Murdoch AD (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10:598-614.
- Irintchev A, Rollenhagen A, Troncoso E, Kiss JZ, Schachner M (2005) Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex* 15:950-962.
- Jankovski A, Sotelo C (1996) Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol* 371:376-396.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience* 6:671-682.
- Jessen KR, Mirsky R (2008) Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56:1552-1565.
- John N, Krügel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Seidenbecher CI (2006) Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci* 31:774-784.
- Jones EV, Bernardinelli Y, Tse YC, Chierzi S, Wong TP, Murai KK (2011) Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions. *J Neurosci* 31:4154-4165.
- Jones PL, Jones FS (2000) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol* 19:581-596.
- Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Marris JA (1995) Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5067-5071.
- Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 61:198-223.
- Jüngling K, Eulenburg V, Moore R, Kemler R, Lessmann V, Gottmann K (2006) N-cadherin transsynaptically regulates short-term plasticity at glutamatergic synapses in embryonic stem cell-derived neurons. *J Neurosci* 26:6968-6978.
- Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120:1955-1958.
- Kato Y, Sakai N, Baba M, Kaneko S, Kondo K, Kubota Y, Yao M, Shuin T, Saito S, Koshika S, Kawase T, Miyagi Y, Aoki I, Nagashima Y (1998) Stimulation of motility of human renal cell carcinoma by SPARC/Osteonectin/BM-40 associated with type IV collagen. *Invasion Metastasis* 18:105-114.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.
- Katz B, Miledi R (1969) Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J Physiol* 203:689-706.
- Kawano H, Ohyama K, Kawamura K, Nagatsu I (1995) Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res* 86:101-113.
- Kidokoro Y, Kuromi H, Delgado R, Maureira C, Oliva C, Labarca P (2004) Synaptic vesicle pools and plasticity of synaptic transmission at the *Drosophila* synapse. *Brain Res Brain Res Rev* 47:18-32.
- Kiernan BW, Garcion E, Ferguson J, Frost EE, Torres EM, Dunnett SB, Saga Y, Aizawa S, Faissner A, Kaur R, Franklin RJ, French-Constant C (1999) Myelination and behaviour of tenascin-C null transgenic mice. *Eur J Neurosci* 11:3082-3092.
- Kimura H, Akiyama H, Nakamura T, de Crombrughe B (2007) Tenascin-W inhibits proliferation and differentiation of preosteoblasts during endochondral bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 356:935-941.

- Kingston RE, Chen CA, Okayama H (2003) Calcium phosphate transfection. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]* Chapter 20.
- Ko J, Zhang C, Arac D, Boucard AA, Brunger AT, Südhof TC (2009) Neuroligin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. *EMBO J* 28:3244-3255.
- Kochlamazashvili G, Henneberger C, Bukalo O, Dvoretzkova E, Senkov O, Lievens PMJ, Westenbroek R, Engel AK, Catterall WA, Rusakov DA, Schachner M, Dityatev A (2010) The Extracellular Matrix Molecule Hyaluronic Acid Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity by Modulating Postsynaptic L-Type Ca²⁺ Channels. *Neuron* 67:116-128.
- Koenig JH, Ikeda K (1999) Contribution of active zone subpopulation of vesicles to evoked and spontaneous release. *J Neurophysiol* 81:1495-1505.
- Korn MJ, Koppel SJ, Li LH, Mehta D, Mehta SB, Seidl AH, Cramer KS (2012) Astrocyte-secreted factors modulate the developmental distribution of inhibitory synapses in nucleus laminaris of the avian auditory brainstem. *J Comp Neurol* 520:1262-1277.
- Kosaka T, Heizmann CW (1989) Selective staining of a population of parvalbumin-containing GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine. *Brain Res* 483:158-163.
- Krutzsch HC, Choe BJ, Sipes JM, Guo N, Roberts DD (1999) Identification of an alpha(3)beta(1) integrin recognition sequence in thrombospondin-1. *J Biol Chem* 274:24080-24086.
- Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI, Conatser LM, Chakraborty C, Workman G, Weaver M, Sage EH, Barres BA, Eroglu C (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:E440-E449.
- Kupprion C, Motamed K, Sage EH (1998) SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 273:29635-29640.
- Kuromi H, Kidokoro Y (1999) The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* 19:1557-1565.
- Kuromi H, Kidokoro Y (2000) Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses. *Neuron* 27:133-143.
- Kuromi H, Kidokoro Y (2002) Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of Ca²⁺ at the *Drosophila* synapse. *Neuron* 35:333-343.
- Kuromi H, Kidokoro Y (2003) Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32:551-565.
- Kuromi H, Ueno K, Kidokoro Y (2010) Two types of Ca²⁺ channel linked to two endocytic pathways coordinately maintain synaptic transmission at the *Drosophila* synapse. *Eur J Neurosci* 32:335-346.
- Kuznetsova SA, Issa P, Perruccio EM, Zeng B, Sipes JM, Ward Y, Seyfried NT, Fielder HL, Day AJ, Wight TN, Roberts DD (2006) Versican-thrombospondin-1 binding in vitro and colocalization in microfibrils induced by inflammation on vascular smooth muscle cells. *J Cell Sci* 119:4499-4509.
- Kwok JC, Carulli D, Fawcett JW (2010) In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem* 114:1447-1459.
- Kwok JC, Warren P, Fawcett JW (2012) Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix. *Int J Biochem Cell Biol* 44:582-586.
- Kwok JC, Afshari F, García-Alías G, Fawcett JW (2008) Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci* 26:131-145.

- Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW (2011) Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* 71:1073-1089.
- Kyriakides TR, Bornstein P (2003) Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost* 90:986-992.
- Köppe G, Brückner G, Härtig W, Delpech B, Bigl V (1997) Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochem J* 29:11-20.
- Lafon-Cazal M, Adjali O, Galelotti N, Poncet J, Jouin P, Homburger V, Bockaert J, Marin P (2003) Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse - Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *Journal of Biological Chemistry* 278:24438-24448.
- Lagnado L, Gomis A, Job C (1996) Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron* 17:957-967.
- Lahav J, Schwartz MA, Hynes RO (1982) Analysis of platelet adhesion with a radioactive chemical crosslinking reagent: interaction of thrombospondin with fibronectin and collagen. *Cell* 31:253-262.
- Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5:45-54.
- Lane TF, Sage EH (1994) The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 8:163-173.
- Larson RS, Corbi AL, Berman L, Springer T (1989) Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J Cell Biol* 108:703-712.
- Lawler J, Ferro P, Duquette M (1992) Expression and mutagenesis of thrombospondin. *Biochemistry* 31:1173-1180.
- Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE (1978) Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 253:8609-8616.
- Leitinger B (2011) Transmembrane collagen receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:265-290.
- Leitinger B, Hohenester E (2007) Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26:146-155.
- Levinson JN, Li R, Kang R, Moukhles H, El-Husseini A, Bamji SX (2010) Postsynaptic scaffolding molecules modulate the localization of neuroligins. *Neuroscience* 165:782-793.
- Li K-C, Zhang F-X, Li C-L, Wang F, Yu M-Y, Zhong Y-Q, Zhang K-H, Lu Y-J, Wang Q, Ma X-L, Yao J-R, Wang J-Y, Lin L-B, Han M, Zhang Y-Q, Kuner R, Xiao H-S, Bao L, Gao X, Zhang X (2011) Follistatin-like 1 Suppresses Sensory Afferent Transmission by Activating Na⁺,K⁺-ATPase. *Neuron* 69:974-987.
- Li YW, Rao PK, Wen R, Song Y, Muir D, Wallace P, van Horne SJ, Tennekoon GI, Kadesch T (2004) Notch and Schwann cell transformation. *Oncogene* 23:1146-1152.
- Lin MY, Teng H, Wilkinson RS (2005) Vesicles in snake motor terminals comprise one functional pool and utilize a single recycling strategy at all stimulus frequencies. *J Physiol* 568:413-421.
- Liu QY, Schaffner AE, Li YX, Dunlap V, Barker JL (1996) Upregulation of GABA(A) current by astrocytes in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 16:2912-2923.
- Liu QY, Schaffner AE, Chang YH, Vaszil K, Barker JL (1997) Astrocytes regulate amino acid receptor current densities in embryonic rat hippocampal neurons. *Journal of Neurobiology* 33:848-864.
- Liu X, Ying GX, Wang WY, Dong JH, Wang Y, Ni ZM, Zhou CF (2005) Entorhinal deafferentation induces upregulation of SPARC in the mouse hippocampus. *Molecular Brain Research* 141:58-65.
- Lively S, Brown IR (2008) Localization of the extracellular matrix protein SC1 coincides with synaptogenesis during rat postnatal development. *Neurochem Res* 33:1692-1700.

- Lively S, Ringuette MJ, Brown IR (2007) Localization of the extracellular matrix protein SC1 to synapses in the adult rat brain. *Neurochem Res* 32:65-71.
- Lloyd-Burton S, Roskams AJ (2012) SPARC-like 1 (SC1) is a diversely expressed and developmentally regulated matricellular protein that does not compensate for the absence of SPARC in the CNS. *J Comp Neurol* 520:2575-2590.
- Lopez TJ, De Vries GH (1999) Isolation and serum-free culture of primary Schwann cells from human fetal peripheral nerve. *Exp Neurol* 158:1-8.
- Ma CH, Palmer A, Taylor JS (2009) Synergistic effects of osteonectin and NGF in promoting survival and neurite outgrowth of superior cervical ganglion neurons. *Brain Res* 1289:1-13.
- Ma CH, Bampton ET, Evans MJ, Taylor JS (2010) Synergistic effects of osteonectin and brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells neurite outgrowth via the mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways. *Neuroscience* 165:463-474.
- Maeda N, Hamanaka H, Oohira A, Noda M (1995) Purification, characterization and developmental expression of a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, 6B4 proteoglycan/phosphacan. *Neuroscience* 67:23-35.
- Margolis RK, Margolis RU, Preti C, Lai D (1975) Distribution and metabolism of glycoproteins and glycosaminoglycans in subcellular fractions of brain. *Biochemistry* 14:4797-4804.
- Marr HS, Edgell CJ (2003) Testican-1 inhibits attachment of Neuro-2a cells. *Matrix Biol* 22:259-266.
- Mathew SS, Pozzo-Miller L, Hablitz JJ (2008) Kainate modulates presynaptic GABA release from two vesicle pools. *J Neurosci* 28:725-731.
- Matsui F, Nishizuka M, Yasuda Y, Aono S, Watanabe E, Oohira A (1998) Occurrence of a N-terminal proteolytic fragment of neurocan, not a C-terminal half, in a perineuronal net in the adult rat cerebrum. *Brain Res* 790:45-51.
- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S (2002) Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci* 22:7536-7547.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieger FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.
- Maurer P, Hohenadl C, Hohenester E, Göhring W, Timpl R, Engel J (1995) The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV. *J Mol Biol* 253:347-357.
- McRae PA, Rocco MM, Kelly G, Brumberg JC, Matthews RT (2007) Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 27:5405-5413.
- Mendis DB, Brown IR (1994) Expression of the gene encoding the extracellular matrix glycoprotein SPARC in the developing and adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 24:11-19.
- Mendis DB, Malaval L, Brown IR (1995) SPARC, an extracellular matrix glycoprotein containing the follistatin module, is expressed by astrocytes in synaptic enriched regions of the adult brain. *Brain Res* 676:69-79.
- Mendis DB, Ivy GO, Brown IR (1998) SPARC/osteonectin mRNA is induced in blood vessels following injury to the adult rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 23:1117-1123.
- Mennerick S, Matthews G (1996) Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. *Neuron* 17:1241-1249.
- Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol* 366:44-54.

- Meyer-Puttlitz B, Milev P, Junker E, Zimmer I, Margolis RU, Margolis RK (1995) Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: developmental changes of neurocan and phosphacan. *J Neurochem* 65:2327-2337.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK, Margolis RU (1998) Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 247:207-212.
- Millar AG, Bradacs H, Charlton MP, Atwood HL (2002) Inverse relationship between release probability and readily releasable vesicles in depressing and facilitating synapses. *Journal of Neuroscience* 22:9661-9667.
- Miller M, Peters A (1981) Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 203:555-573.
- Miner JH (2008) Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech* 71:349-356.
- Miner JH, Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:255-284.
- Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR (2008) Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* 13:122-135.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Südhof TC (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939-948.
- Miyata S, Nishimura Y, Hayashi N, Oohira A (2005) Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. *Neuroscience* 136:95-104.
- Mjaatvedt CH, Yamamura H, Capehart AA, Turner D, Markwald RR (1998) The *Cspg2* gene, disrupted in the *hdf* mutant, is required for right cardiac chamber and endocardial cushion formation. *Dev Biol* 202:56-66.
- Mochida S, Few AP, Scheuer T, Catterall WA (2008) Regulation of presynaptic Ca(V)2.1 channels by Ca²⁺ sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. *Neuron* 57:210-216.
- Mohrmann R, Lessmann V, Gottmann K (2003) Developmental maturation of synaptic vesicle cycling as a distinctive feature of central glutamatergic synapses. *Neuroscience* 117:7-18.
- Molnár Z, Brown RE (2010) Insights into the life and work of Sir Charles Sherrington. *Nat Rev Neurosci* 11:429-436.
- Montag-Sallaz M, Montag D (2003) Severe cognitive and motor coordination deficits in tenascin-R-deficient mice. *Genes Brain Behav* 2:20-31.
- Morawski M, Brückner G, Arendt T, Matthews RT (2012) Aggrecan: Beyond cartilage and into the brain. *Int J Biochem Cell Biol* 44:690-693.
- Morino-Wannier P, Fujita SC, Jones EG (1992) GABAergic neuronal populations in monkey primary auditory cortex defined by co-localized calcium binding proteins and surface antigens. *Exp Brain Res* 88:422-432.
- Morris NP, Henderson Z (2000) Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex. *Eur J Neurosci* 12:828-838.
- Motamed K, Sage EH (1998) SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 70:543-552.
- Motamed K, Blake DJ, Angello JC, Allen BL, Rapraeger AC, Hauschka SD, Sage EH (2003) Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: a role for protein kinase A. *J Cell Biochem* 90:408-423.

- Mott JD, Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16:558-564.
- Mozhayeva MG, Sara Y, Liu XR, Kavalali ET (2002) Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience* 22:654-665.
- Mulligan KA, van Brederode JF, Hendrickson AE (1989) The lectin *Vicia villosa* labels a distinct subset of GABAergic cells in macaque visual cortex. *Vis Neurosci* 2:63-72.
- Mumby SM, Raugi GJ, Bornstein P (1984) Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: selective binding to type V collagen. *J Cell Biol* 98:646-652.
- Murase S, Mosser E, Schuman EM (2002) Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* 35:91-105.
- Murphy-Ullrich JE (2001) The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *Journal of Clinical Investigation* 107:785-790.
- Murphy-Ullrich JE, Lane TF, Pallero MA, Sage EH (1995) SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the CA(2+)-binding EF-HAND. *Journal of Cellular Biochemistry* 57:341-350.
- Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20:33-43.
- Müller M, Goutman JD, Kochubey O, Schneggenburger R (2010) Interaction between facilitation and depression at a large CNS synapse reveals mechanisms of short-term plasticity. *J Neurosci* 30:2007-2016.
- Naeyele JR, Arimatsu Y, Schwartz P, Barnstable CJ (1988) Selective staining of a subset of GABAergic neurons in cat visual cortex by monoclonal antibody VC1.1. *J Neurosci* 8:79-89.
- Nakagawa F, Schulte BA, Spicer SS (1986) Selective cytochemical demonstration of glycoconjugate-containing terminal N-acetylgalactosamine on some brain neurons. *J Comp Neurol* 243:280-290.
- Nakagawa F, Schulte BA, Wu JY, Spicer SS (1987) Postnatal appearance of glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine on the surface of selected neurons in mouse brain. *Dev Neurosci* 9:53-60.
- Nakic M, Mitrovic N, Sperk G, Schachner M (1996) Kainic acid activates transient expression of tenascin-C in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* 44:355-362.
- Nakic M, Manahan-Vaughan D, Reymann KG, Schachner M (1998) Long-term potentiation in vivo increases rat hippocampal tenascin-C expression. *Journal of Neurobiology* 37:393-404.
- Nam CI, Chen L (2005) Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6137-6142.
- Nave KA, Trapp BD (2008) Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 31:535-561.
- Neff RA, Conroy WG, Schoellerman JD, Berg DK (2009) Synchronous and asynchronous transmitter release at nicotinic synapses are differentially regulated by postsynaptic PSD-95 proteins. *J Neurosci* 29:15770-15779.
- Neves G, Lagnado L (1999) The kinetics of exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish retinal bipolar cells. *J Physiol* 515 (Pt 1):181-202.
- Newpher TM, Ehlers MD (2008) Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron* 58:472-497.
- Newton AJ, Kirchhausen T, Murthy VN (2006) Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:17955-17960.
- Nicholson C, Sykova E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences* 21:207-215.

- Nie J, Chang B, Traktuev DO, Sun J, March K, Chan L, Sage EH, Pasqualini R, Arap W, Kolonin MG (2008) IFATS collection: Combinatorial peptides identify alpha5beta1 integrin as a receptor for the matricellular protein SPARC on adipose stromal cells. *Stem Cells* 26:2735-2745.
- Nieweg K, Schaller H, Pfrieder FW (2009) Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *Journal of Neurochemistry* 109:125-134.
- Niisato K, Fujikawa A, Komai S, Shintani T, Watanabe E, Sakaguchi G, Katsuura G, Manabe T, Noda M (2005) Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation and impairment of spatial learning through the Rho-associated kinase pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. *J Neurosci* 25:1081-1088.
- Nikolopoulos SN, Turner CE (2001) Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 276:23499-23505.
- Nischt R, Pottgiesser J, Krieg T, Mayer U, Aumailley M, Timpl R (1991) Recombinant expression and properties of the human calcium-binding extracellular matrix protein BM-40. *Eur J Biochem* 200:529-536.
- Nishimura W, Yao I, Iida J, Tanaka N, Hata Y (2002) Interaction of synaptic scaffolding molecule and Beta -catenin. *J Neurosci* 22:757-765.
- Norose K, Clark JI, Syed NA, Basu A, Heber-Katz E, Sage EH, Howe CC (1998) SPARC deficiency leads to early-onset cataractogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2674-2680.
- Novinec M, Kovacic L, Skrlj N, Turk V, Lenarcic B (2008) Recombinant human SMOCs produced by in vitro refolding: Calcium-binding properties and interactions with serum proteins. *Protein Expression and Purification* 62:75-82.
- Nägler K, Mauch DH, Pfrieder FW (2001) Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol* 533:665-679.
- Oblander SA, Brady-Kalnay SM (2010) Distinct PTPmu-associated signaling molecules differentially regulate neurite outgrowth on E-, N-, and R-cadherin. *Mol Cell Neurosci* 44:78-93.
- Oblander SA, Ensslen-Craig SE, Longo FM, Brady-Kalnay SM (2007) E-cadherin promotes retinal ganglion cell neurite outgrowth in a protein tyrosine phosphatase-mu-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 34:481-492.
- Oohira A, Matsui F, Watanabe E, Kushima Y, Maeda N (1994) Developmentally regulated expression of a brain specific species of chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, identified with a monoclonal antibody IG2 in the rat cerebrum. *Neuroscience* 60:145-157.
- Otsu Y, Shahrezaei V, Li B, Raymond LA, Delaney KR, Murphy TH (2004) Competition between phasic and asynchronous release for recovered synaptic vesicles at developing hippocampal autaptic synapses. *Journal of Neuroscience* 24:420-433.
- Palay SL, Palade GE (1955) The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol* 1:69-88.
- Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385:537-540.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SHR, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF, Jr., Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A (2012) Glial cells in (patho)physiology. *Journal of Neurochemistry* 121:4-27.
- Pechstein A, Shupliakov O (2010) Taking a back seat: synaptic vesicle clustering in presynaptic terminals. *Front Synaptic Neurosci* 2:143.

- Peng HB, Yang JF, Dai ZS, Lee CW, Hung HW, Feng ZH, Ko CP (2003) Differential effects of neurotrophins and Schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *Journal of Neuroscience* 23:5050-5060.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences* 32:421-431.
- Perez-Gonzalez AP, Albrecht D, Blasi J, Llobet A (2008) Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses. *J Physiol* 586:4675-4691.
- Pesheva P, Spiess E, Schachner M (1989) J1-160 and J1-180 are oligodendrocyte-secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. *J Cell Biol* 109:1765-1778.
- Petrini EM, Lu J, Cognet L, Lounis B, Ehlers MD, Choquet D (2009) Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. *Neuron* 63:92-105.
- Pfrieger FW (2003) Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta* 1610:271-280.
- Pfrieger FW, Barres BA (1996) New views on synapse-glia interactions. *Current Opinion in Neurobiology* 6:615-621.
- Pfrieger FW, Barres BA (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro*. *Science* 277:1684-1687.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298:1248-1251.
- Pluskota E, Stenina OI, Krukovets I, Szpak D, Topol EJ, Plow EF (2005) Mechanism and effect of thrombospondin-4 polymorphisms on neutrophil function. *Blood* 106:3970-3978.
- Purcell L, Gruia-Gray J, Scanga S, Ringuette M (1993) Developmental anomalies of *Xenopus* embryos following microinjection of SPARC antibodies. *J Exp Zool* 265:153-164.
- Pyka M, Busse C, Seidenbecher C, Gundelfinger ED, Faissner A (2011) Astrocytes are crucial for survival and maturation of embryonic hippocampal neurons in a neuron-glia cell-insert coculture assay. *Synapse* 65:41-53.
- Pyle JL, Kavalali ET, Piedras-Rentería ES, Tsien RW (2000) Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 28:221-231.
- Pérez González AP (2011) Unmasking the role of Schwann cells on Cholinergic Neurotransmission: an *in vitro* approach using autaptic synapses. In: Departament de Patologia y Terapèutica Experimental. Facultat de Medicina. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH (1992) The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1281-1285.
- Ramirez DMO, Kavalali ET (2011) Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 21:275-282.
- Rauch U (2004) Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* 61:2031-2045.
- Redmond L, Oh SR, Hicks C, Weinmaster G, Ghosh A (2000) Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nature Neuroscience* 3:30-40.
- Rees RP, Bunge MB, Bunge RP (1976) Morphological changes in the neuritic growth cone and target neuron during synaptic junction development in culture. *J Cell Biol* 68:240-263.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F (2005) The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* 53:430-442.
- Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ (2000) Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* 27:551-559.

- Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO, Betz WJ (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 39:529-541.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2004) The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* 303:2037-2039.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience* 6:57-69.
- Robbins EM, Krupp AJ, Perez de Arce K, Ghosh AK, Fogel AI, Boucard A, Südhof TC, Stein V, Biederer T (2010) SynCAM 1 adhesion dynamically regulates synapse number and impacts plasticity and learning. *Neuron* 68:894-906.
- Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatié E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R, Tartare-Deckert S (2006) SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66:7516-7523.
- Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML (2001) Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12485-12490.
- Roell S, Seul J, Paulsson M, Hartmann U (2006) Testican-1 is dispensable for mouse development. *Matrix Biology* 25:373-381.
- Rosenmund C, Stevens CF (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16:1197-1207.
- Ross BS, Conroy WG (2008) Capabilities of neurexins in the chick ciliary ganglion. *Dev Neurobiol* 68:409-419.
- Rozario T, DeSimone DW (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 341:126-140.
- Rubin E (1985a) Development of the rat superior cervical ganglion: initial stages of synapse formation. *J Neurosci* 5:697-704.
- Rubin E (1985b) Development of the rat superior cervical ganglion: ganglion cell maturation. *J Neurosci* 5:673-684.
- Rubin E (1985c) Development of the rat superior cervical ganglion: ingrowth of preganglionic axons. *J Neurosci* 5:685-696.
- Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M (1988) The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg* 69:155-170.
- Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T, Aizawa S (1992) Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6:1821-1831.
- Sage EH (2003) Purification of SPARC/osteonectin. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 10.*
- Sage EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem* 266:14831-14834.
- Sage H, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J (1989) SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* 109:341-356.
- Said N, Najwer I, Motamed K (2007) Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) inhibits integrin-mediated adhesion and growth factor-dependent survival signaling in ovarian cancer. *Am J Pathol* 170:1054-1063.
- Sakaba T, Neher E (2003) Involvement of actin polymerization in vesicle recruitment at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 23:837-846.
- Sakaba T, Schneggenburger R, Neher E (2002) Estimation of quantal parameters at the calyx of Held synapse. *Neuroscience Research* 44:343-356.
- Sanes JR (1989) Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci* 12:491-516.

- Sara Y, Virmani T, Deák F, Liu X, Kavalali ET (2005a) An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron* 45:563-573.
- Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Chubykin A, Mozhayeva MG, Südhof TC, Kavalali ET (2005b) Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J Neurosci* 25:260-270.
- Sasaki T, Miosge N, Timpl R (1999) Immunochemical and tissue analysis of protease generated neoepitopes of BM-40 (osteonectin, SPARC) which are correlated to a higher affinity binding to collagens. *Matrix Biol* 18:499-508.
- Sasaki T, Hohenester E, Gohring W, Timpl R (1998) Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *Embo Journal* 17:1625-1634.
- Sasaki T, Gohring W, Mann K, Maurer P, Hohenester E, Knauper V, Murphy G, Timpl R (1997) Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *Journal of Biological Chemistry* 272:9237-9243.
- Schaefer L, Schaefer RM (2010) Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 339:237-246.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Scherberich A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D, Chiquet-Ehrismann R (2004) Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J Cell Sci* 117:571-581.
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17:5858-5867.
- Schikorski T, Stevens CF (2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nature Neuroscience* 4:391-395.
- Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* 23:399-409.
- Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E (2002) Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends in Neurosciences* 25:206-212.
- Schnepp A, Lindgren PK, Hulsmann H, Kroger S, Paulsson M, Hartmann U (2005) Mouse testican-2 - Expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth. *Journal of Biological Chemistry* 280:11274-11280.
- Schoenwaelder SM, Burridge K (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11:274-286.
- Schweizer M, Streit WJ, Müller CM (1993) Postnatal development and localization of an N-acetylgalactosamine containing glycoconjugate associated with nonpyramidal neurons in cat visual cortex. *J Comp Neurol* 329:313-327.
- Seeger G, Brauer K, Härtig W, Brückner G (1994) Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience* 58:371-388.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.
- Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR (2005) Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol* 168:643-653.
- Shupliakov O, Bloom O, Gustafsson JS, Kjaerulff O, Low P, Tomilin N, Pieribone VA, Greengard P, Brodin L (2002) Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:14476-14481.

- Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE (2010) Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:397-419.
- Smit DJ, Gardiner BB, Sturm RA (2007) Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer* 121:2653-2660.
- Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1100-1105.
- Stagi M, Fogel AI, Biederer T (2010) SynCAM 1 participates in axo-dendritic contact assembly and shapes neuronal growth cones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7568-7573.
- Stan A, Pielarski KN, Brigadski T, Wittenmayer N, Fedorchenko O, Gohla A, Lessmann V, Dresbach T, Gottmann K (2010) Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11116-11121.
- Staniszewska I, Zaveri S, Del Valle L, Oliva I, Rothman VL, Croul SE, Roberts DD, Mosher DF, Tuszyński GP, Marcinkiewicz C (2007) Interaction of $\alpha 9\beta 1$ integrin with thrombospondin-1 promotes angiogenesis. *Circ Res* 100:1308-1316.
- Steindler DA, Cooper NG, Faissner A, Schachner M (1989) Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebral cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field. *Dev Biol* 131:243-260.
- Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155:459-470.
- Sugahara K, Mikami T (2007) Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr Opin Struct Biol* 17:536-545.
- Sullivan MM, Sage EH (2004) Hevin/SC1, a matricellular glycoprotein and potential tumor-suppressor of the SPARC/BM-40/Osteonectin family. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:991-996.
- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417:245-253.
- Sutor B, Luhmann HJ (1995) Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect Dev Neurobiol* 2:409-419.
- Suzuki S, Sano K, Tanihara H (1991) Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul* 2:261-270.
- Suzuki SC, Inoue T, Kimura Y, Tanaka T, Takeichi M (1997) Neuronal circuits are subdivided by differential expression of type-II classic cadherins in postnatal mouse brains. *Mol Cell Neurosci* 9:433-447.
- Sätzler K, Söhl LF, Bollmann JH, Borst JG, Frotscher M, Sakmann B, Lübke JH (2002) Three-dimensional reconstruction of a calyx of Held and its postsynaptic principal neuron in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci* 22:10567-10579.
- Südhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455:903-911.
- Südhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.
- Tai IT, Tang MJ (2008) SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat* 11:231-246.
- Takahashi-Iwanaga H, Murakami T, Abe K (1998) Three-dimensional microanatomy of perineuronal proteoglycan nets enveloping motor neurons in the rat spinal cord. *J Neurocytol* 27:817-827.
- Tan K, Duquette M, Liu JH, Zhang R, Joachimiak A, Wang JH, Lawler J (2006) The structures of the thrombospondin-1 N-terminal domain and its complex with a synthetic pentameric heparin. *Structure* 14:33-42.

- Tan K, Duquette M, Liu JH, Shanmugasundaram K, Joachimiak A, Gallagher JT, Rigby AC, Wang JH, Lawler J (2008) Heparin-induced cis- and trans-dimerization modes of the thrombospondin-1 N-terminal domain. *J Biol Chem* 283:3932-3941.
- Tang L, Hung CP, Schuman EM (1998) A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 20:1165-1175.
- Tani E, Ametani T (1971) Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in the cerebral cortex. *J Ultrastruct Res* 34:1-14.
- Teng H, Wilkinson RS (2000) Clathrin-mediated endocytosis near active zones in snake motor boutons. *J Neurosci* 20:7986-7993.
- Teng H, Cole JC, Roberts RL, Wilkinson RS (1999) Endocytic active zones: hot spots for endocytosis in vertebrate neuromuscular terminals. *J Neurosci* 19:4855-4866.
- Thomas LA, Akins MR, Biederer T (2008) Expression and adhesion profiles of SynCAM molecules indicate distinct neuronal functions. *J Comp Neurol* 510:47-67.
- Thomson AM (2000) Molecular frequency filters at central synapses. *Progress in Neurobiology* 62:159-196.
- Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M (2002) Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35:77-89.
- Triana-Baltzer GB, Liu Z, Gounko NV, Berg DK (2008) Multiple cell adhesion molecules shaping a complex nicotinic synapse on neurons. *Mol Cell Neurosci* 39:74-82.
- Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R (2009) The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 1793:888-892.
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* 135:767-779.
- Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004a) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47:209-216.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.
- Ullian EM, Harris BT, Wu A, Chan JR, Barres BA (2004b) Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol Cell Neurosci* 25:241-251.
- Ushkaryov YA, Südhof TC (1993) Neurexin III alpha: extensive alternative splicing generates membrane-bound and soluble forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6410-6414.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Südhof TC (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 257:50-56.
- Vannahme C, Smyth N, Miosge N, Gosling S, Frie C, Paulsson M, Maurer P, Hartmann U (2002) Characterization of SMOC-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes. *Journal of Biological Chemistry* 277:37977-37986.
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Südhof TC, Brose N (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51:741-754.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *Journal of Neuroscience* 19:6897-6906.
- Vincent AJ, Lau PW, Roskams AJ (2008) SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system. *Dev Dyn* 237:1449-1462.
- Vitureira N, Letellier M, White IJ, Goda Y (2012) Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and β -catenin. *Nat Neurosci* 15:81-89.
- Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE (2006) Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal* 18:1108-1116.
- von Gersdorff H, Vardi E, Matthews G, Sterling P (1996) Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16:1221-1227.

- vonGersdorff H, Vardi E, Matthews G, Sterling P (1996) Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16:1221-1227.
- Waites CL, Craig AM, Garner CC (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28:251-274.
- Waller LN, Fox N, Fox KF, Fox A, Price RL (2004) Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Methods* 58:23-30.
- Wang D, Fawcett J (2012) The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* 349:147-160.
- Watanabe H, Yamada Y (1999) Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. *Nat Genet* 21:225-229.
- Watanabe H, Kimata K, Line S, Strong D, Gao LY, Kozak CA, Yamada Y (1994) Mouse cartilage matrix deficiency (cmd) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene. *Nat Genet* 7:154-157.
- Watanabe K, Oohira A, Katoh-Semba R, Totsuka T, Yoshida K (1989) Sulfated proteoglycans synthesized by Neuro 2a neuroblastoma cells: comparison between cells with and without ganglioside-induced neurites. *Neurochem Res* 14:707-716.
- Weaver M, Workman G, Schultz CR, Lemke N, Rempel SA, Sage EH (2011) Proteolysis of the Matricellular Protein Hevin by Matrix Metalloproteinase-3 Produces a SPARC-Like Fragment (SLF) Associated With Neovasculature in a Murine Glioma Model. *Journal of Cellular Biochemistry* 112:3093-3102.
- Weaver MS, Workman G, Sage EH (2008) The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta 1 and activation of integrin-linked kinase. *Journal of Biological Chemistry* 283:22826-22837.
- Weaver MS, Workman G, Cardo-Vila M, Arap W, Pasqualini R, Sage EH (2010) Processing of the Matricellular Protein Hevin in Mouse Brain Is Dependent on ADAMTS4. *Journal of Biological Chemistry* 285:5868-5877.
- Weber P, Bartsch U, Rasband MN, Czaniera R, Lang Y, Bluethmann H, Margolis RU, Levinson SR, Shrager P, Montag D, Schachner M (1999) Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* 19:4245-4262.
- Wegner F, Härtig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, Brückner G (2003) Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 184:705-714.
- White ES, Muro AF (2011) Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life* 63:538-546.
- White ES, Baralle FE, Muro AF (2008) New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol* 216:1-14.
- Wienisch M, Klingauf J (2006) Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nat Neurosci* 9:1019-1027.
- Wilhelm BG, Groemer TW, Rizzoli SO (2010) The same synaptic vesicles drive active and spontaneous release. *Nat Neurosci* 13:1454-1456.
- Williams SR, Mitchell SJ (2008) Direct measurement of somatic voltage clamp errors in central neurons. *Nature Neuroscience* 11:790-798.
- Wise SG, Weiss AS (2009) Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol* 41:494-497.
- Wittenmayer N, Körber C, Liu H, Kremer T, Varoqueaux F, Chapman ER, Brose N, Künér T, Dresbach T (2009) Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13564-13569.

- Woodhoo A, Alonso MBD, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J, Guillemot F, Radtke F, Meijer D, Feltri ML, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR (2009) Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nature Neuroscience* 12:839-U846.
- Woolf CJ, Ma Q (2007) Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 55:353-364.
- Wu C, Dedhar S (2001) Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol* 155:505-510.
- Wu LG, Borst JG (1999) The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron* 23:821-832.
- Wölfel M, Schneggenburger R (2003) Presynaptic capacitance measurements and Ca²⁺ uncaging reveal submillisecond exocytosis kinetics and characterize the Ca²⁺ sensitivity of vesicle pool depletion at a fast CNS synapse. *J Neurosci* 23:7059-7068.
- Xu J, He L, Wu L-G (2007) Role of Ca²⁺ channels in short-term synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 17:352-359.
- Xu J, Xiao N, Xia J (2010) Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1. *Nat Neurosci* 13:22-24.
- Xu L, Overbeek PA, Reneker LW (2002) Systematic analysis of E-, N- and P-cadherin expression in mouse eye development. *Exp Eye Res* 74:753-760.
- Xu-Friedman MA, Regehr WG (2004) Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiological Reviews* 84:69-85.
- Yagi T, Takeichi M (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14:1169-1180.
- Yamagata M, Sanes JR (2005) Versican in the developing brain: lamina-specific expression in interneuronal subsets and role in presynaptic maturation. *J Neurosci* 25:8457-8467.
- Yamagata M, Herman JP, Sanes JR (1995) Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci* 15:4556-4571.
- Yamaji S, Suzuki A, Sugiyama Y, Koide Y, Yoshida M, Kanamori H, Mohri H, Ohno S, Ishigatsubo Y (2001) A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol* 153:1251-1264.
- Yan Q, Sage EH (1999) SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 47:1495-1506.
- Yan Q, Clark JI, Wight TN, Sage EH (2002) Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice. *J Cell Sci* 115:2747-2756.
- Yan Q, Blake D, Clark JI, Sage EH (2003) Expression of the matricellular protein SPARC in murine lens: SPARC is necessary for the structural integrity of the capsular basement membrane. *J Histochem Cytochem* 51:503-511.
- Yang T, Arslanova D, Gu Y, Augelli-Szafran C, Xia W (2008) Quantification of gamma-secretase modulation differentiates inhibitor compound selectivity between two substrates Notch and amyloid precursor protein. *Mol Brain* 1:15.
- Yang Y, Liu J, Mao H, Hu YA, Yan Y, Zhao C (2009) The expression pattern of Follistatin-like 1 in mouse central nervous system development. *Gene Expr Patterns* 9:532-540.
- Yu E, Kanno E, Choi S, Sugimori M, Moreira JE, Llinás RR, Fukuda M (2008) Role of Rab27 in synaptic transmission at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16003-16008.
- Yu WM, Chen ZL, North AJ, Strickland S (2009) Laminin is required for Schwann cell morphogenesis. *J Cell Sci* 122:929-936.
- Yuasa S (1996) Bergmann glial development in the mouse cerebellum as revealed by tenascin expression. *Anat Embryol (Berl)* 194:223-234.

- Yuasa S, Kawamura K, Kuwano R, Ono K (1996) Neuron-glia interrelations during migration of Purkinje cells in the mouse embryonic cerebellum. *Int J Dev Neurosci* 14:429-438.
- Zenisek D (2008) Vesicle association and exocytosis at ribbon and extraribbon sites in retinal bipolar cell presynaptic terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4922-4927.
- Zhang W, Benson DL (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci* 21:5169-5181.
- Zhang X, Jiang G, Cai Y, Monkley SJ, Critchley DR, Sheetz MP (2008) Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol* 10:1062-1068.
- Zhang Y, Barres BA (2010) Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology* 20:588-594.
- Zhang Y, Chen K, Tu Y, Wu C (2004) Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, alpha-parvins and beta-parvins, in regulation of cell morphology and survival. *J Biol Chem* 279:41695-41705.
- Zhou XH, Brakebusch C, Matthies H, Oohashi T, Hirsch E, Moser M, Krug M, Seidenbecher CI, Boeckers TM, Rauch U, Buettner R, Gundelfinger ED, Fässler R (2001) Neurocan is dispensable for brain development. *Mol Cell Biol* 21:5970-5978.
- Zhu Y, Stevens CF (2008) Probing synaptic vesicle fusion by altering mechanical properties of the neuronal surface membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18018-18022.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT (2008) Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 130:635-653.
- Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V (2012) Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro* 4:103-119.
- Zucker RS, Regehr WG (2002a) Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology* 64:355-405.
- Zucker RS, Regehr WG (2002b) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

ANEXO I:
PROTOCOLOS DETALLADOS

“Los días más felices son aquellos que nos hacen sabios”.

Gabriela Mistral

PREPARACIÓN DE COLÁGENO

La preparación de la solución de colágeno se realiza a partir de tendones de colas de ratas de la especie Sprague-Dawley, de la misma colonia de ratas empleadas para realizar los microcultivos.

Materiales y soluciones

- 5 litros agua mQ, temperados a 4° C.
- Matraz de Erlenmeyer de 250 mL.
- 3-4 barras de agitación.
- Vaso de precipitado de 5 litros.
- Vaso de precipitado de 600 mL.
- Probetas de 50, 100 y 1000 mL.
- Placas de Petri 10 cm de diámetro.
- Hemostatos.
- Membrana de diálisis, corte nominal de 12 KDa (Sigma-Aldrich, ref: D9527).

Los materiales y soluciones fueron esterilizados previamente.

- 1) Las colas se obtienen de ratas adultas (250 g) y se esterilizan por inmersión en etanol al 95% (v/v). Las colas de ratas se pueden usar frescas o se pueden congelar a -20° C para un uso posterior. Cuando las colas de ratas empleadas corresponden a colas congeladas, éstas se dejan al menos dos horas a temperatura ambiente antes de comenzar el protocolo.
- 2) Antes del protocolo de extracción de tendones, las colas se esterilizan nuevamente por inmersión en etanol al 95% (v/v).
- 3) Para la elaboración del colágeno, se emplean entre 6 y 8 colas de ratas. La extracción de los tendones de las colas de ratas se realiza como se explica a continuación:
 - a) Con un hemostato recto, se fija el extremo proximal de la cola. A continuación se coloca distalmente un segundo hemostato, a una distancia de 1,0-1,5 cm aproximadamente del primer hemostato. Una vez fijados los dos hemostatos, se fractura la cola mediante una torsión brusca y rápida; quedando el trozo de hueso proximal fracturado sujeto sólo por los tendones de la cola.
 - b) El hueso fracturado se retira lentamente y se cortan las porciones de tendones que quedan colgando, colocándolos en una placa de Petri estéril, que contiene agua mQ estéril.
 - c) El proceso se repite hasta remover completamente los tendones de la cola.

- 4) Los tendones se lavan, separando las fibras de los restos de colas que puedan tener, transfiriéndolas a otra placa de Petri con agua mQ, con la ayuda de unas pinzas de acero inoxidable. Este proceso se repite dos veces.
- 5) Después de tres lavados, las fibras se ponen en una placa de Petri seca, dejando la placa con un desnivel de unos 3 cm por unos 5-10 minutos, para escurrir el exceso de agua.
- 6) Se pesan 4,5 g de tendones (semi-húmedos) y se transfieren a 150 mL de una solución al 3% (v/v) de ácido acético glacial, temperada a 4° C, contenida en un matraz de Erlenmeyer. Los tendones se disuelven con una agitación lenta por 24-36 horas. A medida que el colágeno comienza a disolverse, la solución comienza a tornarse viscosa, deteniendo el movimiento de la barra de agitación; por lo que es importante comprobar la agitación en las primeras horas. Para prevenir la disolución de otras proteínas, es importante que la agitación no sea ni rápida ni prolongada en el tiempo.
- 7) Transcurridas las 24-36 horas, cuando la mayoría de los tendones se han disuelto, el medio se centrifuga a 13000 g, en una centrífuga Beckman modelo J2-HS (rotor JA 20) por 90 minutos.
- 8) La membrana de diálisis se hierve en una solución de EDTA 1 mM durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, la membrana se lava un mínimo de 5 veces, con agua mQ estéril.
- 9) Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se transfiere a la membrana de diálisis. Se descarta el precipitado y el sobrenadante contenido en la membrana de diálisis, se dializa frente a 4 litros de una solución de 0,1xX MEM, pH 4,0 sin carbonato (ver soluciones del anexo 1). La diálisis se realiza a 4° C durante 3 días, cambiando el medio cada 24 horas. La diálisis remueve el exceso de ácido, manteniendo un pH bajo para prevenir la gelificación del colágeno (el colágeno gelifica a pH alcalino).
- 10) Pasadas las 72 horas, el colágeno se recolecta, se le añade una solución de Penicilina/Estreptomina a una concentración final de 1% (v/v) y se fracciona en alícuotas de 5 mL.
- 11) Con este protocolo, normalmente se obtiene una solución final de colágeno muy concentrado. La utilización de una solución concentrada de colágeno puede derivar en soluciones muy viscosas y que gelifican muy rápido, por lo que es necesario determinar una dilución de trabajo adecuada. Como el colágeno tiende a gelificar en presencia de pH alcalino, aprovechamos esta propiedad para generar las gotas de colágenos al realizar los microcultivos. Las diluciones de colágeno se realizan con un medio RPMI 1640 10x, con un pH entre 7,5-8,5 (ver soluciones del anexo 1). Las diluciones fueron de 1 mL colágeno: 1 mL

RPMI (1:1); 1 mL colágeno: 0,5 mL RPMI (2:1); 1 mL colágeno: 0,25 mL RPMI (4:1) y 1 mL colágeno: 0,1 mL RPMI (10:1).

- 12) Para comprobar la dilución de trabajo correcta, a un atomizador se adicionan 2 mL de colágeno con el volumen de RPMI correspondientes para cada dilución, y se pulveriza sobre cubreobjetos previamente dispuestos en una placa de 12 pocillos, desde una distancia de entre 40 -50 cm; se espera aproximadamente 1 minuto y a cada pocillo se adiciona 1 mL de PBS previamente temperado a 37° C. Las gotas de colágeno resultantes se observan en un microscopio invertido con contraste de fase, a fin de determinar la dilución de trabajo con la cual se obtienen gotas de colágeno apropiadas. De no obtenerse gotas de colágeno con la calidad adecuada, se repite el paso anterior, ampliando el rango de diluciones entre las cuales se obtuvieron gotas de colágeno cercanas a la calidad requerida. Es importante no diluir demasiado el colágeno, porque la solución resultante no funciona adecuadamente.
- 13) Las alícuotas de colágeno se mantienen en nevera a 4° C. La solución de trabajo se va adecuando conforme a la calidad de las gotas obtenidas en los cultivos en función del tiempo transcurrido, utilizando cada vez una solución menos diluida de colágeno.
- 14) Finalmente, la solución de colágeno fresco se realiza cada 3-4 meses.

Solución MEM 10x, sin carbonato:

Se prepara en agua mQ, a partir del contenido de un frasco de “Minimum Essential Medium Eagle” en polvo (Sigma-Aldrich, ref: M0644-10X1L).

- El contenido de un frasco se disuelve en agua mQ estéril y se completa a 100 mL de volumen final.

Solución MEM 0,1x, sin carbonato:

Se prepara en agua mQ, a partir de la solución MEM 10x. Para un volumen final de 4 L:

- 40 mL de solución MEM 10x.
- Agua mQ necesaria para completar 4 L.

Solución de RPMI 10x:

Se prepara en agua mQ, a partir del contenido de un frasco de “RPMI-1640 medium” en polvo (ref: R1383-10X1L, Sigma-Aldrich).

- El contenido de un frasco se disuelve en agua mQ estéril y se completa a 100 mL de volumen final.
- Se realizan alícuotas de 1 mL y se almacenan a -20° C.

PROTOCOLO DE ELISA INDIRECTO

- 1) Se recogen 10 μ L de medio condicionado de cultivo celular (células de Schwann o COS-7, concentrado 10 veces) y se lleva a un volumen final de 100 μ L con PBS.
- 2) Se prepara una curva patrón de SPARC recombinante de ratón (R&D systems) de 10, 30, 60, 100, 200, 400, 600, 800 ng/mL.
- 3) En una placa para ELISA de 96 pocillos, de fondo plano (Corning®, Nueva York, EE.UU., ref: #3590.), a cada pocillo se adicionan 100 μ L de muestra o 100 μ L de las soluciones estándar que forman la curva. Se incuban de un día para el otro a 4° C.
- 4) Se lava con un sistema automático (Biochrom Asys Atlantis microplate washer, Biochrom, Cambridge, UK, ref: GO21101.) 4 veces con un tampón PBS con 0,05% Tween-20 (PBS-T). Tras el último lavado, se retira el exceso de líquido mediante aspiración.
- 5) Se adicionan 150 μ L de una solución de bloqueo para ELISA (ver soluciones del anexo 2), para bloquear las uniones inespecíficas. Se incuba por 1 hora a 37° C.
- 6) Se lava 4 veces con tampón PBS-T. Tras el último lavado, se retira el exceso de líquido mediante aspiración.
- 7) Se adiciona un anticuerpo primario policlonal de cabra contra SPARC (R&D Systems, Minneapolis, AF942) a una dilución 1:500 en solución de bloqueo. Se incuba por 1 hora a 37° C.
- 8) Se lava 4 veces con tampón PBS-T. Tras el último lavado, se retira el exceso de líquido mediante aspiración.
- 9) Se adicionan inmunoglobulinas anti IgG de cabras conjugadas con peroxidasa de rábano (HRP) (Dako, Dinamarca, P 0160) a una dilución 1:500 en solución de bloqueo. Se incuba por 1 hora a 37° C.
- 10) Se lava 4 veces con tampón PBS-T. Tras el último lavado, se retira el exceso de líquido mediante aspiración.
- 11) Se adicionan 100 μ L de una solución de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (SIGMAFAST™ OPD, Sigma Aldrich, ref: P9187) por pocillo y se deja incubando a oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 12) En un lector de microplacas, se mide la absorbancia a 450 nm de longitud de onda.
- 13) Para descartar las uniones inespecíficas, se utilizaron pocillos sometidos a todo el tratamiento pero sin el anticuerpo primario, por duplicado. El valor promedio se sustrajo de cada valor individual, correspondiente tanto a los valores de la curva patrón como a los de la muestra, obteniéndose así un valor de Absorbancia corregida.

14) El cálculo de concentración de proteína en las muestra se realiza a partir de la ecuación de la recta obtenida al graficar las distintas concentraciones de proteína recombinante respecto a los valores correspondientes de Absorbancia corregida.

Solución de bloqueo para ELISA

Se prepara en tampón PBS:

- 2% BSA Sigma

Solución de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (SIGMAFAST™ OPD)

Se preparó la solución de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial, para 20 mL finales de solución:

- Sacar un sobre de color plateado y un sobre de color dorado y dejar que alcancen la temperatura ambiente.
- Abrir un sobre plateado, el que contiene una tableta de OPD y adicionar a un recipiente que contenga 20 ml de agua mQ, proteger de la luz.
- Abrir un sobre dorado, el que contiene una tableta de urea en peróxido de hidrógeno y adicionar junto a la tableta anterior.
- Disolver por agitación, evitar el contacto con la luz.
- Emplear la solución dentro de la hora posterior a su preparación.

La solución final contiene 0,4 mg/mL de OPD, 0,4 mg/mL de urea en peróxido de hidrógeno y 0,05 M de tampón fosfato-citrato, pH 5,0

PROTOCOLO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

1. Recolección y Precipitación del medio de cultivo enriquecido en SPARC.

Células PYS-2 cultivadas en 20 – 30 placas de cultivos de 150 cm² con una confluencia de entre 50 – 75%, se lavan 3 veces con DMEM:F12 (1:1), sin suero (Gibco®, ref: 11320-033), temperado previamente a 37° C. Tras el último lavado, se reemplaza el medio por 12 – 13 mL de DMEM:F12 (1:1), sin suero (Gibco®, ref: 11320-033) y se preincuban durante 15–30 minutos en un incubador a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de preincubación se reemplaza por medio sin suero fresco y se incuban por 18 – 24 horas. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo se recoge y se traspasan a tubos de centrífuga de 50 mL y se centrifugan a 1000 g por 5 minutos a temperatura ambiente, para eliminar los restos celulares. Finalizada la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se ponen en un vaso de precipitado que ha sido previamente siliconizado con Sigmacote ® (Sigma-Aldrich, ref: SL2), según las indicaciones del fabricante. Se añade PMSF 0,2 M (ver soluciones) gota a gota bajo

agitación, hasta alcanzar una concentración final de 0,2 mM. Para 100 mL de medio, se añaden 0,1 mL PMSF 0,2 M. Se agita en hielo hasta que el medio alcance una temperatura de 4° C.

Tras el paso anterior, las proteínas del medio condicionado se precipitan con sulfato de amonio sólido ultrapuro, en una cantidad equivalente al 50% (p/v) respecto al volumen inicial de trabajo, durante un período de varias horas, el cual se añade en incrementos de 1-2 g por vez y se deja bajo agitación durante 12 – 24 hr a 4° C. El sulfato de amonio se añade en pequeñas cantidades, tanto para mantener un pH neutro como para lograr una precipitación eficiente de las proteínas. Además, se controla que no se forme espuma debido a una agitación rápida, ya que sería indicativo de que las proteínas se están desnaturalizando. Una vez precipitadas las proteínas, el medio se transfiere a tubos de centrifugación de 300 mL y se centrifugan a 18.000 g, en una centrífuga Beckman modelo J2-HS (rotor JA 20) por 90 minutos a 4° C. El sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende con 3–5 mL de tampón DEAE (ver soluciones). Congelar a -80° C, de ser necesario.

El aparato de HPLC empleado, está formado por: Detector uvicord SD modelo 2158, Controlador modelo 2152, bomba modelo 2150, recolector de fracciones *super rac* modelo 2211 y *chart* modelo rec 101, de la marca comercial LKB/Pharmacia.

2. Cromatografía de intercambio iónico.

Dado que SPARC es una proteína ácida, la cromatografía de intercambio iónico se realiza con una matriz de intercambio aniónico débil, empleando una columna con una matriz estacionaria de dietilaminoetanol (DEAE) -sefarosa.

Primero, el sistema de HPLC se carga con los tampones de corrida y de gradiente (ver soluciones a continuación). Posteriormente se instala y equilibra la columna DEAE (modelo Hiprep FF 16/10, GE healthcare) según las indicaciones del fabricante. Cuando el sistema está equilibrado, la muestra se centrifuga a 10.000 g por 10 minutos. Transcurrido este período de tiempo, la muestra se carga en la columna con un flujo de 0,75 mL/min, para no sobrepasar la presión máxima indicada para la columna. Se deja pasar un volumen equivalente a un o dos volúmenes de columna. La elución de las muestras se realiza mediante un gradiente continuo desde un 0% al 70% del tampón B:

<u>Tiempo</u>	<u>% B</u>
0 min	0
10 min	0
11 min	1%
20 min	17%
100 min	70%

Durante la corrida cromatográfica, las fracciones se colectan cada 3 – 5 minutos, en tubos de 10 mL de capacidad. Las fracciones obtenidas se analizan posteriormente por *Dot blot* y/o por *Western blot*, aquellas fracciones que contienen SPARC se traspasan a tubos concentradores centricon, de un corte nominal de 10 KDa, y se centrifugan a 3327 g (4000 rpm) por 15-20 minutos, tras lo cual se mantiene el medio concentrado, descartando el medio filtrado, y se adiciona tampón TBS-Calcio, centrifugándose nuevamente por 10–15 minutos. Este paso se repite 3-4 veces, para dializar la muestra y prepararla para la cromatografía de exclusión molecular. Al final de este proceso, se obtiene una fracción 10 veces concentrada.

3 Cromatografía de exclusión molecular.

Se retira la columna de DEAE del aparato de HPLC, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se lava el circuito con agua mQ y se carga con tampón TBS-Calcio. Una vez se ha estabilizado el valor de absorbancia en el detector, se cambia pone la columna de exclusión molecular. Las muestras inyectadas en esta columna, corresponden a las fracciones enriquecidas en SPARC. La cantidad de muestra inyectada no supera los 50 µL y se corre a 0,06 mL/minutos durante 100 minutos. Se colectan fracciones cada 3-5 minutos. Las fracciones se analizan mediante electroforesis de gel de poliacrilamida con tinción de plata y se estima la concentración de SPARC mediante la técnica de *Western Blot*.

Solución stock de PMSF 0,2 M

Disolver 3,48 g de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF del acrónimo del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) en 100 mL de isopropanol. Almacenar a 4° C ó a temperatura ambiente.

Tampón DEAE de corrida (tampón A)

Se prepara en agua mQ:

- 500 mL de solución stock de urea 8 M
- 50 mL de tampón Tris HCL 1 M, pH 7,4
- 1 mL de solución stock de PMSF 0,2 M
- 300 mL de agua mQ
- Ajustar el pH a 8,3 con NaOH 10 N y llevar a 1 L con agua mQ

Las concentraciones finales son 50 mM Tris HCl, pH 8,3, 0,2 mM PMSF y 4 M urea. El tampón se debe pasar por un filtro de 0,22 µm y desgasificar antes de usar.

Tampón DEAE de gradiente (tampón B)

Se prepara en agua mQ:

- 500 mL de solución stock de urea 8 M
- 50 mL de tampón Tris HCl 1 M, pH 7,4
- 1 mL de solución stock de PMSF 0,2 M
- 58,4 g de Cloruro de Sodio
- 300 mL de agua mQ
- Ajustar el pH a 8,3 con NaOH 10 N y llevar a 1 L con agua mQ

Las concentraciones finales son 50 mM Tris HCl, pH 8,3, 0,2 mM PMSF, 4 M urea y 1 M NaCl. El tampón se debe pasar por un filtro de 0,22 µm y desgasificar antes de usar.

Tampón TBS-Calcio

Se prepara en agua mQ:

- 100 mM Tris HCl, pH 7,4
- 140 mM NaCl
- 1 mM Calcio.

Almacenar a 4° C. El tampón se debe pasar por un filtro de 0,22 µm y desgasificar antes de usar.

PROTOCOLO GENERAL DE INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia se realiza sobre células crecidas en cubreobjetos de 15 mm de diámetro y fijadas en paraformaldehído al 4% en tampón PB 0,2M a pH 7,4 o en cortes histológicos de ganglio cervical superior, siguiendo el protocolo indicado a continuación. Las soluciones empleadas se indican al final del protocolo:

Los cubreobjetos con las células en cultivo, o los portaobjetos con los cortes histológicos del SCG, se lavan 3 veces con PBS, con una duración de 5 minutos cada lavado y se permeabilizan por 30 minutos con una solución al 0,3% de tritón X-100 en PBS. Las uniones inespecíficas se bloquean con una solución de bloqueo para inmunofluorescencia, incubándose durante 1-2 horas, tras lo cual se añaden los anticuerpos primarios señalados materiales y métodos, a las concentraciones indicadas, en solución de incubación para inmunofluorescencia durante toda la noche a 4° C.

Las muestras se lavan 3 veces con PBS y se incuban con anticuerpos secundarios específicos, conjugados con fluorocromos Alexa 488 o Alexa 555 (Molecular Probes), en tampón

de incubación, durante 1 hora a temperatura ambiente. Para dobles marcajes, se emplean anticuerpos primarios de distintas especies con sus respectivos anticuerpos secundarios. Las muestras se lavan 3 veces con PBS y los núcleos se marcan con To-Pro 3 (Invitrogen) a una dilución 1:500, o con una solución 400 nM DAPI durante 10 minutos. Por último, las muestras se lavan 3 veces con PBS y se montan con el medio de montaje “Fluoromount™” (Sigma-Aldrich, ref: F4680), dejándose secar por 3-4 horas en oscuridad. Las muestras montadas se guardan a 4° C hasta su posterior observación.

La inmunofluorescencia de cortes histológicos de ganglios de ratas de ambos sexos a P0, P2, P5, P10 y P15, se realizan en un sistema de montaje de portaobjetos en carros para realizar las incubaciones (Sequenza™ Slide Rack and Coverplate™ system), evitando así la desecación del tejido. Previo a la inmunofluorescencia, los portaobjetos con las secciones de tejido se descongelan a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se lavan 3 veces con PBS y se les añade una solución de SDS al 1% (p/v), por 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavan 3 veces con PBS. Tanto las soluciones de bloqueo como la solución de incubación fueron distintas:

Solución de bloqueo para inmunofluorescencia

Se prepara en tampón PBS:

- 0,2% Gelatina.
- 20% (v/v) suero de cabra (normal goat serum, NGS).
- 0,2% (v/v) Tritón X-100.

Solución de incubación para inmunofluorescencia

Se prepara en tampón PBS:

- 0,2% Gelatina.
- 1% (v/v) suero de cabra (normal goat serum, NGS).
- 0,2% (v/v) Tritón X-100.

Para la obtención de los cortes histológicos, las crías de rata P0 y P2 se anestesian en un baño de hielo, mientras que las crías de ratas P5, P10 y P15 se anestesian con una mezcla de clorhidrato de 2-(2-clorofenil)-2-metilaminociclohexona (ketamina, Ketolar®) 100 g/Kg de peso y de clorhidrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Xilacina, Rompun®) 10 mg/Kg de peso y perfundidas con una solución al 4% de paraformaldehído durante 30 minutos. La disección de los ganglios se realiza por el procedimiento descrito anteriormente. Los ganglios limpios se fijan en paraformaldehído al 4%, durante 24 horas a 4° C, tras lo cual se crioprotegen en una solución al 30% (p/v) de sacarosa en PBS durante 48 horas a 4° C. A continuación, los

ganglios se engloban en O.C.T, por su acrónimo del inglés *Optimal Cryostat Temperature* (Tissue-Tek®, Sakura), utilizando unos moldes. La muestra se congela, quedando lista para la obtención de secciones. Los cortes histológicos se realizan con un grosor de 10 µm, en un criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung) a -23° C, y se enganchan en un portaobjeto polilisinados, y se guardan a -20° C.

Para obtener los portaobjetos polilisinados, portaobjetos (Thermo Scientific, Alemania), se sumergen durante 5-10 minutos en la solución de Poli-L-lisina al 50% (v/v) a partir de una solución de Poli-L-lisina al 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich, ref: P8920) y se dejan secar por 60 minutos aproximadamente, en una estufa a 37° C.

Solución de bloqueo para cortes histológicos

Se prepara en tampón PBS:

- 20% (v/v) FBS (Invitrogen).
- 0,2% (v/v) Tritón X-100.

Solución de incubación para cortes histológicos

Se prepara en tampón PBS:

- 1% (v/v) FBS (Invitrogen).
- 0,2% (v/v) Tritón X-100.

PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DE GELES DE UNA DIMENSIÓN

Se prepara la fase separadora del gel, la que se hace al 8-12% (ver soluciones, S10) y se ponen 3 mL de esta solución en un soporte de vidrio para geles (BioRad). Luego de que la fase separadora polimeriza, se adiciona la solución de la fase concentradora (ver soluciones, S12), preparada al 4%, y se pone la peineta plástica (BioRad), con la cual se forman los carriles del gel.

Mientras se polimeriza la fase concentradora, a las muestras se les adicionan 5 µL de tampón de carga (ver soluciones, S6). Una vez formado el gel, las muestras se hierven por tres minutos a 100° C, tras lo cual cada muestra se carga en un carril del gel. La electroforesis se efectúa durante 45 minutos a 200 V (fuente de alimentación BioRad) en presencia de tampón de electrodos (ver soluciones, S13). Finalizada la electroforesis, el gel se traspasa a un recipiente adecuado para la tinción de Coomassie o para la tinción de plata.

PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DE GELES DE DOS DIMENSIONES

Las proteínas contenidas en 50 μ L de medio de cultivo sin suero (SF) o de medio condicionado concentrado (MC-Sc), se precipitan con 200 μ L de acetona a -20° C por 8 horas. El precipitado resultante se centrifuga a 20.000g por 15 minutos a 4° C, tras lo cual se descarta el sobrenadante. El precipitado resultante se deja secar por 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el precipitado se resuspende en 300 μ L de solución de rehidratación:

Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	4% (p/v)
Anfolitos	0,5% (v/v) (IPG buffer GE)
DTT*	10 mM
TBP*	2 mM
Azul de bromofenol*	2% (v/v)

*: Estos componentes se adicionan al tampón inmediatamente antes de su utilización.

Para cada muestra, se rehidrata una tira de gel de acrilamida de 18 cm (Immobiline™ DryStrip pH 3-10 NL, 18 cm, Amersham), la cual corresponde a la primera dimensión. La rehidratación se realiza durante toda la noche a temperatura ambiente y protegidas de la desecación, cubriéndolas con aceite mineral. Seguidamente, se realiza el isoelectroenfoque de las tiras a 20° C y a 50 μ A por tira con el sistema “*Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing*” (GE Healthcare), empleando un protocolo con ~ 62.000 v/h acumulados. Al finalizar el isoelectroenfoque, las tiras se tratan durante 10 minutos con 2 mL de tampón de equilibrio con DTT al 2% (ver soluciones, S16), seguido por una incubación con tampón de equilibrio con IAA al 2,5% (ver soluciones, S17) durante 10 minutos. Finalmente, se retira el tampón de IAA, dejando las tiras con 2 mL de tampón de transferencia.

Se preparan geles de 20x16 cm de acrilamida, con una fase de separación al 12% con una fase concentradora de aproximadamente 1 cm de alto (1,5 mL aprox.). En un extremo de la fase concentradora, se hace un carril para poner los marcadores de peso molecular Dual Color (BioRad, #161-0374), dejando siempre un volumen con gel concentrador. Una vez polimerizado el gel, las tiras isoelectroenfocadas se ponen sobre el gel, con el lado positivo de la tira junto al marcador de pesos moleculares. Los geles se corren a 30 V durante la noche o a 200 V por 4-5 horas. Las proteínas se visualizan mediante tinción de plata.

TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON SOLUCIÓN COOMASIE

Los geles se ponen en una solución teñidora Coomasie (ver soluciones, S7), en agitación durante 1-3 horas o toda la noche, hasta apreciar la presencia de bandas de proteínas. Una vez se han teñido las bandas de proteínas, se cambia la solución de Coomasie por la solución desteñidora turbo (ver soluciones, S8), para eliminar la tinción inespecífica de fondo. De ser necesario, se realizan dos o más cambios de solución desteñidora turbo.

TINCIÓN DE PROTEÍNAS POR TINCIÓN DE PLATA

El gel se trata con una solución fijadora (ver soluciones, S22) durante 30 minutos, tras lo cual se lava durante 10 minutos con agua mQ, por un total de 6 veces. Finalizado el lavado, el gel se incuba con una solución de 100 mL de agua mQ y 1 mL de solución 2% tiosulfato de sodio, por un minuto (ver soluciones, S21) y se lava 2 veces por 1 minuto cada vez, con agua mQ. En oscuridad, el gel se trata con 100 mL de una solución fresca de nitrato de plata (ver soluciones, S23), durante 30 minutos, y se lava por un minuto con agua mQ, para después revelar el gel con una solución de revelado (ver soluciones, S24) por aproximadamente 3,5 minutos o hasta que el gel esté de una coloración aceptable. El revelado se detiene mediante la adición de 3,5 mL de ácido acético glacial, mediante agitación por 10 minutos, se lava con agua mQ 4 veces por 30 minutos cada vez y se guarda en una solución de etanol al 20% (v/v).

PROTOCOLO DE WESTERN BLOT

Se realiza un gel de electroforesis de una dimensión de los medios condicionados a estudiar, el que se carga con las muestras y una curva patrón de SPARC de ratón recombinante (R&D systems, Minneapolis, EE.UU., ref: 942-SP), consistente en 5, 10, 15 y 20 ng de SPARC por carril. Una vez realizado el gel, éste se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA) con una solución de transferencia (ver soluciones, S19) por el método “sándwich” (Fig. 21), transfiriéndose las proteínas a 100 V durante 60 minutos a 4°C. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se traslada a una solución de bloqueo (ver soluciones, S25) y se deja agitando por 60 minutos, para eliminar las uniones inespecíficas. Transcurrido este tiempo, se

extrae el medio de bloqueo y se adicionan un anticuerpo primario policlonal de cabra contra SPARC (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU., ref: AF942) a una dilución 1:500 en la solución de bloqueo. Se incuba por toda la noche a 4°C. Tras el anticuerpo primario, se lava 3 veces con tampón TBS-T (ver soluciones, S28), 5 minutos cada lavado y se adiciona el anticuerpo secundario, correspondiente a inmunoglobulinas anti IgG de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Dako, Dinamarca, P 0160) a una dilución 1:500 en la solución de bloqueo. Se incuba por 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, la membrana se lava 5 veces con tampón TBS-T y se incuba con reactivos quimioluminescentes del ECL (*Enhanced Chemilluminescence*) (GE Healthcare) durante 1 minuto (ver soluciones, S29). La señal luminiscente se capta en el aparato “*Luminescent Image Analyzer LAS-3000*” (Fujifilm), mediante el programa “*ImageReader LAS-3000*” las imágenes se captan cada 10 segundos hasta un máximo de 120 segundos, en la configuración de sensibilidad estándar.

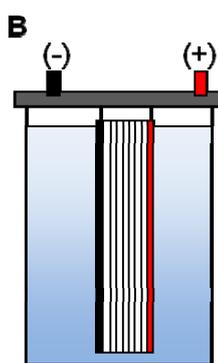
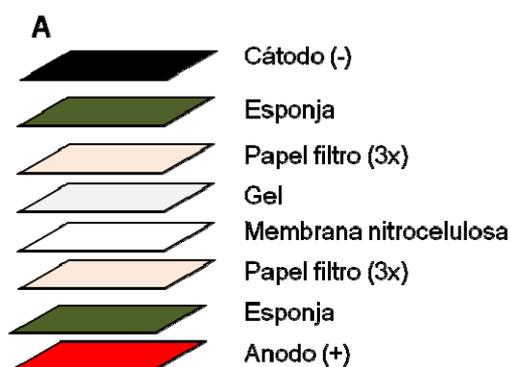


Figura 21. Esquema del método de transferencia “sándwich”. **A)** Representación esquemática de la disposición de los diferentes elementos que se utilizan en la transferencia. **B)** Representación esquemática de una cubeta de transferencia. El gel, la membrana de nitrocelulosa y los otros elementos, se encuentran sumergidos en tampón de transferencia. Esta cubeta se conecta a una fuente de alimentación.

PROTOCOLO DE *DOT BLOT*

La membrana de nitrocelulosa se humedece homogéneamente en tampón TBS. Se ensamblan las distintas partes del aparato de *Dot blot*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez montado y sellado, el aparato de *Dot blot* se conecta al vacío y se ajusta la válvula de flujo, para permitir la aplicación de vacío al aparato. Posteriormente la válvula se cambia a la posición 2, se adicionan 100 μ L de TBS a cada pocillo a utilizar y se conecta nuevamente el vacío al aparato, a fin de filtrar el tampón por los pocillos a emplear, tras lo cual se desconecta el vacío. Se diluyen 20 μ L de muestra en 180 μ L de TBS, cada muestra se adiciona a un pocillo y se conecta el aparato al vacío durante unos 20 minutos o hasta que la muestra se ha drenado completamente. Una vez drenadas las muestras, se desconecta el vacío, se ajusta la válvula para permitir el contacto con el aire y se retira la membrana de nitrocelulosa. Finalizado este proceso, se siguen los pasos indicados en el protocolo de *Western Blot*, luego de la transferencia.

ANEXO II:
ARTÍCULOS PUBLICADOS

*“Yo no hice nada por accidente, ni tampoco fueron así mis invenciones;
ellas vinieron por el trabajo”*

Thomas Alva Edison

Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses

Anna P. Perez-Gonzalez, David Albrecht, Juan Blasi and Artur Llobet

Laboratori de Neurobiologia – CIBERNED, IDIBELL – Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

Nicotinic synapses in the autonomous nervous system display use-dependent plasticity but the contribution of cellular environment, as well as the presynaptic mechanisms implicated in this process remain to be determined. To address these questions synaptic function was assayed in rat superior cervical ganglion (SCG) neurons microcultured in isolation from any other cell type and compared to those microcultured in the presence of Schwann cells of ganglionic origin. Schwann cells were not required for synapse formation *in vitro* because functional cholinergic autaptic synapses were established in both experimental conditions. The number of synapses was comparable between the two culture conditions but the frequency of spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents was enhanced in those neurons grown in direct contact with glial cells. Autapses displayed facilitation and depression, both processes being determined by the fraction of vesicles from the readily releasable pool discharged by an action potential. At high release probabilities vesicles were more efficiently mobilized, thus promoting depression, whilst low release probabilities made facilitation likely to occur. Schwann cells did not modify significantly facilitation but increased synaptic depression. In single cell microcultures, paired pulse stimuli showed a monoexponential recovery from depression with a time constant of ~60 ms, while in microcultures developed together with glial cells, recovery was bi-exponential with a significantly slower time course. Altogether these results show that Schwann cells from sympathetic ganglia directly modulate use-dependent plasticity of nicotinic synapses *in vitro* by enhancing short-term depression.

(Received 18 July 2008; accepted after revision 7 August 2008; first published online 14 August 2008)

Corresponding author A. Llobet: Laboratori de Neurobiologia – CIBERNED, IDIBELL – Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Email: allobet@ub.edu

A key process for information processing in neurons is homosynaptic short-term plasticity, which takes place when repeated firing of a presynaptic neuron induces a change in synaptic efficacy (Dittman & Regehr, 1998; Millar *et al.* 2002; Zucker & Regehr, 2002). Increasing evidence indicates that glial cells are active modulators of use-dependent plasticity. For example, in the neuromuscular junction perisynaptic Schwann cells are key to determining the degree of high frequency induced depression (Robitaille, 1998), and in hippocampal synapses synaptic suppression is mediated by astrocytes (Zhang *et al.* 2003). In addition, glial cells are required for multiple neuronal functions, ranging from development and establishment of synapses (Christopherson *et al.* 2005) to buffering of neurotransmitters (Mennerick & Zorumski, 1994), protons (Deitmer & Rose, 1996) or potassium (Kofuji & Newman, 2004).

One of the key elements that determine glial actions on neuronal function is their tight location to neuronal processes, as for example Schwann cells at the neuromuscular junction or Bergmann glia at the cerebellum. However, such structural organization is the result of a developmental process, which cannot be modified without compromising synaptic function. In order to overcome this limitation, the aim of the present study was to set up an *in vitro* approach where neuronal development was essentially determined by the composition of the culture medium, thus compensating the direct trophic actions of the cellular environment. Ideally, under such experimental conditions, glial cells should also be able to establish interactions with neurons *in vitro* similar to those present *in vivo*. Hence, this type of approach would make it possible to separate the participation of neuron–glia interactions on synaptic plasticity from their developmental role.

Neuronal microcultures provide a simple scenario to study synaptic function, because a given neuron is both

This paper has online supplemental material.

presynaptic and postsynaptic since it is forming a network of autaptic contacts (Furshpan *et al.* 1986b; Bekkers & Stevens, 1991). Autapses resemble their synaptic counterparts and display multiple plasticity features (Goda & Stevens, 1998; Schluter *et al.* 2006), so microcultures offer an accessible, direct approach for identifying the molecular mechanisms underlying short-term plasticity (Murthy *et al.* 1997). Glial secreted products, however, are essential to establish successful microcultures from central neurons, because it has been demonstrated that in their absence there are a very low number of functional synapses formed (Nagler *et al.* 2001). In contrast, some neurons from the peripheral nervous system show less complex trophic requirements. Sympathetic neurons are an example, because their survival and development are essentially dependent on nerve growth factor (NGF) both *in vivo* and *in vitro*. For this reason, in the present study we microcultured sympathetic neurons from the superior cervical ganglion (SCG), modifying procedures already described (Furshpan *et al.* 1986b).

By using the experimental conditions hereby explained, short-term plasticity displayed by synapses where only the pre- and postsynaptic elements were present was compared to those where Schwann cells of sympathetic origin coexisted throughout the microculture procedure. The results obtained showed that this particular type of glial cell had a specific effect both on the frequency of spontaneous miniature postsynaptic currents (mEPSCs) and on short-term depression, thus reinforcing the idea that short-term plasticity is tightly coupled to the cellular environment.

Methods

Animals

Albino Sprague–Dawley rats (P0–P2) were used for preparation of superior cervical ganglia. Animals were chilled in ice. Once surgery was finished, pups were killed by decapitation. The procedure was approved by the ethical committee of Generalitat de Catalunya (DMA no. 3326).

Establishment of single cell microcultures from rat superior cervical ganglion neurons

To prepare microcultures, sterilized coverslips (15 mm diameter) were placed in a 12-well plastic dish and covered with a thin agarose layer (0.15%). The agarose was left to dry for at least 1 h under UV light. Collagen was prepared from rat tails and stored at 4°C in an acidic medium for no longer than 5 months. Microdots were fabricated using a perfume atomizer immediately before plating the neurons. The pH of collagen was adjusted to a moderate basic value

(7.5–8) when sprayed and viscosity was assayed for the different stocks before use.

The essential procedure for isolation and culture of SCG neurons was performed using protocols described elsewhere (Mains & Patterson, 1973; Furshpan *et al.* 1986b). Neurons were dissociated from the superior cervical ganglia of newborn albino Sprague–Dawley rats (P0–P2). At least 20 ganglia were used in each culture. Ganglia were enzymatically treated at 37°C, first with 2.5 mg ml⁻¹ collagenase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 10 min, followed by 0.05% trypsin–EDTA solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 20 min. Trypsin was removed and ganglia were placed in a high serum medium based on Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)–F12 (1 : 1) + 20% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) to ensure inactivation of the remaining enzyme. Complete disaggregation was achieved mechanically using sterilized glass pipettes. Dissociated neurons were then placed in a 10 cm culture dish and kept for ~90 min in the incubator. This preplate period allowed non-neuronal cells to attach to the culture dish and removed > 90% of them in the final microcultures. To increase the number of microcultures established in the presence of Schwann cells, the duration of the preplate period was reduced to ~30 min. At the end of preplate, medium was centrifuged for 2 min at 2000 g. The pellet was then resuspended in 1 ml of high serum medium. The cell suspension was then forcibly ejected 3 times through a hypodermic needle (25 gauge, 0.5 × 16 mm) to break up possible clusters of neurons. Neurons were plated on freshly sprayed collagen dots at a low density (2000–3000 cells ml⁻¹) in plating medium. The composition of the plating medium was DMEM–F12 (1 : 1) containing 2.5% FBS, 2.5% rat serum (prepared in the animal care facility of the University of Barcelona), and 500 nM NGF (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel). To achieve a cholinergic phenotype, 2 nM ciliary neurotrophic factor (CNTF; Alomone Laboratories) was added to plating medium 2 or 3 days after culture preparation (Saadat *et al.* 1989). Culture medium was changed two or three times a week by removing half of the well volume.

Current-clamp and voltage-clamp recordings

All experiments were performed in the whole-cell configuration using neurons microcultured for 10–15 days *in vitro*. Typical pipette resistances were 2–4 MΩ when filled with internal solution. Composition of the internal solution was (in mM): 130 potassium gluconate, 4 MgCl₂, 0.02 BAPTA, 10 Hepes, 3 Na₂ATP, 1 NaGTP, pH 7.2, 290 mosmol kg⁻¹. External solution contained (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 10 Hepes-hemisodium salt and 10 glucose, pH 7.4. The final CaCl₂ concentration was achieved by dilution from a 1 M stock solution (Sigma-Aldrich). All salts were from Sigma-Aldrich.

Before the addition of glucose and CaCl_2 , the osmolality of the external solution was 290 mosmol kg^{-1} . For current clamp recordings potassium gluconate was replaced by KCl. Hexamethonium (Sigma-Aldrich) was prepared at 100 μM in extracellular solution. The recombinant light chain of tetanus toxin was prepared and stored at -80°C . Aliquots containing the catalytic domain of the toxin were only thawed once.

Current-clamp recordings were performed using an Axoclamp 2A amplifier (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Voltage clamp experiments were carried out using an Axoptach-200B (Molecular Devices). Amplifiers were driven by an ITC-18 board (Instrutech, Great Neck NY, USA) using WCP software (Dr John Dempster, University of Strathclyde, http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page.php?page=software_ses). Neurons were clamped at -60 mV and stimulated by a 1–2 ms depolarization step that drove membrane potential to 0 mV. Autaptic currents were identified as inward currents that appeared immediately after the sodium current associated with the generation of an action potential (Bekkers & Stevens, 1991). Analysis was performed with custom made macros written in Igor Pro software 6.0 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). All experiments were performed at room temperature (22 – 24°C).

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Blocking was performed for 2 h with 20% normal goat serum in a 0.2% Triton solution. All primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature at the following dilutions: monoclonal VAMP-2 (Synaptic Systems, Göttingen, Germany) 1:1000; polyclonal synaptophysin (Synaptic Systems) 1:500; monoclonal S-100B (Abcam, Cambridge, UK) 1:1000; monoclonal fibronectin (Abcam) 1:100; polyclonal PSD-93 (or chapsyn-110, Chemicon) 1:1000; and monoclonal VAcT (NeuroMab, Davis, CA, USA) 1:500. Secondary antibodies labelled with Alexa dyes (Invitrogen) were used at 1:500 dilution and incubated at room temperature for 2 h. Synapse quantification was performed using Image J software from images obtained of neurons co-stained with VAMP-2 and PSD-93. An axo-somatic synapse was considered when there was a co-staining of the two markers in round structures 0.5–1 μm in diameter, located in the periphery of the soma, which spanned two to three confocal sections (~ 0.4 μm each). The proportion of non-neuronal cells stained for S-100B and fibronectin was calculated after staining nuclei with propidium iodide or to-pro-3 (Invitrogen).

Results

Microcultures of superior cervical ganglion neurons established functional cholinergic autapses

In the absence of glial cells or their secreted factors a single SCG neuron was able to successfully develop axon-like and dendrite-like processes circumscribed to a microdot of collagen, which we termed a single cell microculture (Fig. 1A). Growth of the dendritic tree was obvious during the first week in culture and during the second and third week numerous branches and ramifications became more common, similar to what has already been described (Furshpan *et al.* 1986b). The appearance of neurons developed together with non-neuronal cells was very similar to single-cell microcultures (Fig. 1B). The absence of supporting cells did not affect the formation of synapses because the presence of potential autapses along the dendritic network was demonstrated by the positive staining for VAMP-2 (Fig. 1C) and synaptophysin (Fig. 1D) in single cell microcultures (see also Fig. 2 for synapse quantification). In the SCG *in vivo*, preganglionic fibres tend to establish more axo-dendritic rather than axo-somatic synapses (Forehand, 1985). Similarly, single cell microcultures displayed a larger number of axo-dendritic autapses along their dendritic-like tree compared to the soma (Fig. 1C and D).

The works of Furshpan and coworkers demonstrated that SCG neurons are able to change their phenotype from adrenergic to cholinergic in defined culture conditions. Several factors can induce such change, for example, presence of a feeder layer of myocardiocytes, rat serum or growth factors (Furshpan *et al.* 1986b). In the present experimental conditions a cholinergic phenotype was induced by CNTF (Saadat *et al.* 1989). The location of putative cholinergic terminals was demonstrated by staining for the vesicular transporter of acetylcholine (Fig. 1E). Similarly to VAMP-2 and synaptophysin staining, the periphery of the collagen microdot showed a more marked presence of cholinergic terminals if compared to the somatic region. However, the contribution of these peripheral autapses was probably not reflected in electrophysiological recordings due to space-clamp limitations. Only those synapses located in the soma or nearby dendritic tree were likely to provide information (Fig. 1F).

The average resting membrane potential of SCG neurons grown in single cell microcultures was -51 mV ($n = 7$). After 0.6–1 nA current injections, neurons fired action potentials at frequencies ranging from 0.1 to 20 Hz. The nature of synaptic transmission was studied in experiments such as those depicted in Fig. 1G. Functional cholinergic autapses were revealed by twice challenging neurotransmission: first by hexamethonium, a specific blocker of ganglionic nicotinic receptors, and

second by removing calcium from the extracellular medium. Both manoeuvres suppressed autaptic EPSPs reversibly, thus demonstrating the presence of nicotinic autapses. Although SCG neurons in microculture may synthesize other neurotransmitters than acetylcholine (Furshpan *et al.* 1986a), a complete block of neurotransmission by hexamethonium was always achieved ($n = 4$). Cholinergic synapses were therefore predominant under our experimental conditions.

What was the nature of non-neuronal cells present in the microcultures? In the superior cervical ganglion, Schwann cells are the most abundant non-neuronal cell type and display a slow growth in culture compared to fibroblasts originating from the perineurium (Freschi, 1982). The SCG also contains satellite cells and small intensely fluorescent (SIF) cells (Baluk, 1995). Although all these cell types could be potentially present in

a microculture, the morphology under the phase contrast microscope after 10 days *in vitro* supported a predominant Schwann cell population. This observation was confirmed by the fact that positive staining for the calcium binding protein S-100B was found in 97% of the non-neuronal cells present in the microcultures (1741 cells evaluated). Typically, all non-neuronal cells observed in a microculture expressed S-100B but this marker was absent from neurons (Fig. 2A). Previous immunohistochemical studies revealed the S-100B marker stains Schwann cells and satellite cells of the superior cervical ganglion (Cocchia & Michetti, 1981) and in addition, transgenic mice expressing fluorescent proteins under the control of the human S-100B promoter show a few Schwann cells enveloping a single postsynaptic neuron (McCann & Lichtman, 2008). On these bases the term 'Schwann cell' used in the present study refers

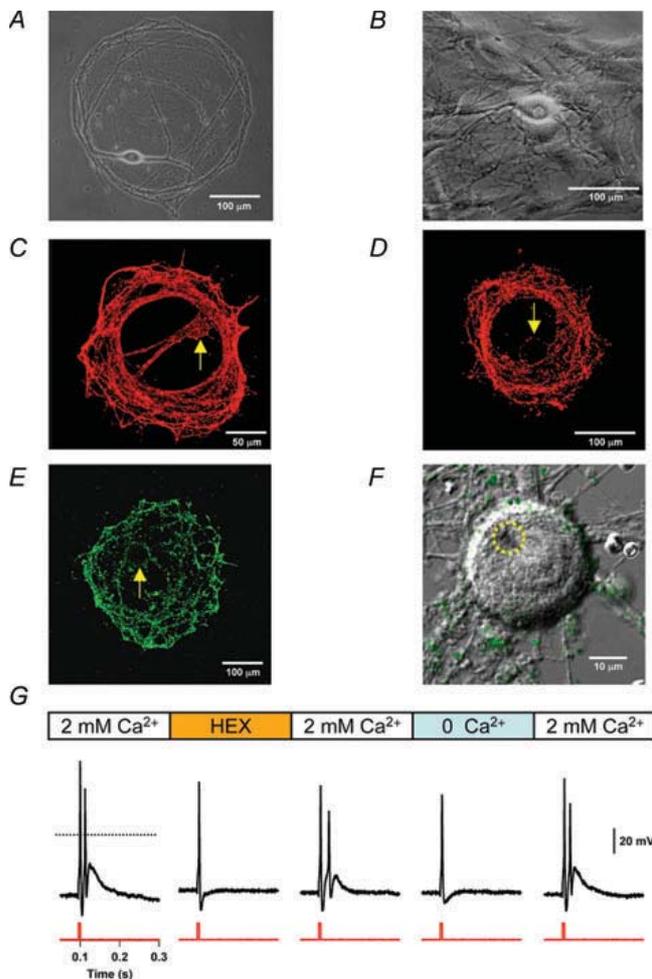


Figure 1. Single cell microcultures of superior cervical ganglion neurons

A, phase contrast image of a single cell microculture of a superior cervical ganglion neuron after 15 days *in vitro*. B, phase contrast image of a superior cervical ganglion neuron developed together with non-neuronal cells in a microculture, 12 days *in vitro*. C–E, single cell microcultures stained for VAMP-2, synaptophysin and vesicular acetylcholine transporter (vAChT), respectively. Arrows indicate the location of the soma. F, overlay of DIC and fluorescence images of the neuron shown in E. The neuron was patched and subsequently fixed and stained for vAChT. The circle with the dotted line indicates the location where the patch pipette was placed. G, representative current clamp experiment showing that autaptic responses were sensitive to hexamethonium (HEX) application and extracellular calcium removal. Note that both manoeuvres were reversible.

to S-100B immunoreactive glial cells, thus considering satellite cells as a type of Schwann cell (Mathey & Armati, 2007). Some glial cells tended to cluster around somas (Fig. 2A, arrows), whilst there were others associated with neuritic processes, further suggesting the presence of a heterogeneous Schwann cell population. The contribution of fibroblasts to the non-neuronal cell population was negligible, as revealed by fibronectin staining (Rohrer & Sommer, 1983). Only a few fibroblast clusters, which did not form part of the microcultures, were observed at the edges of coverslips (data not shown). Thus, microcultures containing non-neuronal cells were reproducing *in vitro* the interactions between Schwann cells and superior cervical ganglion neurons.

In order to evaluate the influence of glial cells on synaptogenesis, microcultures were co-stained with the postsynaptic and presynaptic markers, PSD-93 and VAMP-2, respectively (see Methods for details). As shown in Fig. 2B, axo-somatic synapses were rare after a few days in culture but showed a marked increase when neurons reached 10–15 days *in vitro*. Development of SCG neurons in culture is associated with an increase of their somatic surface (Johnson *et al.* 1980; see also Fig. 2A). Immediately after plating, neuron size was $\sim 10 \mu\text{m}$, and after 2 weeks in culture neurons of single cell microcultures increased their surface diameter to $24 \pm 2 \mu\text{m}$ (mean \pm S.E.M., $n = 16$). Neurons developed in the presence of Schwann cells showed a similar growth to a size of $26 \pm 2 \mu\text{m}$ (mean \pm S.E.M., $n = 16$). On these bases, the density of axo-somatic contacts was comparable in single cells and microcultures developed in a glial environment (Fig. 2C). Altogether, these results showed that Schwann cells neither promoted an increase of somatic surface nor enhanced the number of axo-somatic synapses. Axo-dendritic synapses were not evaluated because: (i) the complexity of the dendritic-like tree was very variable among microcultures, (ii) axo-dendritic synapses tended to form clusters, and (iii) most of the axo-dendritic synapses did not contribute to electrophysiological responses due to space clamp limitations.

To evoke synaptic transmission, the soma of a single microcultured SCG neuron was depolarized during 2 ms from a holding voltage of -60 mV to 0 mV . In 2 mM extracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) autaptic responses ranging from 0.4 to 4 nA were observed immediately after the sodium current peaked (Fig. 2D). The nature of evoked EPSCs was nicotinic because addition of $100 \mu\text{M}$ hexamethonium at the end of the experiment always abolished them ($n = 6$, data not shown). In agreement with synaptic immunostainings, autaptic currents were never observed in microcultures developed for less than 10 days *in vitro*. In those cultures the sodium current was not followed by an autaptic response (Fig. 2D), showing a lack of mature cholinergic synapses.

Spontaneous miniature EPSCs in microcultures established in the presence and absence of Schwann cells

Changing extracellular calcium concentration is a well established method to modify the release probability of synaptic terminals (Dodge & Rahamimoff, 1967). However, this manoeuvre could also have an effect at the postsynaptic level because SCG neurons express nicotinic receptors highly permeable to calcium (Trouslard *et al.* 1993). To investigate this possibility, the effect of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ on spontaneous miniature EPSCs (mEPSCs) was analysed by exposing neurons to 1 mM , 2 mM and 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Fig. 3).

The size of mEPSCs was variable, showing amplitudes ranging from 20 to 140 pA (Fig. 3A and B). Both, the intrinsic variability of postsynaptic responses and cable filtering properties of dendrite-like processes were likely to contribute to this wide distribution (Bekkers & Stevens, 1996). On average, the amplitude of mEPSCs was little affected by raising $[\text{Ca}^{2+}]_o$ from 1 mM to 4 mM , but their duration was increased at the higher $[\text{Ca}^{2+}]_o$ tested. The decay phase of mEPSCs was well fitted by a single exponential whose time constant rose gradually from 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ to 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Fig. 3C). As a result, mEPSCs obtained in high $[\text{Ca}^{2+}]_o$ carried more charges into the cell (Fig. 3D). Calculation of mEPSCs integrals was therefore influenced by $[\text{Ca}^{2+}]_o$, whilst measurement of their amplitudes was relatively insensitive (Fig. 3E).

To investigate whether the presence of Schwann cells in the microculture could modify neurotransmission in autaptic synapses we first analysed mEPSCs. In this type of microcultures, and as described for single-cell ones, the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increased the decay phase of mEPSCs (Fig. 4A and B). As a result, mEPSCs found at high $[\text{Ca}^{2+}]_o$ carried more charges into the cell (Fig. 4C), thus reflecting the high permeability of nicotinic receptors to Ca^{2+} . In terms of amplitude, no differences existed between mEPSCs obtained in single cell microcultures and in cultures developed in the presence of Schwann cells (Fig. 4D). The analysis of mEPSCs obtained in 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ showed that their temporal profile was not modified by the presence of glial cells. The rise time from 20% to 80% was 1.5 ms ($n = 102$) and 1.3 ms ($n = 101$) for single cell and glial microcultures, respectively. In addition, there was no obvious correlation between mEPSC amplitudes and their decay time constant in both culture conditions (Fig. 4E). Altogether, Fig. 4A–E shows that the individual characteristics of mEPSCs did not change in the presence of Schwann cells, but they appeared at a frequency almost an order of magnitude higher when neurons developed in the glial environment (Fig. 4F; compare to Fig. 3A). Schwann cells increased synaptic activity from ~ 0.2 to $\sim 1.5 \text{ mEPSCs s}^{-1}$. Such

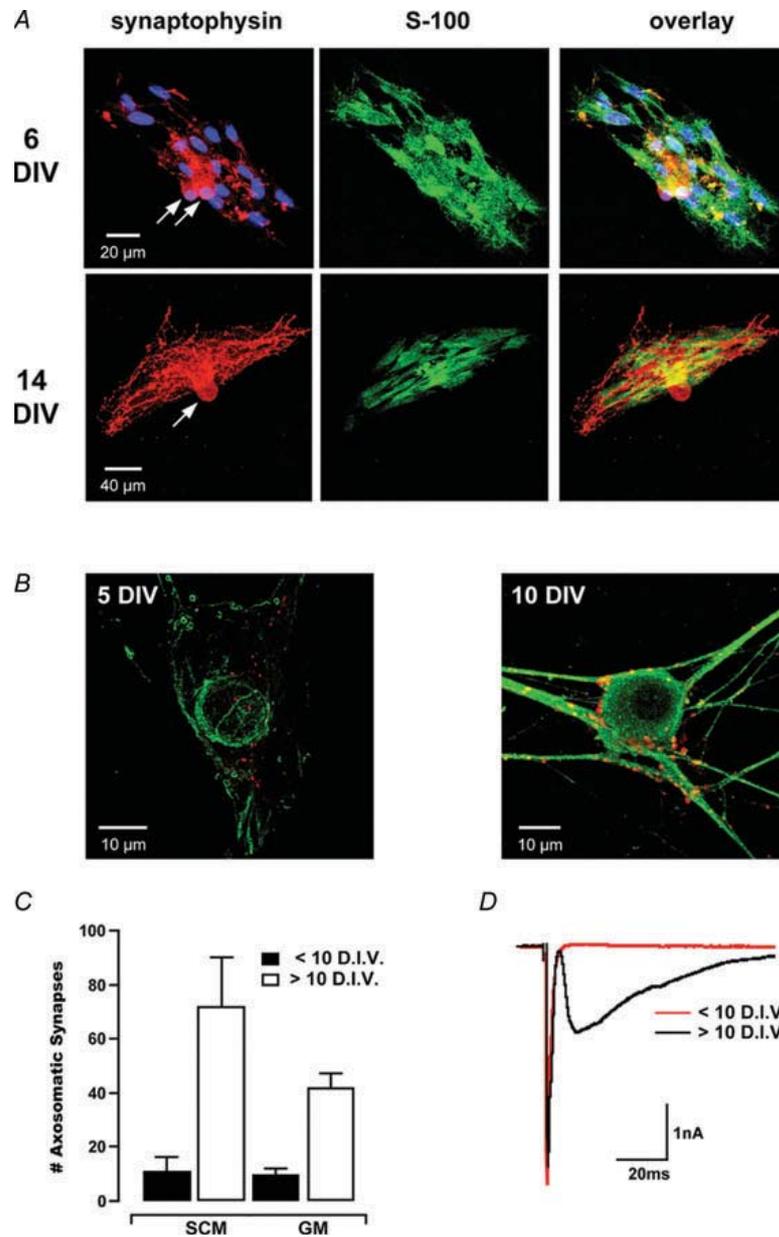
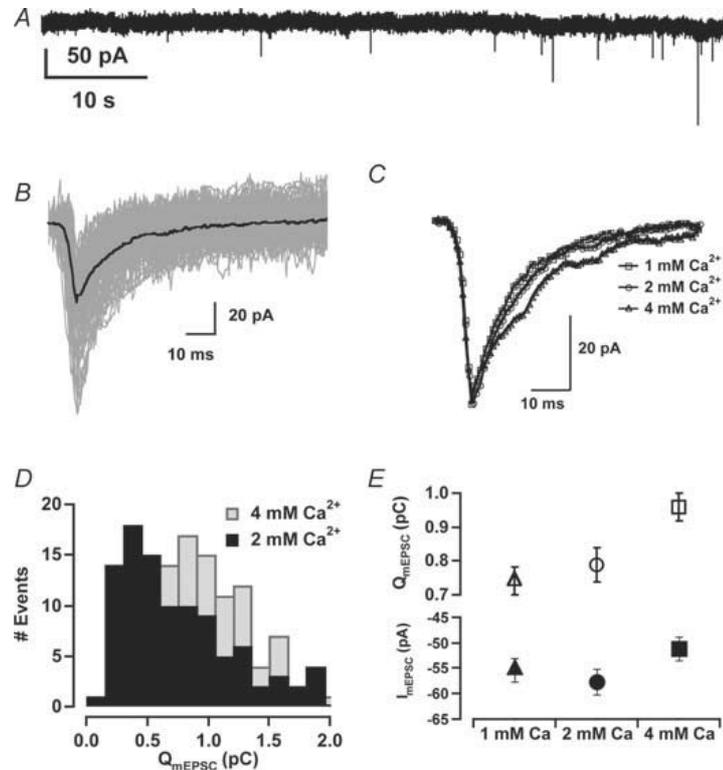


Figure 2. Effect of glial cells on synaptogenesis

A, images of two different microcultures co-stained for the presynaptic and glial cell markers synaptophysin and S-100B. The entire non-neuronal cell population was labelled with S-100B, a protein typically expressed in Schwann cells but not present in neurons. Arrows indicate the location of the somas. The upper microculture contained two neurons. Nuclei were labelled with to-pro-3, which are shown in blue. Note the increased soma size and the more complex neuritic tree in the older microculture. *B*, synaptogenesis was visualized by co-staining for the presynaptic and postsynaptic markers VAMP-2 (red) and PSD-93 (green), respectively. In single cell microcultures, synapses (yellow spots) were rare at 5 days *in vitro* (DIV) but covered the soma and dendritic-like process when the culture period extended further than 10 DIV. Only axo-somatic synapses were quantified (see Methods). *C*, summary of synaptogenesis observed in single cell and microcultures developed in the presence of glial cells, indicated as SCM

Figure 3. Properties of spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents in single cell microcultures

A, spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) observed in a single cell microculture. Extracellular solution contained 1 mM Ca^{2+} . B, traces from 56 mEPSCs coming from 2 different neurons bathed in 2 mM Ca^{2+} . The average mEPSC for this set of recordings is shown in black. C, average mEPSCs for 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ($n = 50$, 4 cells), 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ($n = 102$, 5 cells) and 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ($n = 106$, 3 cells). Single exponential fits showed that mEPSCs prolonged their duration when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increased. Time constants were 11 ms, 13 ms and 18 ms for 1 mM, 2 mM and 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$, respectively. D, distribution of charges carried by mEPSCs in 2 mM and 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$. E, average values of amplitude and charge carried by mEPSCs as a function of $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Note that the amplitude of mEPSCs showed little variation when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ changed in the range of 1 mM to 4 mM. Error bars indicate S.E.M.



enhancement of spontaneous neurotransmission was not associated with a larger number of active synapses because Schwann cells did not promote synaptogenesis of axo-somatic synapses (Fig. 2C). Hence, Schwann cells had a direct effect on the spontaneous activity of nicotinic autapses, but what was their effect on evoked neurotransmission?

Neurotransmission in cholinergic autapses studied at low frequencies of stimulation

Long periods of recording allowed the diffusion of the intracellular solution from the patch pipette to neuritic processes. This phenomenon was seen by the addition of 0.2 mM tetramethyl-rhodamine labelled 3 kDa dextran to the internal solution. Staining of processes was obvious after 28 min of dialysis. Maximum dye accumulation was at dendrites located in the proximity of the soma

but labelling of $\sim 1 \mu\text{m}$ diameter axon-like processes was also observed (see Supplementary Fig. 1). To test whether the presence of dye along the axon was reflecting a washout of synaptic proteins, rundown for autaptic responses was tested in recordings lasting more than 30 min ($n = 6$). In this set of neurons series resistance was maintained around initial levels for more than 50 min. Although the amplitude of EPSCs was decreased by 25% at the end of the recording period, little rundown was observed in the charge carried by autaptic responses (Fig. 5). This observation confirmed that Schwann cells were not required for the robustness of the experimental preparation.

Long lasting recordings offered the possibility to investigate the effect of recombinant proteins able to interfere with presynaptic function. When the recombinant light chain of tetanus toxin was diluted to $2 \mu\text{M}$ in the internal patch solution, it blocked

and GM, respectively. The presence of Schwann cells did not modify the number of axo-somatic synapses after 10 DIV. D, the black trace shows an evoked autaptic response by application of a 2 ms depolarization via a patch pipette placed at the soma. An initial inward current corresponding to the sodium current associated with the generation of an action potential was followed by a nicotinic EPSC. The red trace shows a typical response of a microculture lacking mature synapses, because only the sodium current is observed.

neurotransmission. Success, however, was only achieved in small microdots and it developed after ~ 25 min of recording (Fig. 5). The molecular weight of the light chain of tetanus neurotoxin is 50 kDa, more than 10 times larger than the fluorescently labelled dextran used to evidence neuritic processes. This difference probably caused a slower diffusion through long, tortuous axon-like processes. Obtaining a successful delivery of recombinant proteins to presynaptic terminals therefore required the use of small microdots, usually not bigger than $\sim 100 \mu\text{m}$ diameter.

Long lasting recordings where responses were evoked at stimulation frequencies ranging from 0.1 to 1 Hz did not show obvious plasticity features. On average, the amplitude of EPSCs showed little variation during the initial 20–25 min of recording. During this period, R_s showed little change, since it increased from an average value of $14 \text{ M}\Omega$ to $17 \text{ M}\Omega$ ($n = 28$). However, only a few neurons were recorded after this time window, because significant increases of the initial series resistance developed.

Synaptic plasticity of single cell microcultures evoked by high frequency stimulation

Experiments *in vivo* have shown that preganglionic fibres innervating the SCG ganglion fire at a maximal frequency of 10–40 Hz (Birks & Isacoff, 1988; Huang & Cohen, 2000). Trains of stimuli delivered at frequencies up to 20 Hz evoked action potentials without showing failures in SCG single cell microcultures (data not shown), and a frequency of 14 Hz was chosen to test for use-dependent plasticity mechanisms. Depression was consistently evoked when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ was above 1 mM but was absent below this concentration (Fig. 6A). The amplitude of autaptic responses in 0.5 mM and 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ was $715 \pm 34 \text{ pA}$ ($n = 5$) and $1872 \pm 119 \text{ pA}$ ($n = 12$), respectively, meaning that the release probability at which the synapse was operating was key to determining the presence of synaptic depression during high frequency stimulation.

In 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ depression reached a steady state value after four to six depolarizations delivered at 14 Hz

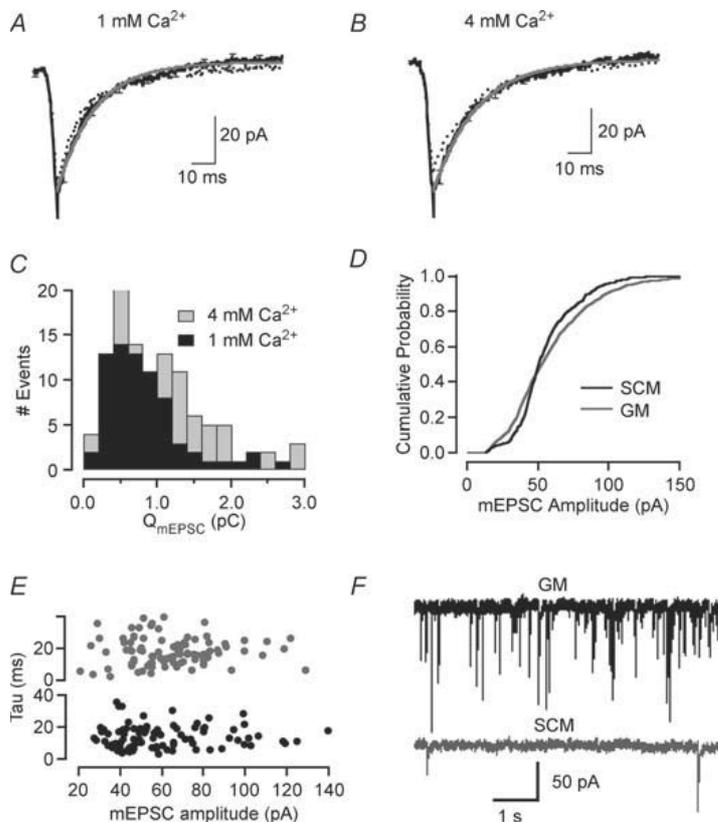


Figure 4. Properties of spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents in microcultures established in the presence of Schwann cells

A, average mEPSC obtained in 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ($n = 67$, 3 cells, black trace). Grey line indicates an exponential fit to the decay phase; $\tau = 14$ ms. Dotted line indicates the average mEPSC from single cell microcultures in 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$. **B**, average mEPSC obtained in 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ($n = 89$, 5 cells, black trace). Grey line indicates an exponential fit to the decay phase; $\tau = 20$ ms. Dotted line indicates the average mEPSC from single cell microcultures in 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$. **C**, distribution of charges carried by mEPSCs in 1 mM and 4 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$. **D**, cumulative probability plot of mEPSC amplitudes observed in single cell microcultures (SCM, 19 min recorded from 10 neurons, $n = 495$) and microcultures developed in the presence of glia (GM, 41 min recorded from 5 neurons, $n = 2789$). **E**, plot of mEPSC decay time constants against their amplitude for SCM (black) and GM (grey). **F**, recordings of spontaneous activity in SCM and GM. Note the enhanced mEPSC frequency in GM.

(Fig. 6A). By using cumulative plots of EPSC amplitudes it was possible to fit a line to the steady-state phase of synaptic depression and extrapolate it to time 0 (Fig. 6B). Assuming the refilling of the readily releasable pool of vesicles (RRP) took place uniformly throughout stimulation, the intercept on the Y-axis reported an estimate of the RRP size (see Supplementary Fig. 2 for details of the procedure). This type of calculation has been previously performed at the calyx of Held synapse (Schneggenburger *et al.* 1999), hippocampal synapses in microculture (Otsu *et al.* 2004) and neuromuscular junctions (Millar *et al.* 2002). The main constraint on performing this calculation was that it could only be applied if synaptic depression developed. Therefore, it was not a valid approach to establish the size of the RRP in conditions of low release probability, for example at 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ (Fig. 6A and B).

The RRP is heterogeneous among synapses and its definition greatly depends on the method used (Murthy *et al.* 1997). For example, the measurement of the RRP size by using a train of action potentials in hippocampal synapses reported different estimations from another well-established method, the application of a hypertonic sucrose solution (Rosenmund & Stevens, 1996; Moulder & Mennerick, 2005). We defined the RRP size using plots of cumulative EPSC amplitudes, so that it only took into consideration the contribution of vesicles released synchronously with stimulation. The participation of some vesicles from the RRP in asynchronous release has been recently revealed (Stevens & Williams, 2007). Their contribution can be taken into account by analysing EPSC charges instead of currents. This approach, however, was not performed. Nicotinic receptors displayed a high permeability to calcium, and changes in $[Ca^{2+}]_o$ affected both the probability of release and the amount of charge carried by EPSCs (Figs 3 and 4). In contrast, the amplitude of mEPSCs was constant under variable $[Ca^{2+}]_o$. Hence, this parameter provided a measurement of the presynaptic effects of changes in $[Ca^{2+}]_o$, with little postsynaptic contribution.

Typically, in 4 mM $[Ca^{2+}]_o$, the RRP was exhausted at the fourth action potential of the train, while in 1 mM $[Ca^{2+}]_o$, at least six stimuli were required (Fig. 6C and D). Steady state depression was always achieved faster under high release probability conditions. In terms of the fraction of the RRP released by the first action potential of the train, a rise from 1 mM to 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ at most doubled the amount of vesicles mobilized (Fig. 6E). When $[Ca^{2+}]_o$ was 1 mM, the arrival of an action potential released approximately a third of the RRP but in 4 mM $[Ca^{2+}]_o$, almost two-thirds were released. This change in the kinetics of depression, however, did not affect the total number of vesicles mobilized from the RRP. The average of seven different neurons successively trialled with 1 mM, 2 mM and 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ showed that the estimates for the RRP size were independent of release probability at which

synapses were operating (Fig. 6E). Remarkably, the size of the RRP was not modified in the presence of Schwann cells (Fig. 7A).

Determinants of paired pulse plasticity in cholinergic autapses

Paired pulse stimuli are a simple approach to probe synaptic plasticity. Paired pulse facilitation (PPF) is defined by a paired pulse ratio (PPR) larger than 1, whilst paired pulse depression (PPD) is defined by a PPR < 1. The red and blue traces in the example of Fig. 6C show that a change from PPF in 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ to PPD in 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ took place if the two initial stimuli of the trains of action potentials were considered. As shown in Fig. 6E, in 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ the first action potential of a train of stimuli released a variable range of vesicles, from 25% to 55% of the whole RRP, whilst in 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ this range rose from 40% to 70%. The trains of action potentials were therefore used to define the relationship between the PPR for a 70 ms interval and the fraction of the RRP released by the first action potential of the train (R_f) in single cell microcultures. An experimentally determined power function described the relationship:

$$PPR = 0.4/R_f^{0.94}$$

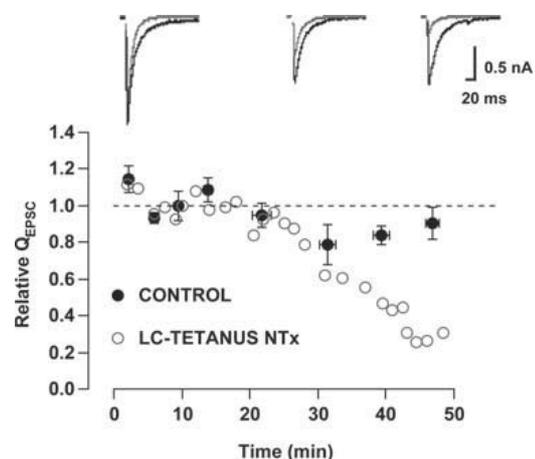


Figure 5. Recordings of synaptic responses at low frequencies of stimulation

Long-lasting recordings of autaptic activity. Traces show EPSCs obtained at the indicated times in a single neuron dialysed with standard internal solution (black). Sodium currents were cancelled for illustration purposes. EPSC charges displayed little rundown relative to the initial 10 min of recording ($n = 6$). When pipette solution contained 2 μ M light chain of tetanus neurotoxin there was an obvious decay of the response after ~30 min of recording (red). Error bars indicate S.E.M.

In general terms, it could be considered that R_f was inversely related to PPR (Fig. 7B, open symbols). The relationship between PPR and R_f in microcultures developed in the presence of Schwann cells also followed

well the above function (Fig. 7B, dots). The analysis of trains of stimuli also allowed the study of whether (i) there was a relation between PPR and the RRP size and (ii) PPR was affected by postsynaptic mechanisms.

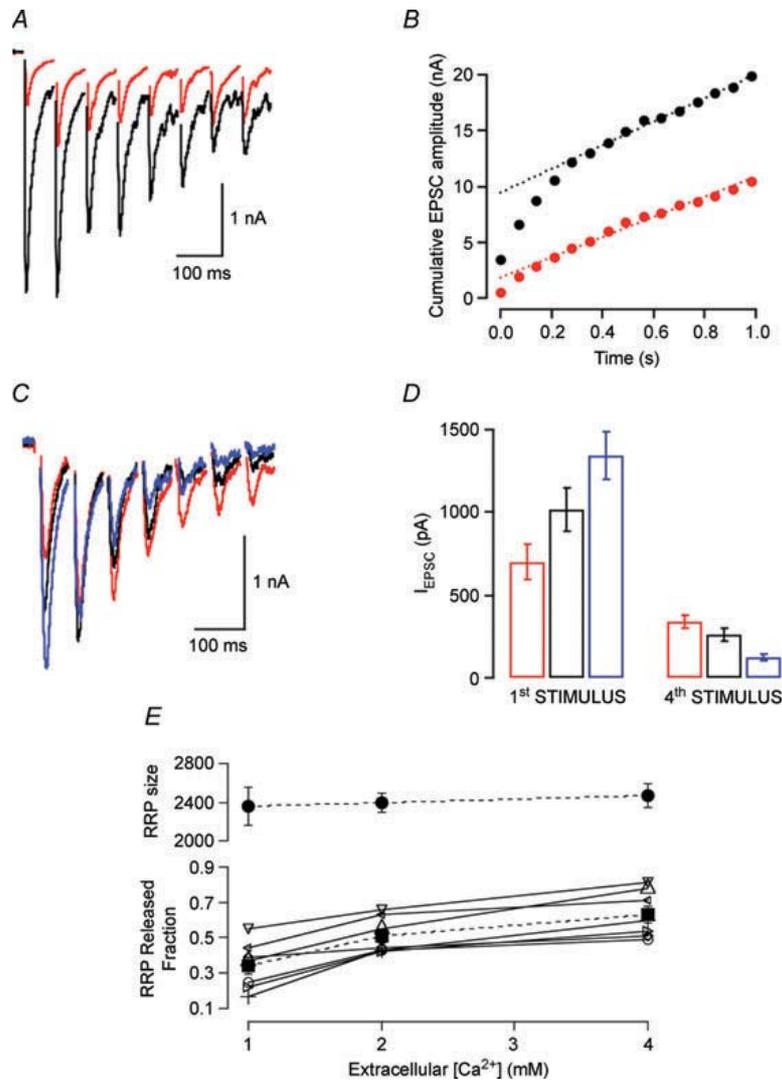


Figure 6. High frequency stimulation evoked short-term depression

A, EPSCs evoked by a train of stimuli delivered at 14 Hz in 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ (red) and 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ (black) in a single cell. Depression was obvious in 2 mM $[Ca^{2+}]_o$. B, cumulative plots of EPSC amplitudes obtained from the traces shown in A. A linear function was fitted to the steady-state phase of depression (dotted line). The Y-axis intercept provided an estimate of the readily releasable pool (RRP) size (see text). C, EPSCs evoked by a train of stimuli in a cell successively exposed to 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ (red), 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ (black) and 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ (blue). Note the differences in amplitude of the first response of the train in the three experimental conditions tested. D, average EPSC amplitude for the first and fourth stimulus of the train in 7 cells exposed to three different $[Ca^{2+}]_o$: 1 mM (red), 2 mM (black) and 4 mM (blue). E, the upper left axis plots the size of the RRP estimated with the method described in B as a function of $[Ca^{2+}]_o$, and the lower left axis shows the fraction of the RRP released by the first action potential of the train, both as a function of $[Ca^{2+}]_o$. Open symbols indicate individual values and filled squares indicate means \pm s.e.m. Data come from 7 cells sequentially exposed to 1 mM, 2 mM and 4 mM $[Ca^{2+}]_o$.

A direct relation between PPR and the average RRP size was not found in single cell microcultures, this meaning that the number of vesicles available for release was unrelated to short-term plasticity phenomena (Fig. 7C). Microcultures developed in the presence of Schwann cells also did not show an obvious relationship (Fig. 7D).

Saturation of postsynaptic receptors can induce a process of short-term depression (Zucker & Regehr, 2002). Hence, there was the possibility that the size of postsynaptic responses was related to the type of plasticity displayed, i.e. the larger EPSCs were associated with a more marked depression. As depicted in Fig. 7E, there was not an

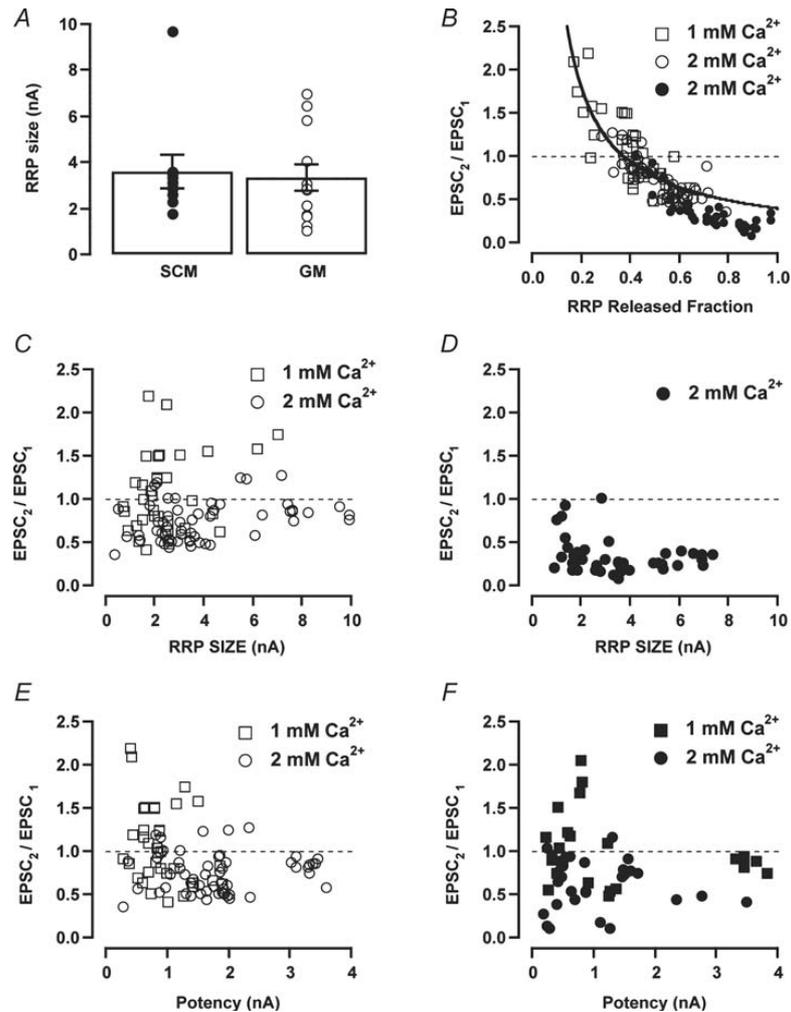


Figure 7. Relationship of paired pulse ratio with presynaptic and postsynaptic parameters

A, summary of the readily releasable pool (RRP) sizes obtained in single cell microcultures (SCM) and microcultures developed in the presence of glial cells (GM). B–F, the two initial stimuli of a train of depolarizations were used to calculate the paired pulse ratio (PPR) for a 70 ms interval. The results obtained were plotted against parameters related to presynaptic or postsynaptic function. Graphs illustrate results obtained in single cell microcultures (open symbols) and in microcultures developed in the presence of Schwann cells (filled symbols). B, plot of PPR against the fraction of vesicles released from the readily releasable pool (RRP) by the first action potential of the train. The size of the RRP was calculated following the method described in Fig. 6B. Points obtained for SCM were well fitted by a power function (straight line, see text). C and D, plot of the paired pulse ratio against the size of the readily releasable pool in SCM and GM. E and F, plot of PPR against the amplitude of the first EPSC of the train (synaptic potency) in SCM and GM. The size of postsynaptic currents was unrelated to PPR in both types of microcultures tested.

obvious relation between PPR and synaptic potency, measured as the amplitude of the first EPSC of the train. Thus, the observed changes in PPR in single cell microcultures were essentially of presynaptic origin. A similar result was obtained in microcultures developed in the presence of Schwann cells (Fig. 7F).

Effect of Schwann cells on the short-term plasticity displayed by cholinergic autapses

Schwann cells did not modify the RRP size (Fig. 7A), but instead altered PPR in conditions of high release probability. Comparison between Fig. 7C and D illustrates this observation. PPR was decreased in glial microcultures but the RRP size was unaffected. To further investigate this aspect, paired pulse stimuli were applied in successive trials in single cell microcultures (Fig. 8A) and compared to neurons microcultured in the presence of glial cells (Fig. 8B). As expected (Figs 6 and 7), PPD was consistently evoked when $[Ca^{2+}]_o$ was above 2 mM and pulse intervals were shorter than 0.5 s (Fig. 8C). However, neuronal development together with Schwann cells significantly affected depression. In this condition, PPD was longer lasting and was still present at a 1 s interval (Fig. 8D). When the $[Ca^{2+}]_o$ of the bathing medium was lowered to 0.5 mM, neurons changed PPD to PPF. Facilitation was obvious for pulse intervals up to 100 ms and was comparable between the two types of microcultures (Fig. 8E and F). The time course of PPF was exponential and showed a time constant of ~ 0.5 s in both cases (Fig. 8G and H). The temporal profile of PPD was also exponential but about 10 times faster than PPF. This observation, however, was valid only in single cell microcultures because Schwann cells prolonged the process of depression. In this condition the time course of PPD was comparable to PPF (Fig. 8H).

Paired pulse depression was evoked in single cell microcultures when $[Ca^{2+}]_o$ was both 2 mM (Fig. 9A) and 4 mM (Fig. 9B). In this type of culture the time course of PPD followed time constants of 41 ms and 83 ms in 2 mM and 4 mM $[Ca^{2+}]_o$, respectively (Fig. 9A and B, right). On average, the presence of Schwann cells significantly slowed down recovery from depression. In this condition, the process became bi-exponential (Fig. 9A and B, grey traces). In 2 mM $[Ca^{2+}]_o$, PPD took place with fast and slow time constants of 14 ms and 2 s, respectively, while in 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ this process was even slower, providing time constants of 0.4 s and 31 s. Therefore, Schwann cells were modulating the degree of short-term depression. In addition to the fact that short-term plasticity phenomena are considered essentially presynaptic processes (Zucker & Regehr, 2002), three pieces of experimental evidence favoured a specific effect of Schwann cells at the presynaptic level: (i) synaptic potency was not significantly affected by the presence of glial cells (Fig. 9A and B, left,

see also Fig. 10), (ii) PPR was unrelated to the amplitude of the first EPSC (Fig. 7E and F), and (iii) mEPSCs, which reflect basic properties of postsynaptic nicotinic receptors, did not change their characteristics in the presence of glial cells. As a result, it was concluded that Schwann cells were enhancing the short-term depression displayed by cholinergic autapses by acting at the presynaptic level.

Decrease of $[Ca^{2+}]_o$ below 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ shifted the tendency of paired pulse stimuli to evoke depression. For example, for a 100 ms interval, in 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ all cells tested evoked PPD, in 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ the proportion was reduced to 90% of the neurons and in 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ only 5 out of 10 single cell microcultures displayed depression (Figs 9 and 10, left). Nevertheless, the net effect in 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ was PPF (Fig. 10A), this meaning that the degree of facilitation was larger than depression in this condition. When neurons were bathed in 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$, only facilitation was evoked (Fig. 10B). PPF followed an exponential time course and was longer lasting in 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ ($\tau = 0.8$ s) than in 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ ($\tau = 0.41$ s). In contrast to the results found for depression, microcultures developed in the presence of Schwann cells showed a comparable facilitation time course to single cell microcultures (Fig. 10), providing time constants of 0.72 s and 0.28 s in 0.5 mM and 1 mM $[Ca^{2+}]_o$, respectively. The longest time constants were thus associated with the lowest release probability condition tested, where fewer vesicles were mobilized from the RRP (Fig. 6E). Altogether, the present results support a scenario where autapses switch between PPF and PPD within a continuous process, which is inversely proportional to release probability. Schwann cells exert a specific effect on synaptic plasticity, enhancing short-term depression but having no effect on facilitation.

Discussion

Although perisynaptic Schwann cells modulate synaptic depression during a train of stimuli at the neuromuscular junction (Robitaille, 1998), it is still unknown whether other peripheral synapses covered by glial cells display comparable phenomena. The present data show that Schwann cells exert a very well defined action on synaptic plasticity of cholinergic autapses by modulating their degree of depression but without modifying the number of synapses established or affecting facilitation.

Schwann cells have the general property of promoting synaptogenesis (Ullian *et al.* 2004), but the density of axo-somatic synapses was similar between single cell and glial microcultures. This result was supported by the fact that the amplitude of EPSCs generated both in single cell and glial microcultures was comparable. The concentration of NGF was a key factor in obtaining

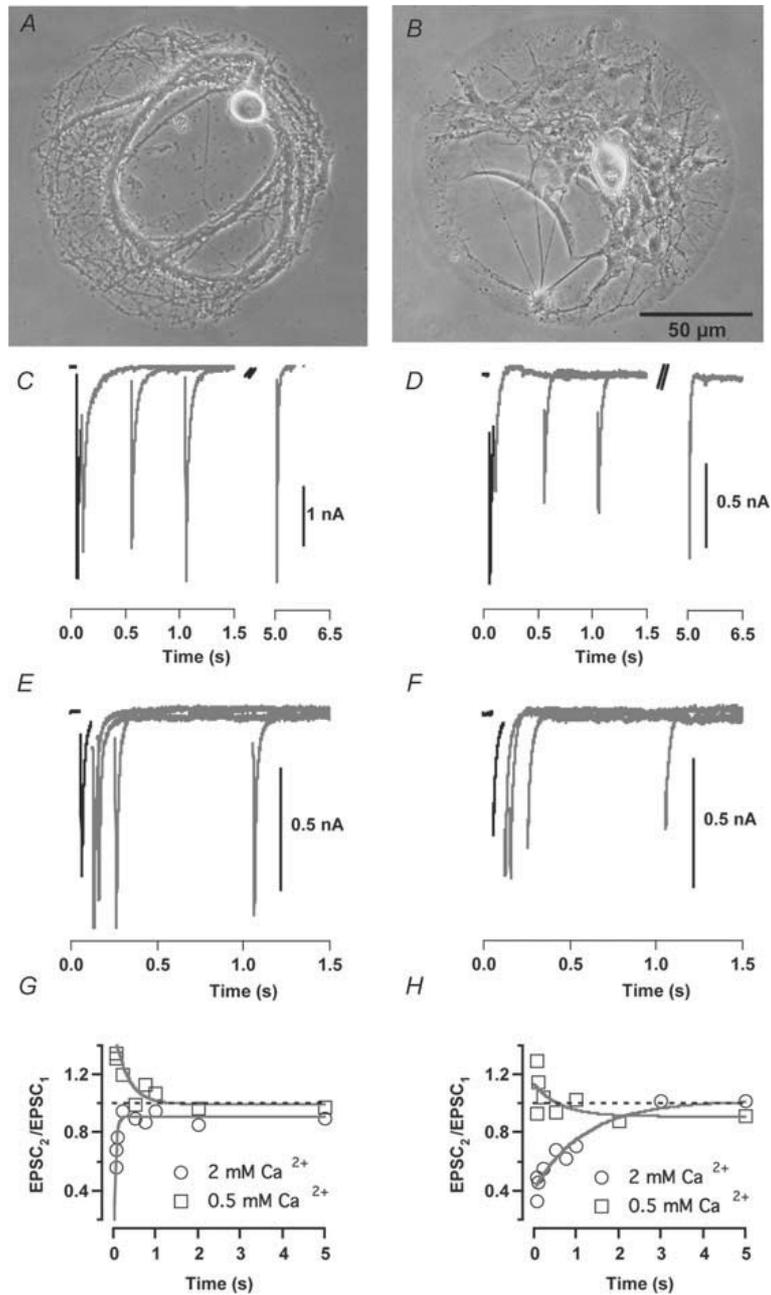


Figure 8. Paired pulse ratio in single cell microcultures and microcultures developed with Schwann cells
A, phase contrast image of a single cell microculture before patching. *B*, image of a microculture developed in the presence of non-neuronal cells after withdrawing the recording electrode. *C* and *D*, paired pulse depression evoked in 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ on neurons shown in *A* and *B*, respectively. The average first EPSC of the series is shown in black. Second EPSCs obtained at several time intervals are shown in grey. Note the different degree in paired pulse depression between *C* and *D*. *E* and *F*, paired pulse facilitation evoked in 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ on neurons shown in *A* and *B*, respectively. *G* and *H*, time courses of recovery from depression and facilitation for neurons shown in *A* and *B*, respectively. Grey lines indicate single exponential fits.

successful microcultures. Autapses were only achieved using concentrations of NGF above 500 ng ml^{-1} , similarly to previously reported values (Furshpan *et al.* 1986*b*). In contrast, a concentration of 25 ng ml^{-1} is enough to establish cholinergic synapses in mass cultures of SCG neurons containing non-neuronal cells (Mochida *et al.* 1994). The different NGF requirements might be attributed to the fact that some non-neuronal cells, such as fibroblasts (Oger *et al.* 1974) and particularly Schwann cells, have the ability to synthesize and secrete a wide range of growth factors, NGF being one of them (Assouline *et al.* 1987; Bampton & Taylor, 2005).

Development and synaptogenesis of the SCG requires NGF (Crowley *et al.* 1994), which mediates its action in a concentration-dependent manner (Chun & Patterson, 1977). It is thus possible that the high NGF concentration used in the study masked the synaptogenic effect of Schwann cells, but remarkably, synapses grown in direct contact with a glial environment showed a different activity from those established in single cell microcultures. They displayed two distinctive features: an enhanced frequency of mEPSCs and a longer period to recover from short-term depression.

Short-term depression can be explained by a depletion of vesicles from the RRP that occurs at high release probabilities during repetitive stimulation (Zucker &

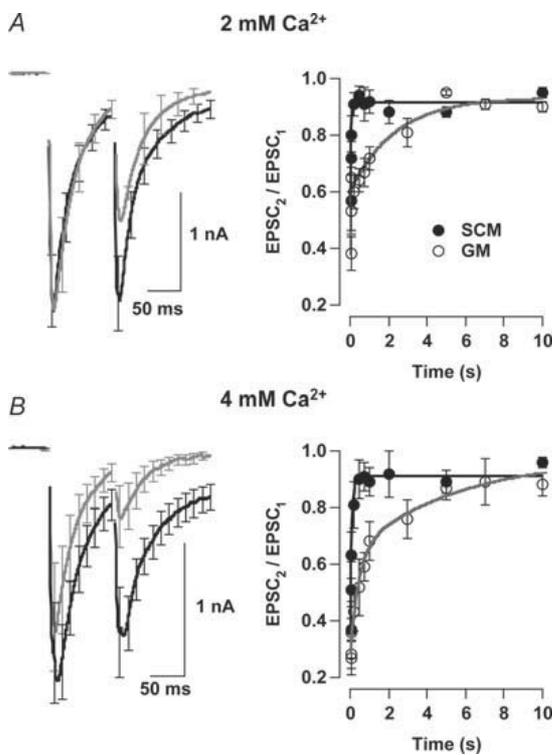


Figure 9. Schwann cells modified paired pulse depression

Paired pulse depression (PPD) was studied at $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$ and $4 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$. *A*, left, traces showing the average EPSCs obtained for a pulse interval of 100 ms in $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$. Single cell microcultures (SCM, black, $n = 12$) and microcultures developed in the presence of glial cells (GM, grey, $n = 11$). Right, recovery from depression illustrated as paired pulse ratio plotted against time. SCM showed a PPD that recovered exponentially ($\tau = 41 \text{ ms}$), while GM recovered more slowly, following a double exponential, providing fast and slow time constants of 14 ms and 2 s , respectively. *B*, left, PPD was enhanced both in SCM ($n = 10$) and GM ($n = 9$) by raising $[\text{Ca}^{2+}]_o$ to 4 mM . In this condition, PPD recovered exponentially in SCM; $\tau = 83 \text{ ms}$. Again, in the presence of non-neuronal cells, recovery from PPD was best fitted with a double exponential ($\tau_1 = 0.4 \text{ s}$ and $\tau_2 = 31 \text{ s}$). Error bars indicate s.e.m. Each point shows the average of values obtained in ≥ 6 different cells.

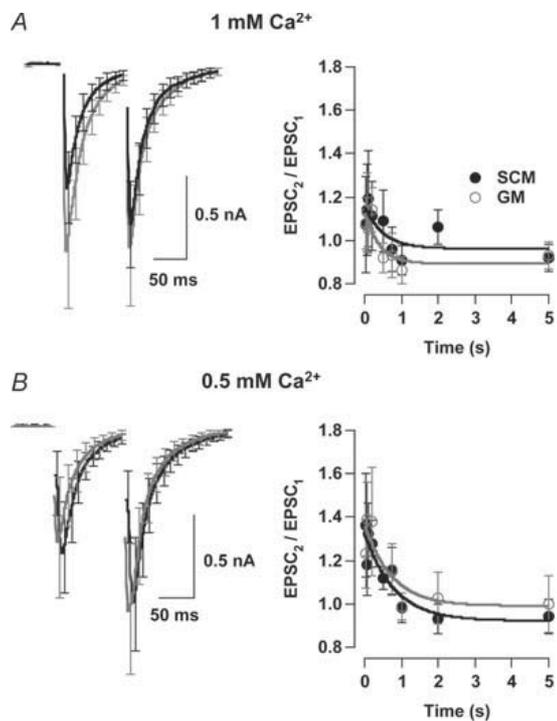


Figure 10. Schwann cells did not modify paired pulse facilitation

Paired pulse facilitation (PPF) was studied at $1 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$ and $0.5 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$. *A*, left, traces showing the average EPSCs obtained for a pulse interval of 100 ms in $1 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$. Single cell microcultures (SCM, black, $n = 10$) and microcultures developed in the presence of glial cells (GM, grey, $n = 9$). Right, facilitation recovered exponentially, illustrated as paired pulse ratio plotted against time. SCM and GM showed time constants of 41 ms and 28 ms , respectively. *B*, left, the degree of PPF was increased both in SCM ($n = 8$) and GM ($n = 6$) by lowering $[\text{Ca}^{2+}]_o$ to 0.5 mM . In this condition, PPF recovered more slowly, showing time constants of 0.6 s and 0.72 s in SCM and GM, respectively. Error bars indicate s.e.m. Each point shows the average of values obtained in ≥ 5 different cells.

Regehr, 2002). The time required to refill the RRP after depression depends on vesicle supply from cytoplasmic pools and the speed of endocytosis (Rizzoli & Betz, 2005). The time course of depression assayed by a paired pulse protocol changed from a fast mono-exponential process in single cell microcultures to a longer lasting bi-exponential time course in glial microcultures. A plausible explanation for this change in behaviour was the enhanced frequency of mEPSCs observed in glial microcultures. If mEPSCs originated from vesicles of the RRP (Rosenmund & Stevens, 1996), the enhanced spontaneous synaptic activity of glial microcultures (almost an order of magnitude larger than single cell microcultures) would antagonize the refilling process, and thus cause a longer lasting depression. Why was depression but not facilitation modified in glial microcultures? Despite the molecular mechanisms involved in facilitation and depression seeming to be different (Zucker & Regehr, 2002), facilitation can only be supported if the RRP comprises enough vesicles. Facilitation was observed at low release probabilities, when a small fraction of the RRP was mobilized. In addition, facilitation and depression shared a common feature: they were inversely related to the number of vesicles released from the RRP by a single action potential (Fig. 7B). Following the assumption that mEPSCs originated from RRP vesicles, the present data suggest that their spontaneous secretion did not compromise the capacity of available quanta for release in low probability conditions, and therefore did not modify the time course of facilitation. Previous studies already showed that glial cells enhance the frequency of spontaneous neurotransmission in synapses formed by retinal ganglion cells (Pfrieger & Barres, 1997) or spinal motor neurons (Ullian *et al.* 2004). The similar observations presented suggest that this might be a common property of glial cells, and particularly Schwann cells.

In sympathetic ganglia thin lamellae of Schwann cell processes cover many nicotinic synapses, preganglionic endings, and somatic and dendritic surfaces (Gibbins & Morris, 2006). So far the reason for such arrangements among Schwann cells, preganglionic boutons and target neurons is still unknown. Present data indicate that the particular morphology and distribution of glia is key to their ability to modify short-term plasticity. Other types of glial cells, such as Schwann cells in motor axons, Bergmann glia in the cerebellum, or astrocytes, cover synapses, and sense and modulate synaptic activity (Bergles *et al.* 1997; Araque *et al.* 1998; Robitaille, 1998). It is likely that a restricted morphological arrangement is required for the observed effect of Schwann cells on synaptic plasticity. In such a narrow environment, diffusible molecules could mediate a crosstalk, similarly to the action of NO or glutamate at the neuromuscular junction (Thomas & Robitaille, 2001; Pinaud *et al.* 2003). Future experiments

are required to establish the identity of the molecular mechanism mediating the increase in the frequency of mEPSCs evoked by Schwann cells.

Nicotinic synapses in ganglia show variable strengths *in vivo*, producing postsynaptic responses that can be supra-threshold or strong and subthreshold or weak. Previous studies have considered convergence of preganglionic fibres to be a key factor determining such responses and therefore controlling the firing of postganglionic sympathetic neurons (McLachlan *et al.* 1997). Plasticity of individual synapses, however, should be taken into account. Changes in synaptic strength in sympathetic ganglia occur during long-term potentiation, whose primary physiological implication is an enhancement of tonic efferent impulses to neuroeffector organs (Alkadhi *et al.* 2005). The observed short-term depression indicates the ability of preganglionic synapses to act as low pass filters. The present data show that Schwann cells play a modulator role in this process: by enhancing the frequency of mEPSCs they decrease the band-pass of the filter. Glial cells would therefore exert a maturation effect on synapses, conferring exclusive properties on neurons, at least in *in vitro* conditions. Such an action would provide a fine tuning of those functions controlled by the superior cervical ganglion, as for example blood vessel tone (Gerges *et al.* 2002). Altogether, the present work evidences that the cellular environment plays a key role in determining synaptic strength of ganglionic neurotransmission, but more experiments are required to establish the mechanisms governing synaptic strength of ganglionic nicotinic synapses.

References

- Alkadhi KA, Alzoubi KH & Aleisa AM (2005). Plasticity of synaptic transmission in autonomic ganglia. *Prog Neurobiol* **75**, 83–108.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP & Haydon PG (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* **10**, 2129–2142.
- Assouline JG, Bosch P, Lim R, Kim IS, Jensen R & Pantazis NJ (1987). Rat astrocytes and Schwann cells in culture synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors. *Brain Res* **428**, 103–118.
- Baluk P (1995). Structure of autonomic ganglia. In *Autonomic Ganglia*, ed. McLachlan EM, pp. 13–72. Informa Health Care.
- Bampton ET & Taylor JS (2005). Effects of Schwann cell secreted factors on PC12 cell neurogenesis and survival. *J Neurobiol* **63**, 29–48.
- Bekkers JM & Stevens CF (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7834–7838.
- Bekkers JM & Stevens CF (1996). Cable properties of cultured hippocampal neurons determined from sucrose-evoked miniature EPSCs. *J Neurophysiol* **75**, 1250–1255.

- Bergles DE, Dzubay JA & Jahr CE (1997). Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14821–14825.
- Birks RI & Isacoff EY (1988). Burst-patterned stimulation promotes nicotinic transmission in isolated perfused rat sympathetic ganglia. *J Physiol* **402**, 515–532.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullen CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Moshier DF, Bornstein P & Barres BA (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421–433.
- Chun LL & Patterson PH (1977). Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons in vitro. I. Survival, growth, and differentiation of catecholamine production. *J Cell Biol* **75**, 694–704.
- Cocchia D & Michetti F (1981). S-100B antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunohistochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **215**, 103–112.
- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD *et al.* (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76**, 1001–1011.
- Deitmer JW & Rose CR (1996). pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* **48**, 73–103.
- Dittman JS & Regehr WG (1998). Calcium dependence and recovery kinetics of presynaptic depression at the climbing fiber to Purkinje cell synapse. *J Neurosci* **18**, 6147–6162.
- Dodge FA Jr & Rahamimoff R (1967). Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* **193**, 419–432.
- Forehand CJ (1985). Density of somatic innervation on mammalian autonomic ganglion cells is inversely related to dendritic complexity and preganglionic convergence. *J Neurosci* **5**, 3403–3408.
- Freschi JE (1982). Effect of serum-free medium on growth and differentiation of sympathetic neurons in culture. *Brain Res* **256**, 455–464.
- Furshpan EJ, Landis SC, Matsumoto SG & Potter DD (1986b). Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J Neurosci* **6**, 1061–1079.
- Furshpan EJ, Potter DD & Matsumoto SG (1986a). Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. III. A Purinergic effect on cardiac myocytes. *J Neurosci* **6**, 1099–1107.
- Gerges NZ, Aleisa AM, Alhaider AA & Alkadhhi KA (2002). Reduction of elevated arterial blood pressure in obese Zucker rats by inhibition of ganglionic long-term potentiation. *Neuropharmacology* **43**, 1070–1076.
- Gibbins IL & Morris JL (2006). Structure of peripheral synapses: autonomic ganglia. *Cell Tissue Res* **326**, 205–220.
- Goda Y & Stevens CF (1998). Readily releasable pool size changes associated with long term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1283–1288.
- Huang WX, Yu Q & Cohen MI (2000). Fast (3 Hz and 10 Hz) and slow (respiratory) rhythms in cervical sympathetic nerve and unit discharges of the cat. *J Physiol* **523**, 459–477.
- Johnson MI, Ross CD, Meyers M, Spitznagel EL & Bunge RP (1980). Morphological and biochemical studies on the development of cholinergic properties in cultured sympathetic neurons. I. Correlative changes in choline acetyltransferase and synaptic vesicle cytochemistry. *J Cell Biol* **84**, 680–691.
- Kofuji P & Newman EA (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* **129**, 1045–1056.
- Mains RE & Patterson PH (1973). Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties. *J Cell Biol* **59**, 329–345.
- Mathey E & Armati PJ (2007). Introduction to the Schwann cell. In *The Biology of Schwann Cells: Development, Differentiation and Immunomodulation*, ed. Armati PJ, pp. 1–12. Cambridge University Press, Cambridge.
- McCann CM & Lichtman JW (2008). In vivo imaging of presynaptic terminals and postsynaptic sites in the mouse submandibular ganglion. *Dev Neurobiol* **68**, 760–770.
- McLachlan EM, Davies PJ, Habler HJ & Jamieson J (1997). On-going and reflex synaptic events in rat superior cervical ganglion cells. *J Physiol* **501**, 165–181.
- Mennerick S & Zorumski CF (1994). Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature* **368**, 59–62.
- Millar AG, Bradacs H, Charlton MP & Atwood HL (2002). Inverse relationship between release probability and readily releasable vesicles in depressing and facilitating synapses. *J Neurosci* **22**, 9661–9667.
- Mochida S, Nonomura Y & Kobayashi H (1994). Analysis of the mechanism for acetylcholine release at the synapse formed between rat sympathetic neurons in culture. *Microsc Res Tech* **29**, 94–102.
- Moulder KL & Mennerick S (2005). Reluctant vesicles contribute to the total readily releasable pool in glutamatergic hippocampal neurons. *J Neurosci* **25**, 3842–3850.
- Murthy VN, Sejnowski TJ & Stevens CF (1997). Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* **18**, 599–612.
- Nagler K, Mauch DH & Pfrieger FW (2001). Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol* **533**, 665–679.
- Oger J, Arnason BG, Pantazis N, Lehrich J & Young M (1974). Synthesis of nerve growth factor by L and 3T3 cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1554–1558.
- Otsu Y, Shahrezaei V, Li B, Raymond LA, Delaney KR & Murphy TH (2004). Competition between phasic and asynchronous release for recovered synaptic vesicles at developing hippocampal autaptic synapses. *J Neurosci* **24**, 420–433.
- Pfrieger FW & Barres BA (1997). Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* **277**, 1684–1687.
- Pinard A, Levesque S, Vallee J & Robitaille R (2003). Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci* **18**, 3241–3250.
- Rizzoli SO & Betz WJ (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* **6**, 57–69.

- Robitaille R (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **21**, 847–855.
- Rohrer H & Sommer I (1983). Simultaneous expression of neuronal and glial properties by chick ciliary ganglion cells during development. *J Neurosci* **3**, 1683–1693.
- Rosenmund C & Stevens CF (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* **16**, 1197–1207.
- Saadat S, Sendtner M & Rohrer H (1989). Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* **108**, 1807–1816.
- Schluter OM, Basu J, Sudhof TC & Rosenmund C (2006). Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* **26**, 1239–1246.
- Schneggenburger R, Meyer AC & Neher E (1999). Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* **23**, 399–409.
- Stevens CF & Williams JH (2007). Discharge of the readily releasable pool with action potentials at hippocampal synapses. *J Neurophysiol* **98**, 3221–3229.
- Thomas S & Robitaille R (2001). Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* **21**, 1087–1095.
- Trouslard J, Marsh SJ & Brown DA (1993). Calcium entry through nicotinic receptor channels and calcium channels in cultured rat superior cervical ganglion cells. *J Physiol* **468**, 53–71.
- Ullian EM, Harris BT, Wu A, Chan JR & Barres BA (2004). Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol Cell Neurosci* **25**, 241–251.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM & Duan S (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* **40**, 971–982.
- Zucker RS & Regehr WG (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**, 355–405.

Acknowledgements

A.L. is a Miguel Servet Researcher from the Servicio Nacional de Salud (Spain). This work was supported by grants PI-05-1050 and FIS-04-173 from Instituto de Salud Carlos III.

Supplemental material

Online supplemental material for this paper can be accessed at: <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/jphysiol.2008.160044/DC1>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular and Cellular Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcne

SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals

David Albrecht, Francisco José López-Murcia, Anna P. Pérez-González, Gregor Lichtner, Carles Solsona, Artur Llobet*

Laboratori de Neurobiologia, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2011
 Revised 21 December 2011
 Accepted 12 January 2012
 Available online 25 January 2012

Keywords:

SPARC
 Neuron–glia interactions
 Synaptic maturation
 Synaptic Vesicle Pools

ABSTRACT

Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) is a matricellular protein produced by glial cells. Although it is highly expressed in synaptogenic areas in the developing nervous system, it is still unclear whether this molecule displays an action on synaptic activity. We show that nanomolar concentrations of SPARC favour a more efficient synapse formation and increase short term depression in single cell cholinergic microcultures. The change in synaptic plasticity, which is also observed when SPARC is locally secreted on stable synapses for 24–48 h, is caused by a high release probability and a reduction in the size of the rapidly releasable pool of vesicles. Both features are attributable to synapses operating at an immature stage as demonstrated by correlative electrophysiology and electron microscopy experiments. Presynaptic terminals developed in the presence of SPARC display few cytoplasmic vesicles and two to threefold decrease in the number of docked vesicles at active zones. At the postsynaptic level, the analysis of miniature excitatory postsynaptic currents suggests SPARC has little effect on the number of nicotinic receptors but might alter their composition. The widespread distribution of SPARC makes current findings potentially relevant to other excitatory synapses and development of neuronal circuits.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Neurons and glia are intimately coupled in all parts of the nervous system and contribute together to sensory, motor and integrative functions (Petzold et al., 2008; Robitaille, 1998; Schummers et al., 2008). From the early stages of development, glial cells actively participate in the wiring of neural circuits, first promoting synaptogenesis and, as maturation takes place, directly mediating information processing (Pfrieger, 2010). Matricellular proteins are key to the role of glia in synaptogenesis (Eroglu, 2009). Proteins such as thrombospondin, Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), tenascin C and hevin, all act as modulators of cell matrix interactions and show changes in expression patterns throughout development suggesting their involvement in the establishment, maturation and maintenance of synaptic contacts. The most direct evidence for such a role has been provided for thrombospondin, which participates in the establishment of synapses (Christopherson et al., 2005). However, it is not clear whether other matricellular proteins regulate synapse formation, nor how any might regulate synaptic function.

Several pieces of information prompted us to investigate how SPARC might regulate synaptic functions. In addition to its widespread distribution throughout the nervous system, this protein is particularly enriched around synapses in the hippocampus and in

synaptogenic areas during development (Mendis and Brown, 1994; Mendis et al., 1995), shows high expression levels in some neurogenic niches in the adult brain (Vincent et al., 2008) and becomes upregulated in nervous tissue upon injury (Liu et al., 2005). Such evidences suggest that SPARC could be potentially effective both on developing and stable synapses. On the other hand, there are no obvious nervous defects in SPARC null mice (Gilmour et al., 1998), or knock out mice established for other matricellular proteins (Christopherson et al., 2005; McKinnon et al., 2000). It is unclear whether this represents an actual absence of function, or redundancy within this family of proteins. Recently, it has been proposed that SPARC acts as a negative regulator of synapse formation by antagonizing the action of hevin (Kucukdereli et al., 2011), a possible direct effect of SPARC on synapses, remains however unresolved.

To investigate a potential role of SPARC in controlling synaptic functions, we used cholinergic microcultures established from the superior cervical ganglion of newborn rats. In these experimental conditions a single neuron successfully establishes nicotinic autapses in the absence of glial cells (Perez-Gonzalez et al., 2008). The main advantage to other neuronal microcultures is, that the concentration of any glial secreted factor in the culture medium can be controlled and deliberately modified because neurons do not grow onto a feeder layer of cells. By using this approach we show that nanomolar concentrations of SPARC aid formation of synaptic contacts but arrest them to a stage characterized by a high probability of release and a small rapidly releasable pool of vesicles, which are two typical properties of immature synapses.

* Corresponding author at: Laboratori de Neurobiologia-IDIBELL, Pavelló de Govern, Lab. 4112, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain.
 E-mail address: allobet@ub.edu (A. Llobet).

Results

Cholinergic autapses developed in the absence of glia show stereotyped neurotransmission features

Cholinergic autapses were studied in microcultures of isolated rat superior cervical ganglion neurons, what we termed Single Cell Microcultures (SCMs, Fig. 1). In this condition, $45 \pm 4\%$ of neurons ($n=352$, 48 cultures) showed functional autapses. Neurotransmission displayed a stereotyped profile in 2 mM $[Ca^{2+}]_e$ (see also Perez-Gonzalez et al., 2008): very low, or even absent spontaneous activity and depression for paired pulses delivered at intervals shorter than 1 s. To certify the presence of a single cell, neurons were fixed and nucleic acids were stained at the end of a recording episode (Fig. 1). Those microcultures showing more than one nuclei were not considered, since they reflected the presence of glial cells or more than one neuron (see Experimental Methods section for details). Selecting functional neuronal microcultures devoid of non-neuronal cells was key to this study, because when present, peripheral glial cells enhance spontaneous activity and short term depression, as previously reported (Perez-Gonzalez et al., 2008).

Glial cells generate nanomolar concentrations of SPARC in the extracellular space

To test for a possible effect of SPARC on synapses, we first sought to establish whether this matricellular protein was already present in control conditions. The addition of 2.5% rat serum and 2.5% foetal bovine serum to the culture medium supporting the growth of SCMs provided ~ 0.1 nM basal concentration of SPARC in a single culture well, as revealed by western blot and ELISA analysis (Figs. 2A and B). Conditioned medium from cultures of peripheral glial cells obtained from the superior cervical ganglion showed however, higher concentrations of this matricellular protein, around 1 nM. This observation led us to infer that SPARC could be signalling on neurons at a nanomolar concentration.

To obtain an estimate on the biologically relevant concentrations of SPARC in the neuroglial space, we modelled the diffusion of the matricellular protein upon release from a single vesicle (see Experimental methods section for a full description of the model). Two assumptions were made based on experimental observations:

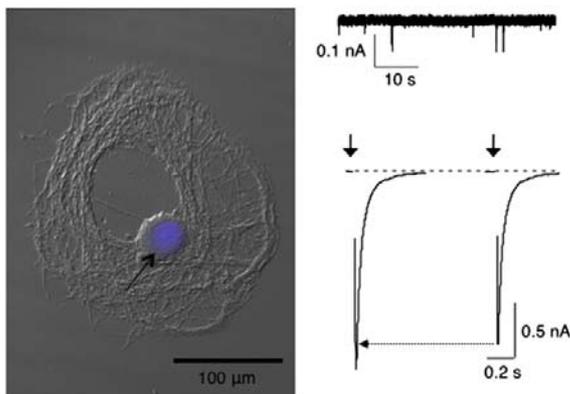


Fig. 1. Cholinergic Single Cell Microcultures (SCMs) show stereotyped neurotransmission features. Left, differential interference contrast image of a SCM. Staining of nucleic acids denotes the presence of a single nucleus. Right, typical recordings of spontaneous (up) and evoked cholinergic autaptic responses. Sodium currents were cancelled for illustration purposes. Solid and dotted arrows indicate application of stimuli and paired pulse ratio, respectively.

i) peripheral glial cells stored SPARC into secretory vesicles below resolution of optical microscopy (i.e. 200 nm, Figs. 2C and D) and ii) the distance between neuronal and glial membranes was 20 to 40 nm (Ventura and Harris, 1999). Since the number of SPARC copies packed into a vesicle was the main determinant of protein concentrations in the extracellular space after release (see Experimental methods section), four situations were drawn assuming the number of molecules ranged from 100 to 2000. These figures were chosen after estimating the volume of a single SPARC molecule from structural data (Hohenester et al., 2008). Our calculations showed the contents of a single average vesicle would at least cover $30 \mu m^2$ of neuronal surface at a concentration ≥ 1 nM (Fig. 2F). Hence, a nanomolar [SPARC] could be achieved around the entire surface of a $10 \mu m$ diameter neuronal cell body by the release of 6–7 vesicles from wrapping glial cells. Likely, the marked release of SPARC observed during embryogenesis or at neurogenic niches in the adult brain, reflects nanomolar concentrations of the protein in the neuroglial space.

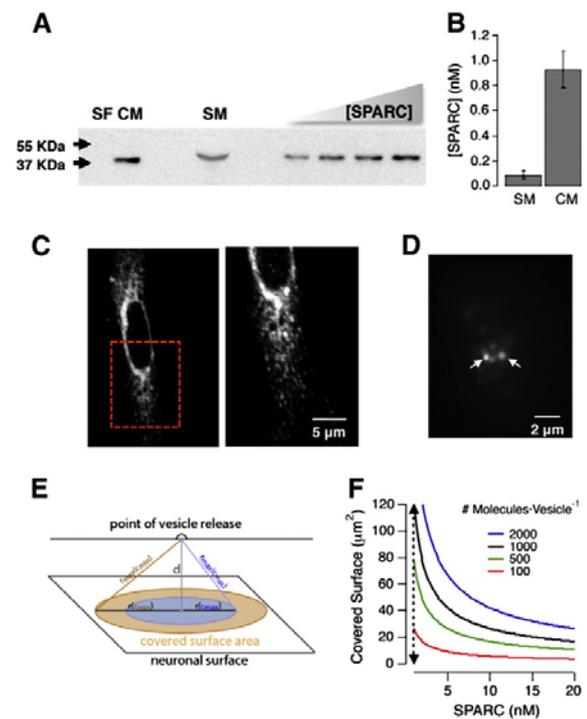


Fig. 2. Glial cells secrete nanomolar concentrations of SPARC on synapses. A) Western blot analysis of SPARC production by peripheral glial cells. SF: serum free medium; CM: conditioned medium obtained in serum free conditions; SM: control culture medium used to grow SCMs containing 2.5% foetal bovine serum and 2.5% rat serum; SPARC: Recombinant murine SPARC applied at 5 ng, 10 ng, 15 ng and 20 ng. CM and SM were obtained from a single 3.8 cm^2 well and concentrated 8 times. Note the higher [SPARC] in CM compared to the SM. B) Quantification of [SPARC] in CMs ($n=3$) and SMs ($n=5$) by ELISA. C) Visualization of SPARC-GFP in a transfected peripheral glial cell shows the targeting of the protein to vesicular structures. Image on the right is a magnification of the area indicated by the red dotted box. D) Footprint of a COS-7 cell transfected with SPARC-GFP observed by total internal reflection fluorescence microscopy. Arrows point out two vesicles containing the construct. E) Diagram showing the geometrical considerations used to model the diffusion of SPARC in the neuroglial space upon release from a single vesicle. The model estimates the neuronal surface covered by SPARC for a concentration range found within c_{min} and c_{max} , located at a distance (d) from the glial cell membrane. F) Neuronal surface covered at a nanomolar concentration of SPARC, setting c_{min} to 1 nM, c_{max} to $1 \mu M$ and $d=40$ nm. Four situations are drawn, assuming a single vesicle contains from 100 to 2000 molecule copies. Arrowed line indicates c_{min} .

Nanomolar concentrations of SPARC increase spontaneous neurotransmission and enhance short term depression of cholinergic autapses

When the basal concentration of SPARC in the culture medium (Fig. 2B) was increased by adding 10 ng/ml (0.24 nM) of the murine recombinant protein during the whole culture period, the characteristic neurotransmission features of control SCMs did not change (compare Suppl. Figs. 1A and B to Fig. 1). Spontaneous neurotransmission was very low and short term plasticity assayed by paired pulses showed the stereotyped behaviour of control SCMs. Paired pulse depression for a 1 s interval was 0.82 ± 0.03 ($n=9$), not significantly different from 0.88 ± 0.03 ($n=63$) obtained in control SCMs. Recovery from paired pulse depression occurred along a single exponential process with a time constant of 8 ms, similarly to the time course ($\tau=24$ ms) found in control SCMs (see below Figs. 3E and 7F). Raising the concentration of SPARC to 100 ng/ml (~ 2.4 nM) throughout the culture period changed spontaneous and evoked neurotransmission: SCMs displayed a similar phenotype to cholinergic neuronal microcultures developed in the presence of peripheral glial cells (Perez-Gonzalez et al., 2008). Typically, control SCMs showed very little spontaneous activity, with miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) occurring at an average frequency of 0.33 ± 0.14 s $^{-1}$ ($n=18$). Synaptic Development in the presence of 2.4 nM SPARC increased spontaneous neurotransmission to an average frequency of 5.91 ± 1.8 s $^{-1}$ ($n=17$), with mEPSCs generally appearing in bursts (Fig. 3A). Miniature events were distributed within a wide range of frequencies, from 0.1 to 20 Hz but, only a third of recorded neurons displayed the characteristic spontaneous activity of control SCMs, below 1 Hz. The profile of mEPSCs was partially affected by SPARC. Application of the matricellular protein had no effect on the amplitude (Fig. 3B) but decreased the mean charge carried by miniature events from 1.7 pC to 1.4 pC ($p<0.001$, Fig. 3C). This difference was caused by a faster decay phase in neurons developed during 14–18 D.I.V. in 2.4 nM SPARC (Fig. 3C, inset) thus supporting a postsynaptic effect of the matricellular protein. The amplitude of mEPSCs is essentially related to the concentration of neurotransmitter released by a single vesicle and the postsynaptic receptor density (Lisman et al., 2007). In contrast, a faster decay is suggestive of alterations in the molecular composition of nicotinic receptors, as described elsewhere (David et al., 2010). This postsynaptic effect of SPARC was not related to the marked increase in the frequency of mEPSCs, which likely originated from presynaptic changes.

To assay for modifications in presynaptic terminal properties, short term plasticity was studied using paired pulse stimuli (Zucker and Regehr, 2002). In control SCMs, paired pulse ratio (EPSC₂/EPSC₁) was 0.88 ± 0.03 ($n=63$) when the stimulus interval was 1 s (Fig. 1). In contrast, the ratio was reduced to 0.73 ± 0.02 ($n=23$) at this same interval when 2.4 nM SPARC was present in the culture medium (Fig. 3D). The difference between the two groups arose from a faster recovery from depression observed in control conditions. In control SCMs, recovery followed a single exponential with a time constant of 24 ms, while in the presence of the matricellular protein, the time course became bi-exponential with fast and slow time constants of 23 ms and 42 s, respectively (Fig. 3E). Therefore, the presence of nanomolar concentrations of SPARC in the culture medium enhanced short term depression.

SPARC increases the probability of neurotransmitter release

Analysis of paired pulse stimuli showed that besides increasing short term depression, SPARC also increased synaptic potency, defined by the average EPSC amplitude. Fig. 3D shows the peak of the first EPSC used to study paired pulse ratio changed from 2418 ± 151 pA in control SCMs ($n=31$) to 3104 ± 191 pA in SCMs developed with SPARC ($n=23$, $p<0.05$). The maximum value of an EPSC is described by the following equation: $I_{EPSC} = Q \cdot Pr \cdot N$, where Q, Pr and N, refer to the average

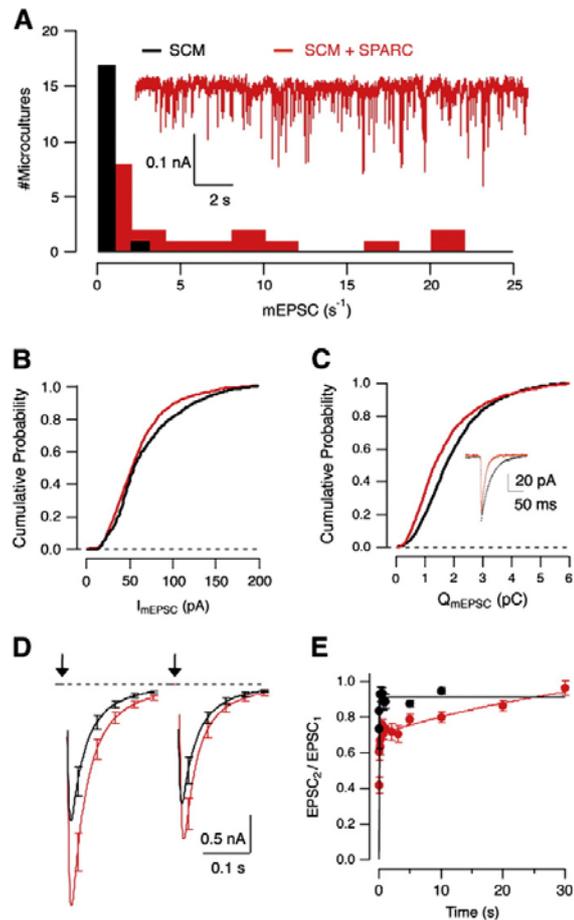


Fig. 3. Effects of SPARC on mEPSC frequency and short-term depression. A) Distribution of mEPSC frequency in control SCMs (black) and SCMs developed during 14–18 D.I.V. with 2.4 nM SPARC (SCM + SPARC, red). Recording illustrates spontaneous activity of a neuron treated with SPARC. B) Distribution of mEPSC amplitudes in control SCMs ($n=2098$, 18 cells) and SCMs + SPARC ($n=2177$, 17 cells). C) Distribution of charges carried by mEPSCs in control SCMs ($n=1430$, 9 cells) and SCMs + SPARC ($n=1510$, 12 cells). The inset illustrates the average profile of a mEPSC, in both conditions (SCMs, $n=33$ and SCMs + SPARC, $n=336$). The exponential function describing the decay phase shows a slower time constant of 29 ms in the control SCM, compared to 12 ms in the neuron developed with SPARC. D) Plot of the average paired pulse ratio at 1 s interval in control SCMs (black, $n=19$) and SCM + SPARC (red, $n=12$). Error bars indicate 1 s.e.m. Note synaptic potency (amplitude of EPSC₁) is increased in the SCM + SPARC group. E) Recovery from paired pulse depression obtained by delivering stimuli at time intervals ranging from 50 ms to 30 s in control SCMs (dots show $n \geq 9$) and SCMs + SPARC (dots show $n \geq 6$). Data are expressed as mean \pm 1 s.e.m. Recovery was fitted by a single exponential in SCMs ($\tau=24$ ms) and a double exponential in SCMs + SPARC ($\tau_{fast}=23$ ms, $\tau_{slow}=42$ s).

current of a single mEPSC, the release probability and the number of independent release sites, respectively (Ikeda and Bekkers, 2009). Since application of SPARC did not modify the peak of mEPSCs (Fig. 3B), changes in current amplitude could thus be related to Pr and/or N. Although several studies associate the enhancement of paired pulse depression to an increase in Pr (Sakaba et al., 2002), the analysis of paired stimuli does not consider possible changes in N. We therefore carried out a variance-mean analysis by exposing synapses to varying $[Ca^{2+}]_e$ that modified Pr (Fig. 4A, Clements and Silver, 2000). Autapses developed in the presence of SPARC showed in 2mM $[Ca^{2+}]_e$ a higher Pr than control SCMs. There was a significant enhancement from 0.34 ± 0.08 ($n=5$) to 0.6 ± 0.05

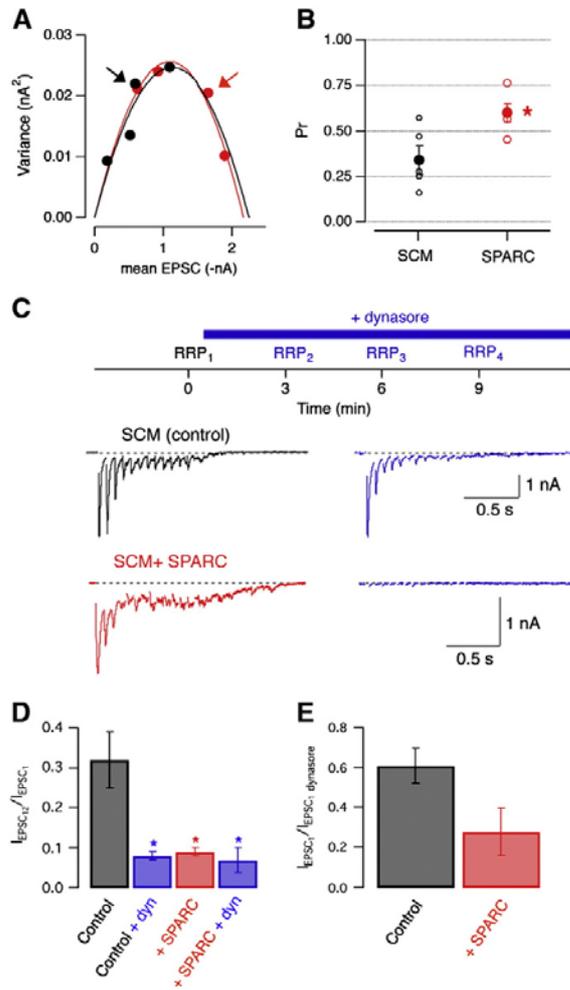


Fig. 4. Effect of SPARC on release probability and the size of synaptic vesicle pools. A) Variance–mean analysis of a control SCM (black) and a SCM developed with 2.4 nM SPARC (red). Each point represents a different release probability obtained at the following $[Ca^{2+}]_e$: 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 6 mM. Arrows indicate variance at 2 mM $[Ca^{2+}]_e$. B) Release probability calculated from the variance–mean analysis for SCMs developed with or without SPARC. Asterisk denotes a significant difference ($p < 0.05$). Dots indicate mean \pm 1 s.e.m. C) To reduce the size of presynaptic vesicle pools, three trains of stimuli delivered at 14 Hz were applied at 3 min intervals in the presence of dynasore. Recordings show RRP₁ and RRP₄ for two different cells. D) Analysis of depression during a stimulus train by calculating the ratio found for the 12th/1st EPSC. Error bars indicate 1 s.e.m ($p < 0.01$). E) The amplitude of the 1st EPSC of the train (synaptic potency) decreased after lowering available vesicles for release with dynasore. Reduction of synaptic potency was larger in SPARC treated neurons ($p < 0.05$).

($n = 5$, Fig. 4B, $p < 0.05$). As expected, the quantal parameter Q was not affected by SPARC, and average values of 54 ± 11 pA ($n = 5$) and 69 ± 10 pA ($n = 5$) were obtained in the absence and presence of the matricellular protein, respectively. In terms of N , there were no apparent changes, albeit this parameter showed a high degree of variability among cultures, ranging from 30 to 157. Consequently, the increase in short-term depression evoked by SPARC was mainly attributed to an elevation of Pr but, the wide distribution found for the quantal parameter N made unclear whether the matricellular protein was also affecting the number of release sites or the organization of vesicle pools.

SPARC decreases the amount of synaptic vesicles available for release

Delivery of a train of stimuli at 14 Hz in 2 mM $[Ca^{2+}]_e$ caused a progressive depression of evoked responses that was mainly attributed to depletion of vesicle pools (Fig. 4C, Zucker and Regehr, 2002). It was quantified by calculating the relationship between the amplitudes of the 12th and 1st EPSCs. The value of this *depletion ratio* in control SCMs was of 0.29 ± 0.07 ($n = 17$). To test whether depression during high frequency stimulation could indeed be attributed to emptying available vesicles for release, dynasore, an inhibitor of dynamin, was applied at 100 μ M. Having compensatory endocytosis blocked (Newton et al., 2006), three high frequency trains were delivered every 3 min during drug application, aiming to decrease the size of vesicle pools. As a result, control SCMs showed on the third train a significant decrease of their *depletion ratio* to 0.08 ± 0.01 ($n = 14$, $p < 0.001$, Fig. 4D). Neurons developed in the presence of 2.4 nM SPARC presented a value of 0.09 ± 0.01 ($n = 25$), which was similar to control SCMs having their vesicle pools reduced by dynasore application. The possibility that SPARC treated neurons presented less available vesicles for release was further suggested when EPSCs were suppressed in 50% of neurons treated with dynasore (see example in Fig. 4C). Reduction in vesicle pool size decreased synaptic potency, defined as the amplitude of the first EPSC of the train. This parameter was reduced to 60% in control SCMs but in SPARC treated neurons the effect was more marked, lowering its value down to ~20% ($p < 0.05$, Fig. 4E). Taken altogether, these results suggested SPARC treatment decreased the number of vesicles available for release in a presynaptic terminal.

The size of the Rapidly Releasable Pool of vesicles is reduced by SPARC

The Rapidly Releasable Pool (RRP) is defined by those vesicles docked to the active zone, which are rapidly released when a stimulus arrives to the presynaptic terminal. Since this set of vesicles is the most significant contributor to short term plasticity, we investigated whether SPARC modified the RRP size analysing trains of stimuli (Fig. 5A, Sakaba et al., 2002). In control SCMs and SCMs developed with 2.4 nM SPARC, the size of this particular pool was of 5372 ± 421 pA ($n = 48$) and 4898 ± 356 ($n = 38$), respectively. Hence, SPARC non significantly reduced the current associated to the RRP by a 10% ($p = 0.4$). Calculations based on a stimulus train typically result in underestimated RRP values since phenomena contributing to depression such as inactivation of presynaptic voltage gated calcium channels are not taken into account. In addition, the increased release probability and spontaneous activity observed by SPARC treatment could also interfere with evoked responses during high frequency trains. To overcome these limitations, the RRP size was also estimated using local application of a hypertonic sucrose solution (Fig. 5B). In this set of experiments neurons were silenced with TTX 24–48 h before recording to minimize depletion of vesicle pools by spontaneous activity. Control SCMs showed a RRP of 390 ± 47 pC, about two times the size of SPARC treated neurons (182 ± 36 pC, $p < 0.01$). Because both methodologies used to calculate the RRP made reference to the whole population of synapses recorded, measurements were refined performing correlative electrophysiology and confocal experiments. The aim was to obtain an approximate calculation of the number of vesicles comprising the RRP of a single autapse.

To visualize synaptic contacts by optical microscopy, neurons were stained after recording for two presynaptic markers: synaptophysin (presynaptic vesicles) and bassoon (active zones). Count of co-localized marks with somatic location (see Experimental Methods for details), provided an estimate of the number of terminals that more substantially contributed to evoked responses (Fig. 5C). Dendritic labelling was not taken into account because space-clamp limitations and cable-filtering properties likely reduced the contribution of synapses found in these processes (Ulrich and Lüscher, 1993).

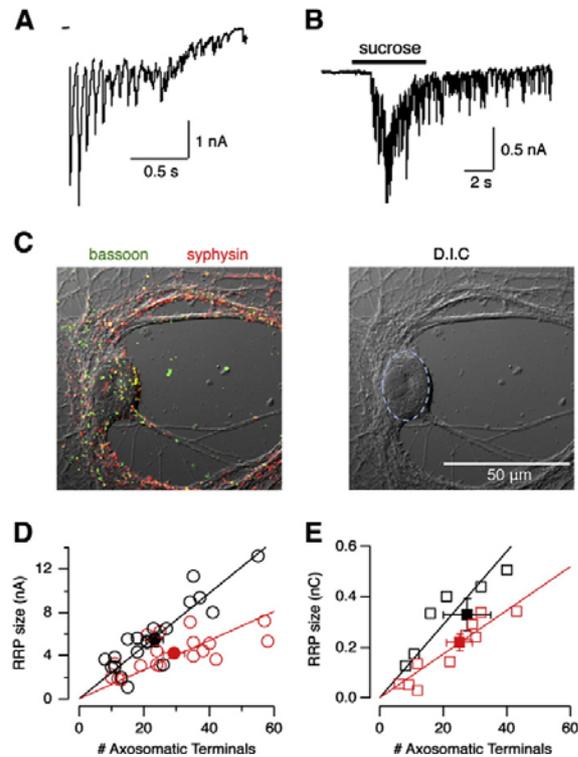


Fig. 5. Effect of SPARC on the size of the Rapidly Releasable Pool (RRP) of vesicles. A, B) Experimental methods used to calculate the RRP. High frequency train and local application of a hypertonic sucrose solution. C) Projection of confocal sections obtained from a recorded neuron stained for bassoon (green) and synaptophysin (red). Somatic area was defined from the D.I.C. image (dotted line). D) Plot of RRP size calculated from trains of stimuli, against the number of presynaptic terminals with somatic location counted from stained neurons. Two independent linear fits to control SCMs (black) and SCMs developed in 2.4 nM SPARC (red) determine that a single axosomatic terminal is contributing to the RRP with 245 pA and 134 pA, respectively. Bins show mean \pm 1 s.e.m for each group. E) Plot of RRP size calculated after local application of a hypertonic solution, against the number of presynaptic terminals estimated from confocal images. The independent linear fits determine a single axosomatic terminal contributes to the total RRP with 14.8 pC and 8.6 pC in control SCMs and SCMs treated with 2.4 nM SPARC.

Plot of the total RRP size obtained by a high frequency train or sucrose application, against the number of axosomatic terminals, showed a wide distribution for control SCMs and SCMs developed with 2.4 nM SPARC (Figs. 5D and E). Both groups were well fitted by independent linear functions, providing four different estimates. Contribution of a single autapse to the total RRP in control SCMs was 245 pA ($r=0.89$) or 14.8 pC ($r=0.93$). For neurons treated with 2.4 nM SPARC, a single synapse contributed 134 pA per terminal ($r=0.67$) or 8.6 pC ($r=0.94$). Thus, development in the presence of the matrix protein decreased the slope of the linear functions relating the total RRP size and the number of axosomatic presynaptic terminals. Assuming a homogenous population synapses, and considering the average current and charge for a control mEPSC were 60 pA and 1.7 pC (Figs. 3B and C), the RRP in a control presynaptic terminal would be defined by ~4–9 vesicles. For neurons treated with 2.4 nM SPARC, and considering the charge carried by a mEPSC was 1.4 pC (Fig. 3C), the RRP size would be decreased to about its half, down to ~2–6 vesicles.

To confirm the effect of SPARC on RRP size, correlative electrophysiology and electron microscopy experiments were performed. The aim was to quantify the number of docked vesicles at the active

zone, which is determinant of the RRP size in hippocampal boutons (Schikorski and Stevens, 2001) or retinal bipolar neurons (von Gersdorff et al., 1996). Control and SPARC treated SCMs, displaying their characteristic paired pulse plasticity, were processed for electron microscopy (Figs. 6A and B). Both groups showed synaptic boutons of similar size, with a mean diameter of $1.13 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (control SCMs, $n=4$) and $1.10 \pm 0.13 \mu\text{m}$ (SCMs + 2.4 nM SPARC, $n=10$). In agreement with dynasore experiments (Figs. 4C–E), control SCMs showed about 3 times more cytoplasmic vesicles than SCMs developed in 2.4 nM SPARC. Specifically, a 60 nm section of a control presynaptic terminal showed 139 ± 16 vesicles (Fig. 6C, $n=6$ synapses, 4 neurons), resembling synapses described elsewhere (Furshpan et al., 1986). In contrast, the presence of SPARC decreased this figure to 53 ± 13 vesicles (Fig. 6D, $n=10$ synapses, 3 neurons). Moreover, SPARC also modified the number of docked vesicles at active zones, decreasing from 6 ± 1 in control SCMs to 2 ± 1 in SCMs developed with SPARC (Fig. 6E). Pre and postsynaptic densities were obvious

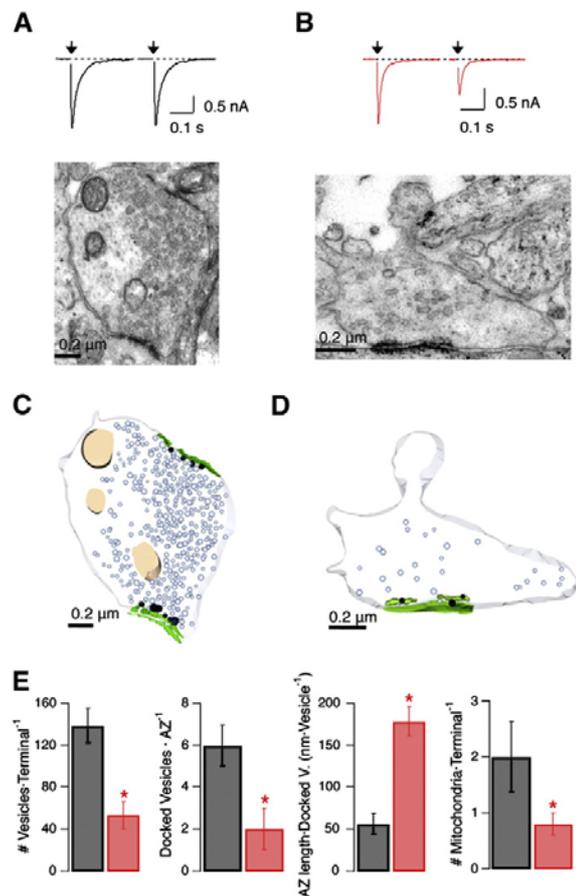


Fig. 6. Effect of SPARC on the ultrastructure of cholinergic presynaptic terminals. A, B) Correlative electrophysiology and electron microscopy experiments. Paired pulse recordings obtained after delivering two stimuli at 1 s interval in a control SCM cultured for 16 D.I.V. (A) and a SCM developed in 2.4 nM SPARC for 15 D.I.V. (B). Synaptic potency was similar in both neurons but notice the enhancement of depression in the presence of SPARC. Micrographs show section of a presynaptic terminal from each neuron. Although synaptic densities are obvious in both terminals, the SPARC treated neuron shows few synaptic vesicles. C, D) Three-dimensional reconstruction of synapses shown in A and B, respectively. Docked vesicles at the active zone are coloured in black and cytoplasmic vesicles in light blue. E) Summary of electron microscopy data. Significance level is $p<0.01$.

in both conditions tested, showing similar lengths of 342 ± 88 nm ($n=4$) and 403 ± 47 nm ($n=10$). These numbers accounted for one docked vesicle in 105×105 nm square at the active zone of a SPARC treated neuron, About three times lower than control synapses.

In summary, two different, complementary approaches, showed the size of the RRP was reduced to about its half in SPARC treated microcultures. This observation, alongside the overall reduction in cytoplasmic vesicles, shows presynaptic terminals developed in the presence of SPARC acquire an immature phenotype, similarly to cholinergic synapses of superior cervical ganglion neurons in vitro (Rees et al., 1976) and in vivo (Rubin, 1985).

Local release of SPARC enhances short term depression of autapses developed in the absence of glia

To generate an acute and localized release of SPARC, thus emulating gradients generated by glial cells under physiological conditions, transiently transfected COS-7 cells with GFP and SPARC were transferred onto already developed microcultures (≥ 14 D.I.V.). In this experimental condition, which avoided use of the recombinantly produced protein, the matricellular protein was synthesized and secreted by COS-7 cells on the vicinity of established synapses, for 24 to 48 h. The number of GFP positive cells added to a microdot was variable, ranging from 0 up to 8 (Fig. 7A). Because it was considered only cells expressing GFP were able to secrete SPARC (Fig. 7B), those microcultures showing one or more fluorescent COS-7 cells were selected in this set of experiments. The following observations led to the assumption that the procedure described locally increased [SPARC] at a nanomolar range around autapses: i) COS-7 cells were closely located to neurons, with distances to the soma ranging from 1 to $40 \mu\text{m}$, ii) the number of SPARC producing cells was probably underestimated since transfection was carried out at a GFP:SPARC 1:4 ratio and the total number of cells added was typically 3 to 4 times the quantity of GFP positive cells (Fig. 7A), iii) microcultures were established on a collagen substrate, which binds SPARC very efficiently (Hohenester et al., 2008) and iv) added transfected COS-7 cells produced very efficiently the matricellular protein (Fig. 7B), enriching supernatants with ~ 0.3 nM SPARC 48 h after plating (Fig. 7C). To correct for unspecific cell-to-neuron interactions, the control group was based on SCMs with added COS-7 cells expressing only GFP. As expected, in this condition spontaneous or evoked activity was not modified (Figs. 7D and E). A distinct result was obtained when the added COS-7 cells also secreted SPARC. Spontaneous activity was not affected, being again comparable to SCMs (Fig. 7D), but paired pulse depression and synaptic potency were enhanced. Recovery from depression followed a double exponential with fast and slow time constants of 9.5 ms and 19.8 s, respectively (Fig. 7F). Therefore, the effects of SPARC on short term plasticity were comparable when the protein was applied to the culture medium of developing microcultures or by local release on already established synapses.

Concentration dependent effects of SPARC on the formation of cholinergic autapses

To gain a better understanding on the biologically relevant concentrations of SPARC to the described synaptic effects, the recombinant matricellular protein was applied at 5 nM, 10 nM and 25 nM for 14–18 D.I.V. Before assaying plasticity, two noticeable effects appeared. First, the likelihood of finding a given SCM displaying neurotransmission increased (Fig. 8A). As explained above $55 \pm 4\%$ of control SCMs ($n=352$, 48 cultures), or $61 \pm 5\%$ of SCMs exposed to 0.24 nM SPARC ($n=30$, 6 cultures) did not show neither evoked nor spontaneous events. Control figures were significantly reduced to $34 \pm 6\%$ ($p<0.01$, $n=111$, 19 cultures), $12 \pm 6\%$ ($p<0.01$, $n=44$, 5 cultures) and $12 \pm 6\%$ ($n=16$, 3 cultures), in 2.4 nM, 5 nM and

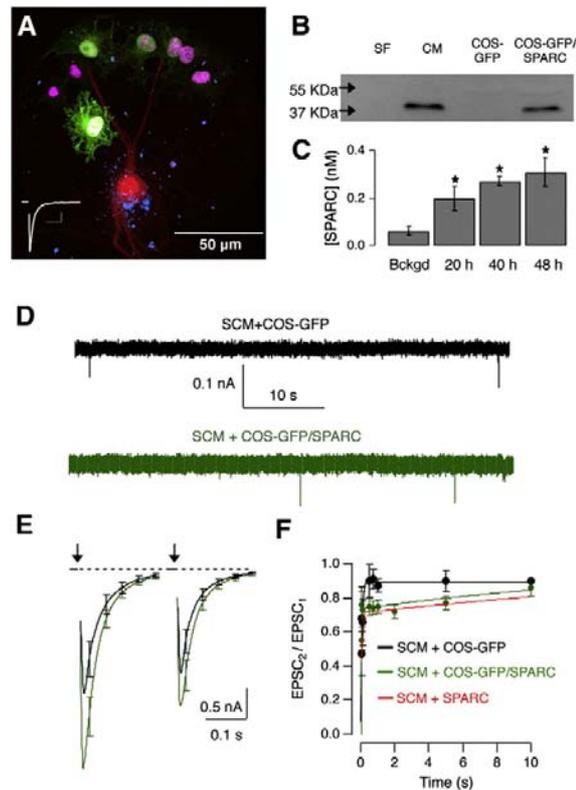


Fig. 7. Local secretion of SPARC on established cholinergic autapses does not modify spontaneous activity. A) Image of a SCM containing at least three COS-7 cells expressing GFP within the collagen microdot. The autaptic current generated in this particular neuron is indicated in the inset (calibration bars 1 nA, 0.1 s). Neuronal processes, filled with the internal solution containing Alexa-555 are depicted in red. The location of presynaptic terminals is indicated by bassoon staining (blue). Nucleic acids are stained with DAPI (magenta). B) Western blot showing the ability of COS-7 cells co-transfected with plasmids codifying for GFP and SPARC to secrete the matricellular protein 36 h post-transfection. Lines were loaded with the following media: SF (serum free medium), CM (serum free medium conditioned by peripheral glial cells, as in Fig. 2A), COS-GFP (serum free medium conditioned by COS-7 cells transfected with GFP alone) and COS-GFP-SPARC (serum free medium conditioned by COS-7 cells transfected with GFP and SPARC). Supernatants were obtained from a single 3.6 cm^2 well and concentrated 10 times. C) [SPARC] in supernatants of COS-7 cell cultures transfected with GFP and SPARC at 1:4 ratio collected 20 h, 40 h and 48 h after plating ($n=4$). Background concentration present in the culture medium is also indicated ($p<0.01$). D) Spontaneous activity of SCMs containing COS-7 cells expressing GFP (black) or GFP and SPARC (green). E) Effect of COS-7 cells locally producing SPARC on paired pulse depression studied at 1 s interval (green, $n=18$). Black trace illustrates control experiments performed when COS-7 cells expressing GFP alone ($n=10$). Error bars indicate 1 s.e.m. F) Paired pulse ratio plotted as a function of the time interval between pulses in SCMs containing COS-7 cells expressing GFP alone were added (control, black), or GFP and SPARC (green). Each dot represents mean \pm 1 s.e.m. Recovery from depression was fitted by a single exponential ($\tau=67$ ms) or a double exponential ($\tau_{\text{fast}}=9.5$ ms and $\tau_{\text{slow}}=20$ s). The time course obtained in the presence of 2.4 nM SPARC is shown in red for comparison (same as 3E).

10 nM SPARC, respectively. Second, application of the matricellular protein reduced neuronal surface, measured as membrane capacitance. In SCMs treated with 5 nM and 10 nM SPARC, the electrically accessible membrane was significantly decreased by 13% ($p<0.05$) and 25% ($p<0.05$), respectively. Higher concentrations of SPARC produced qualitatively similar results, however, application of 25 nM SPARC impaired neuronal adhesion to the collagen substrate, resulting in a low number of recordings ($n=6$). In this condition one third of recorded neurons did not show neurotransmission,

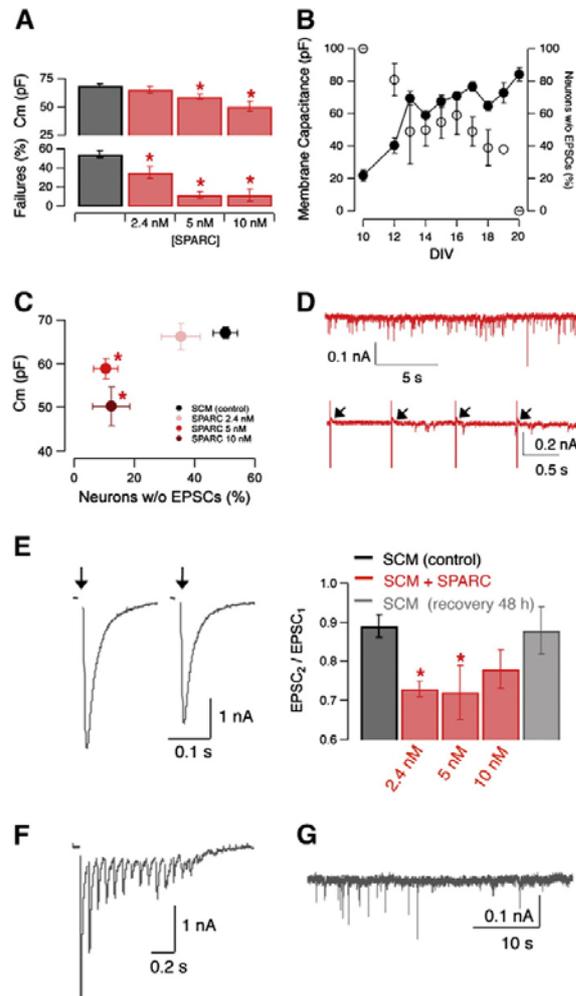


Fig. 8. Concentration dependent effects of SPARC on synaptic activity. A) Effect of [SPARC] ranging from 2.4 nM to 10 nM on membrane capacitance and the proportion of microcultures failing to display autaptic neurotransmission ($p < 0.05$). B) Membrane capacitance (dots) and proportion of control SCMs failing to display neurotransmission (open circles) plotted as a function of culture time, expressed in days in vitro, (D.I.V.). C) Relationship between membrane capacitance and SCMs failing to display neurotransmission found between 14 and 18 D.I.V. D) Recordings from a 14 D.I.V. neuron treated with 10 nM SPARC. Notice the high frequency of mEPSCs (up) but the failure to evoke neurotransmission (arrows, down). E) Paired pulse depression for a obtained at 1 s interval, in a neuron cultured for 16 D.I.V. 48 h after SPARC removal. Average values are indicated on the right. F) High frequency trains recovered their control profile after removing SPARC from culture medium (compare to Figs. 4C and 5A). G) The frequency of mEPSCs was below 1 Hz, 48 h after SPARC removal.

membrane capacitance was small, 54 ± 3 pF, and paired pulse depression for a 1 s interval was 0.81 ± 0.06 . Higher [SPARC] were not tested.

Development of cholinergic autaptic neurotransmission in vitro followed a characteristic time-course related to membrane capacitance. In agreement to previous works (Saadat et al., 1989) nicotinic EPSCs and spontaneous neurotransmission were detected in ~40–50% of neurons when membrane capacitance reached a 60–70 pF plateau after 13 D.I.V. (Fig. 8B). The relationship between membrane capacitance and the proportion of microcultures showing functional autapses showed the involvement of SPARC in synaptogenesis. This matricellular protein promoted more efficient formation of cholinergic autapses (Fig. 8C),

without significantly affecting the overall number of synaptic contacts (Figs. 5D and E).

Further evidence was supported by the enhancement of spontaneous activity (Fig. 3A), which is a hallmark of synapse formation in developing microcultures (Ullian et al., 2004). The experiment of a SCM exposed to 10 nM SPARC for 14 D.I.V. (Fig. 8D), reinforced this possibility. This particular cell displayed the characteristic high mEPSC frequency of SPARC treated neurons (compare to Fig. 3A) in the absence of evoked neurotransmission, which was suggestive of non-fully developed synaptic terminals. Poor coupling among voltage gated calcium channels and synaptic vesicles in ill-formed contacts could explain an increase of non-synchronous release of neurotransmitters.

Since the expression levels of SPARC decrease during development, it was necessary to test what were the effects of removing the matricellular protein from the culture medium. Cultures treated with SPARC for 16–18 D.I.V. were changed for 48 h to control conditions. As a result, paired pulse ratio for stimuli delivered at 1 s interval was 0.88 ± 0.06 ($n = 7$), undistinguishable from control SCMs (Fig. 8E). High frequency trains showed a depletion ratio of 0.18 ± 0.04 ($n = 7$), non significantly different from control SCMs ($p = 0.3$, Fig. 8F). And finally, mEPSC frequency was of 0.33 ± 0.09 ($n = 7$), again comparable to control neurons (Fig. 8G).

Discussion

By mimicking a peak of SPARC production in cholinergic neuronal microcultures developed in the absence of glia, we demonstrate that this matricellular protein arrests presynaptic terminals to a stage characterized by a high release probability, a small RRP size and an overall decrease of synaptic vesicles, which are three characteristic features of immature synapses (Mozhayeva et al., 2002). These synaptic properties of SPARC are related to secretion of the molecule during central and peripheral nervous system development (Vincent et al., 2008), possibly suiting presynaptic terminals to the initial periods of neural circuit formation. In central synapses maturation of presynaptic terminals is designed to decrease release probability of neurotransmitters, resulting in an improved temporal processing of signals (Feldmeyer and Radnikow, 2009). A high release probability and a small RRP size would thus guarantee an efficient synaptic transmission with a limited capacity to information processing.

Our results support the composition of the extracellular matrix, and particularly, individual concentrations of matricellular proteins, as determinants of presynaptic function in developing and stable synapses. Comparison of the actions described for SPARC to thrombospondin, show both matricellular proteins are involved in synaptogenesis but to a different extent. While the action of thrombospondin is set to increase the number of ultrastructurally normal but postsynaptic silent excitatory synapses (Christopherson et al., 2005), SPARC function appears to be diverse. Its ability to enhance spontaneous activity and to increase the number of microcultures showing functional autapses, suggests is one among other factors secreted by glia favouring synapse formation. Recently it has been described that both thrombospondin and hevin promote establishment of synaptic contacts in retinal ganglion cells, being the action of hevin antagonized by SPARC (Kucukdereli et al., 2011). Our finding that cholinergic synapses are more efficiently formed in the presence of SPARC, stays in contrast to this observation, suggesting that the type of synapse involved is possibly a key determinant on the action of matricellular proteins. In this regard, thrombospondin does not promote formation of gabaergic synapses (Hughes et al., 2010). Noticeably, what appears to be the distinctive action of SPARC in our experimental conditions, setting synaptic contacts to an immature phenotype, agrees to findings obtained in glutamatergic synapses formed by retinal ganglion cells (Kucukdereli et al., 2011). Altogether these evidences demonstrate that SPARC is a glial secreted molecule able to modify synaptic activity, albeit its specific action is likely influenced by the particular composition of the extracellular matrix around synaptic types.

Although SPARC mediated effects are particularly relevant to presynaptic terminals, the analysis of spontaneous events suggests changes are also occurring at the postsynaptic level. Synapses developed in the presence of SPARC show mEPSCs with a faster decay phase, likely associated to an alteration in the molecular composition of nicotinic receptors. This change could be mediated by integrins, as described for AMPA receptors in glutamergic synapses (Jones et al., 2011). The capacity of integrins to interact with SPARC and acting as transducers of the extracellular matrix, suggests a putative role for these membrane receptors in the described presynaptic effects. Three evidences in support of this possibility are: *i*) $\alpha 3$ -integrin forms a complex with presynaptic voltage gated calcium channels that binds active zone and cytoskeletal proteins in nicotinic synapses of Torpedo electric organ (Carlson et al., 2010), *ii*) $\alpha 3\beta 1$ integrin complexes are widely present in the superior cervical ganglion (DeFreitas et al., 1995), and *iii*) SPARC interacts with integrin $\beta 1$ heterodimers (Weaver et al., 2008). How integrin receptors could affect to the organization of vesicle pools is unknown. Nonetheless, the role of presynaptic actin, which interacts with integrin receptors and is key to the organization of synaptic of vesicle pools (Pechstein and Shupliakov, 2010; Sakaba and Neher, 2003), should be explored because SPARC modifies the actin cytoskeleton of cultured endothelial cells (Murphy-Ullrich et al., 1995).

Finally, the ability of SPARC to act on stable synapses, could be required for particular events beyond development, such as synaptic remodelling after an injury, because the production of this matricellular protein is upregulated following tissue damage in the cortex (Mendis et al., 1998) or the olfactory bulb (Au et al., 2007). Glial cells could use the ability of SPARC setting synapses to an immature stage by generating a transient, favourable niche for establishing and/or consolidating new synaptic contacts. Although our results might suggest such action, this possibility still remains speculative.

Experimental methods

Cell culture and transfection experiments

Experimental procedures were approved by the Department of Environment from the Generalitat de Catalunya and registered under DMAH #5131. Single Cell Microcultures from Superior Cervical Ganglion (SCG) neurons were prepared following the method previously described using P0–P2 Sprague–Dawley rats (Perez-Gonzalez et al., 2008). Briefly, medium containing all dissociated cells was placed in a 100 mm diameter culture dish for 90 min at 37 °C. At the end of this pre-plate period $\geq 95\%$ of non-neuronal cells were found adhered to the dish but most neurons remained in suspension. Medium was then collected and neurons seeded at 2500 cells \cdot ml⁻¹ on 15 mm coverslips containing 10–20 collagen microdrops 100–400 μ m diameter (see Supplementary Fig.2 for details on the density of microislands). Culture medium was DMEM/F12 [1:1] containing 2.5% foetal bovine serum, 2.5% rat serum (prepared in the animal care facility of the University of Barcelona), 3–5 nM NGF, 2 nM CNTF (Alomone labs, Israel) and 25 U/ml penicillin/streptomycin at 37 °C and 8% CO₂. In the indicated experiments mouse recombinant SPARC (R&D Systems, Minneapolis, US) was added at 0.24 nM, 2.4 nM, 5 nM, 10 nM or 25 nM.

Peripheral glial cells were cultured from dissociated superior cervical ganglia in DMEM/F12 [1:1] containing 5% foetal bovine serum and 100 U/ml penicillin/streptomycin at 37 °C and 8% CO₂. When confluence was >75% cells were changed to serum free medium as described in (Ullian et al., 2004) but without BSA and maintained for 8 days. At the end of this period, medium was collected and concentrated using 10 kDa Amicon Ultra filter units (Millipore) to study SPARC production by western-blot and ELISA (see below). The identity of peripheral glial cells was checked by their positive staining for S100 β (Perez-Gonzalez et al., 2008). Neuronal and peripheral glial cell cultures were established in 12-well dishes.

Rat SPARC cloned into pCMV-SPORT6 was obtained from Invitrogen (ID: 5621666). To achieve local secretion of SPARC on stable synapses, COS-7 cells were transfected with two separate plasmids, SPARC and GFP at 4:1 ratio using lipofectamine. The proportion of cells showing fluorescence was $\sim 20\%$. The number of COS-7 cells expressing GFP after being transferred to a microculture typically ranged from 0 to 8. To visualize the intracellular distribution of SPARC, a SPARC-GFP construct was created by inserting rat SPARC in pEGFP-N1. After lipofectamine transfection $\sim 50\%$ of COS-7 cells and $\sim 2\%$ of cultured peripheral glial cells displayed a punctate fluorescence, suggesting the presence of the construct in vesicular structures (Figs. 2C and D). COS-7 cells were seeded in 12-well dishes and grown in serum free conditions to investigate SPARC production.

Electrophysiological recordings

All experiments were carried out in the whole-cell configuration of patch-clamp using neurons microcultured for 14–18 days in vitro (D.I.V.), a period when neurotransmission showed a similar profile (see also Fig. 8C). This time window was selected because: *i*) synaptic transmission was never observed before 10 D.I.V. (Perez-Gonzalez et al., 2008), *ii*) neurons displayed a comparable somatic surface, presenting an average capacitance of 67 ± 2 pF ($n = 386$) and *iii*) synaptic potency, paired pulse plasticity and the size of the RRP showed similar values. Typical resistances of pipettes used for recordings were 3–4 M Ω when filled with internal solution, whose composition was (in mM): 130 K-Gluconate, 4 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 3 Na₂ATP, 1 NaGTP, pH = 7.2, 290 mOsm/kg. In some experiments (Fig. 7A), 0.5 mM Alexa Fluor 555 hydrazide (Invitrogen) was added to the internal solution to trace neuronal morphology. External solution contained in mM: 130 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES-Hemisodium salt and 10 Glucose, pH = 7.4. The final CaCl₂ concentration was always achieved by dilution from a 1 M stock solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, US), and otherwise stated was 2 mM. All salts and dynasore were from Sigma-Aldrich, (St. Louis, US). Before the addition of glucose and CaCl₂, the osmolality of the external solution was adjusted to 290 mOsm/kg. All experiments were performed at room temperature (20–23 °C).

Recordings were made using Axopatch-200B and Axopatch-1D patch clamp amplifiers (Molecular Devices, CA), under the control of ITC-18 boards (Instrutech, NY) driven by WCP software (Dr. John Dempster, University of Strathclyde, http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page.php?page=software_ses). Neurons were clamped at -60 mV and stimulated by a 1–2 ms depolarization step that drove membrane potential to 0 mV. Time interval between repeated stimuli was always ≥ 30 s.

Analysis of electrophysiological data

Analysis was performed by custom made macros written in Igor Pro software 6.0 (Wavemetrics, OR). Neurons used in each experimental group came from six or more different cultures, depending on the condition. Calculation of RRP size from 14 Hz trains was carried out following the method described elsewhere (Perez-Gonzalez et al., 2008; Sakaba et al., 2002). The RRP size, expressed in pA, corresponded to the intercept on the ordinates axes of a linear fit to the steady-state phase of the cumulative plot of currents. Measurements of the RRP size were also done by local application of a hypertonic sucrose solution (500 mOsm/kg). RRP estimates obtained by this methodology, were larger than those calculated by high frequency stimulation. Both methods were linearly related ($r = 0.96$), by a factor of 2.6 (see also Ikeda and Bekkers, 2009).

Recovery from paired pulse depression was analysed by fitting exponential functions. The decision between single and double exponential fits was made by visual inspection followed by comparison of residuals. A further criterion before accepting the need for a double

exponential over a single was that the two time constants should differ by more than one order of magnitude (Figs. 3E and 7F).

Immunocytochemistry and antibodies

Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100. The following dilutions of primary antibodies were used: S100 β (Dako, 1:1000), Synaptophysin (Synaptic Systems, 1:500) and Bassoon (Assay Designs, 1:1000). Overnight incubation with primary antibodies at 4°C, was followed by staining with secondary antibodies labelled with Alexa-488 and Alexa-555 (Invitrogen, 1:500).

Determination of SPARC concentration in supernatants

Production of SPARC was revealed by western blot analysis using a polyclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, AF942) at 1:500 dilution that identified a single band at ~40 kDa (Figs. 2A and 7B). Mouse recombinant SPARC was used as a positive control in all assays. To quantify protein concentrations in cell culture supernatants, indirect ELISA was performed using the above-mentioned SPARC polyclonal antibody at 1:500 dilution.

Correlative electrophysiology and confocal microscopy

At the end of a recording episode neurons were micrographed, fixed in paraformaldehyde 4% and stained for bassoon and synaptophysin. Quantification of presynaptic terminals contacting the soma was performed by Image J analysis of confocal sections. A synapse was defined as a round structure, where the two markers colocalized, with an apparent area of 0.3 to 3 μm^2 and spanning 3 to 5 confocal sections (~0.9–1.5 μm). The procedure was the following (see Fig. 5C): first, the somatic region was established from the D.I.C. image. After removal of background staining, maximum intensity projections were merged, thresholded and analysed within the defined region. Identified ROIs within the somatic surface were checked in each section of the stack, and those falling within the established criteria were counted as synapses.

Correlative electrophysiology and electron microscopy

After obtaining an estimate of paired pulse plasticity (Fig. 9A), neurons grown in thermanox coverslips (Nalgene) were micrographed (Fig. 9B) and fixed for 2 h at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde. To avoid an excessive depletion of vesicle pools, a minimal number of stimulation protocols were delivered (typically less than 5 paired pulse recordings). Fixed cells were washed in PB 0.1% and a region of interest was drawn with a razor blade around the recorded microculture for subsequent identification. Microcultures were then post-fixed with 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide, dehydrated and embedded in spurr resin. The area containing the recorded neuron was cut and embedded facing a spurr capsule. The remaining coverslip bit was removed and the recorded neuronal microculture identified in the resin block (Fig. 9C), before proceeding with semi-thin (Fig. 9D) and ultra-thin en-face sections using a Reichert-Jung Ultracut E microtome. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in a Jeol 1010 electron microscope. Low magnification images confirmed the identity of the neuron (Fig. 9E). Quantification of vesicle numbers and locations were calculated in micrographs obtained at 80–150 K magnification. Synaptic vesicles were considered docked when distance to the plasma membrane could not be resolved. To illustrate vesicle distributions relative to active zones, reconstruction of two sections of the same postsynaptic density was performed using Reconstruct software (Fiala, 2005).

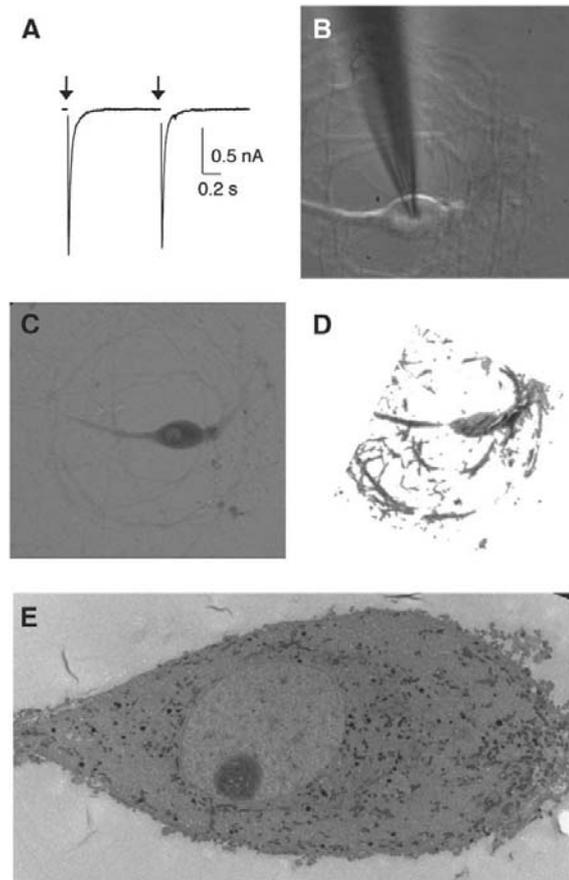


Fig. 9. Correlative electrophysiology and electron microscopy. Illustrative example of the method used to perform correlative electrophysiology and electron microscopy experiments. A) Paired pulse plasticity was assayed in a SCM by delivering two pulses at 1 s interval. B) Neuron was micrographed at the end of electrophysiological experiments. C) The recorded cell was fixed and identified in a spurr block. D) Semi-thin section of the recorded neuron. E) Low magnification image showing the soma of the studied neuron.

Statistical analysis

Data from averages are always expressed as mean \pm s.e.m. For statistical analysis, groups were compared using unpaired two-tailed Student's *t*-test. When comparing more than two groups ANOVA analysis with Bonferroni post-test was used. Significance level was set at $p < 0.05$.

Estimation of SPARC concentration in the neuroglial space upon release from a single vesicle

To obtain an estimate for [SPARC] achieved in the neuroglial space after release from a single vesicle, a model was designed starting from the second Fick's law of diffusion, which describes the time dependence of the (one dimensional) concentration gradient:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1)$$

Here *c* denotes the concentration, *t* time, *D* is the proportionality constant (termed diffusion coefficient) and *x* is the space coordinate. The transformation to spherical coordinates yields the following

equation, considering diffusion is constant and not to be dependent on the angle (radial diffusion, i.e. $\partial c/\partial\phi = \partial c/\partial\theta = 0$):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left[\frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} + \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} \right]. \quad (2)$$

On the bases of previous approaches dealing with similar questions (i.e. estimation of the glutamate concentration in the synaptic cleft), it was assumed release of SPARC molecules to the neuroglial space behaved effectively as diffusion from a point source into an infinite medium (Barbour and Häusser, 1997). The solution $c(r,t)$ of Fick's second law for a point source of molecules in an infinite three dimensional volume is as follows:

$$c(r,t) = \frac{M}{8(\pi Dt)^{3/2}} \cdot e^{-\frac{r^2}{4Dt}}. \quad (3)$$

Here M denotes the amount of protein being released from the point source (i.e. SPARC copies in a vesicle expressed in mol). Considering molecules cannot diffuse back into the cell, as they are hindered by the cell membrane, Eq. (3) needs to be multiplied by 2 to account for molecules being dispersed away from the vesicle towards the surrounding neuronal membrane (here considered as an infinite plane). We also introduce a factor of 10^{-3} , to change the unit of c from mol/m^3 to mol/l , which is more frequently used.

$$c(r,t) = \frac{M}{4 \cdot 10^3 (\pi Dt)^{3/2}} \cdot e^{-\frac{r^2}{4Dt}}. \quad (4)$$

To calculate the maximum distance where a certain concentration is reached regardless of time, it is first required to identify the point in time, when for a given distance r , concentration will reach its maximum. For this purpose, setting $\partial c/\partial t = 0$ and solving the equation to t , yields the time when concentration is at its peak:

$$t_{c=\max} = \frac{r^2}{6D}. \quad (5)$$

Inserting Eq. (5) in Eq. (4) gives:

$$c_{\max}(r) = \frac{M}{4000 \cdot r^3} \cdot \left(\frac{6}{\pi e} \right)^{\frac{3}{2}}. \quad (6)$$

Rearranging Eq. (6) to r provides:

$$r_{\max}(c) = \left(\frac{M}{4000 \cdot c} \right)^{\frac{1}{3}} \cdot \sqrt{\frac{6}{\pi e}}. \quad (7)$$

Considering glial cells engulf synaptic terminals and neuronal membranes, it is assumed all SPARC molecules would be released onto a flat neuronal surface. On these bases, all points on the surface plane, whose distance to the point source are equal or less than r_{\max} are considered part of the covered surface. This area is described by a circle with the radius $r = \sqrt{r_{\max}^2 - d^2}$. As the surface A of a circle with radius r equals $\pi \cdot r^2$, this gives

$$A_{\text{covered,flat}} = \pi \cdot (r_{\max}^2 - d^2). \quad (8)$$

Thus, the neuronal surface covered at a given concentration by release of SPARC from a single vesicle was estimated by first calculating r_{\max} from Eq. (7) for a range of concentrations between c_{\min} and c_{\max} . Placing the resulting r_{\max} values in Eq. (8) provided the surface covered

by SPARC for a particular concentration range. To build the plot shown in Fig. 2F, c_{\min} was set to 1 nM and c_{\max} to 1 μM .

Author contributions

D.A, F.L, A.P., G.L. and C.S. collected, analysed and interpreted data. A.L. designed, performed and analysed experiments, wrote the paper.

Acknowledgements

This work was supported by grant SAF2009-07620 to A.L. We thank Dr. Nuria Camarero for generating the SPARC-GFP construct, Serveis Científicòtics-UB for their help with optical and electron microscopy and Dr. Leon Lagnado for critically reading the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.mcn.2012.01.005.

References

- Au, E., Richter, M., Vincent, A., Tetzlaff, W., Aebersold, R., Sage, E., Roskams, A., 2007. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J. Neurosci.* 27, 7208–7221.
- Barbour, B., Häusser, M., 1997. Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends Neurosci.* 20, 377–384.
- Carlson, S.S., Valdez, G., Sanes, J.R., 2010. Presynaptic calcium channels and $\alpha 3$ -integrins are complexed with synaptic cleft laminins, cytoskeletal elements and active zone components. *J. Neurochem.* 115, 654–666.
- Christopherson, K., Ullian, E., Stokes, C., Muldowney, C., Hell, J., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D., Bornstein, P., Barres, B., 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433.
- Clements, J., Silver, R., 2000. Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci.* 23, 105–113.
- David, R., Ciurazkiewicz, A., Simeone, X., Orr-Urtreger, A., Papke, R.L., McIntosh, J.M., Huck, S., Scholze, P., 2010. Biochemical and functional properties of distinct nicotinic acetylcholine receptors in the superior cervical ganglion of mice with targeted deletions of nAChR subunit genes. *Eur. J. Neurosci.* 31, 978–993.
- DeFreitas, M.F., Yoshida, C.K., Frazier, W.A., Mendrick, D.L., Kypta, R.M., Reichardt, L.F., 1995. Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron* 15, 333–343.
- Eroglu, C., 2009. The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 167–176.
- Feldmeyer, D., Radnikow, G., 2009. Developmental alterations in the functional properties of excitatory neocortical synapses. *J. Physiol.* 587, 1889–1896.
- Fiala, J.C., 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* 218, 52–61.
- Furshpan, E., Landis, S., Matsumoto, S., Potter, D., 1986. Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J. Neurosci.* 6, 1061–1079.
- Gilmour, D., Lyon, G., Carlton, M., Sanes, J., Cunningham, J., Anderson, J., Hogan, B., Evans, M., Colledge, W., 1998. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J.* 17, 1860–1870.
- Hohenester, E., Sasaki, T., Giudici, C., Farnedale, R., Bächinger, H., 2008. Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18273–18277.
- Hughes, E., Elmariah, S., Balice-Gordon, R., 2010. Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 136–145.
- Ikeda, K., Bekkers, J., 2009. Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2945–2950.
- Jones, E.V., Bernardinelli, Y., Tse, Y.C., Chierzi, S., Wong, T.P., Murai, K.K., 2011. Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions. *J. Neurosci.* 31, 4154–4165.
- Kucukdereli, H., Allen, N.J., Lee, A.T., Feng, A., Ozlu, M.L., Conatser, L.M., Chakraborty, C., Workman, G., Weaver, M., Sage, E.H., Barres, B.A., Eroglu, C., 2011. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (32), E440–E449.
- Lisman, J.E., Raghavachari, S., Tsien, R.W., 2007. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 597–609.
- Liu, X., Ying, G., Wang, W., Dong, J., Wang, Y., Ni, Z., Zhou, C., 2005. Entorhinal deafferentation induces upregulation of SPARC in the mouse hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 141, 58–65.
- McKinnon, P., McLaughlin, S., Kapsetaki, M., Margolskee, R., 2000. Extracellular matrix-associated protein Sc1 is not essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 20, 656–660.

- Mendis, D., Brown, I., 1994. Expression of the gene encoding the extracellular matrix glycoprotein SPARC in the developing and adult mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24, 11–19.
- Mendis, D., Malaval, L., Brown, I., 1995. SPARC, an extracellular matrix glycoprotein containing the follistatin module, is expressed by astrocytes in synaptic enriched regions of the adult brain. *Brain Res.* 676, 69–79.
- Mendis, D.B., Ivy, G.O., Brown, I.R., 1998. SPARC/osteonectin mRNA is induced in blood vessels following injury to the adult rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 23, 1117–1123.
- Mozhayeva, M.G., Sara, Y., Liu, X., Kavalali, E.T., 2002. Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 22, 654–665.
- Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallero, M.A., Sage, E.H., 1995. SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca²⁺-binding EF-hand. *J. Cell. Biochem.* 57, 341–350.
- Newton, A.J., Kirchhausen, T., Murthy, V.N., 2006. Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17955–17960.
- Pechstein, A., Shupliakov, O., 2010. Taking a back seat: synaptic vesicle clustering in presynaptic terminals. *Front. Synaptic Neurosci.* 2, 143.
- Perez-Gonzalez, A., Albrecht, D., Blasi, J., Llobet, A., 2008. Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses. *J. Physiol.* 586, 4675–4691.
- Petzold, C., Albeanu, D., Sato, T., Murthy, V., 2008. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 58, 897–910.
- Pfrieger, F., 2010. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res. Rev.* 63, 39–46.
- Rees, R.P., Bunge, M.B., Bunge, R.P., 1976. Morphological changes in the neuritic growth cone and target neuron during synaptic junction development in culture. *J. Cell Biol.* 68, 240–263.
- Robitaille, R., 1998. Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21, 847–855.
- Rubin, E., 1985. Development of the rat superior cervical ganglion: initial stages of synapse formation. *J. Neurosci.* 5, 697–704.
- Saadat, S., Sendtner, M., Rohrer, H., 1989. Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* 108, 1807–1816.
- Sakaba, T., Neher, E., 2003. Involvement of actin polymerization in vesicle recruitment at the calyx of Held synapse. *J. Neurosci.* 23, 837–846.
- Sakaba, T., Schneggenburger, R., Neher, E., 2002. Estimation of quantal parameters at the calyx of Held synapse. *Neurosci. Res.* 44, 343–356.
- Schikorski, T., Stevens, C.F., 2001. Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat. Neurosci.* 4, 391–395.
- Schummers, J., Yu, H., Sur, M., 2008. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320, 1638–1643.
- Ullian, E., Harris, B., Wu, A., Chan, J., Barres, B., 2004. Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 241–251.
- Ulrich, D., Lüscher, H., 1993. Miniature excitatory synaptic currents corrected for dendritic cable properties reveal quantal size and variance. *J. Neurophysiol.* 69, 1769–1773.
- Ventura, R., Harris, K.M., 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 6897–6906.
- Vincent, A., Lau, P., Roskams, A., 2008. SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system. *Dev. Dyn.* 237, 1449–1462.
- von Gersdorff, H., Vardi, E., Matthews, G., Sterling, P., 1996. Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16, 1221–1227.
- Weaver, M.S., Workman, G., Sage, E.H., 2008. The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 22826–22837.
- Zucker, R., Regehr, W., 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.

AGRADECIMIENTOS

“Un hombre de noble corazón irá muy lejos, guiado por la palabra gentil de una mujer”.

Goethe

AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas comienzo a escribir el último apartado de mi tesis doctoral, me parece increíble estar terminando uno de mis sueños, pero como dice el refrán: “No hay plazo que no se cumpla, ni deuda que no se pague”, por eso quiero pagar con mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible culminar esta etapa, que son tantas que no sé ni por dónde empezar!

En primer lugar quiero agradecer al *Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge* (IDIBELL) por la confianza y el respaldo que me ha dado otorgándome una beca para realizar el doctorado. En segundo lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Artur Llobet, por darme la oportunidad de desarrollarme como investigador, por las enseñanzas y los consejos, y por cómo vive y transmite la ciencia, que motiva e impulsa la curiosidad científica con cada nuevo resultado y con cada nuevo desafío. Muchas gracias!

Al Dr. Carles Solsona, por la invitación a la entrevista con la cual todo comenzó, por compartir su experiencia de vida, por la ayuda, los consejos y las conversaciones con las cuales he aprendido mucho de ciencia, de España y de Catalunya. A la Dra. Mireia Martín Satué por su gran disposición a ayudarme cuando me acercaba con alguna duda y por la paciencia que ha tenido mientras me iniciaba en el mundo de las prácticas. Al Dr. Joan Blasi por estar siempre dispuesto a resolver las dudas prácticas y existenciales al momento de hacer un protocolo, y por las otras también! Muchas gracias por todas las conversaciones que hemos tenido y por toda la ayuda prestada, que no ha sido poca.

Inma, quiero darte las gracias por toda la asistencia procurada en todo este tiempo, por enseñarme mientras daba los primeros pasos en el laboratorio y por la alegría que nos regalas cada día! Al Benja, perdón, al Dr. Benjamín Torrejón, quien entre risas y risas me ha mostrado cómo manejar el microscopio confocal, gracias por los buenos momentos!

A mis compañeros y amigos del laboratorio, a los del 4112, 4143 y 4145, con quienes he compartido momentos inolvidables, han sido como una familia para mí durante todos estos años. A Anna Priscilla, porque me ha ayudado siempre desde el primer momento, me ha transmitido su entusiasmo por la electrofisiología y por Catalunya, muchas gracias por tu amistad! David, eres una gran persona con mucho talento y con muchas experiencias por compartir, espero verlas publicadas continuamente, tú sabes. Esther, es poco el tiempo que hemos compartido pero de

buena calidad, muchas gracias por los ánimos y las tiras cómicas, no sabes cuánto me han ayudado! Helenica!, Helenica! Eres un crack, lo supe desde el primer momento en que te vi aparecer como un torbellino y más cuando cogiste el primer *Xenopus*, contigo he aprendido a entender el “catalán-metralleta”, gracias por tu simpatía, por tu cariño y por toda la energía que nos transmites dentro y fuera de laboratorio. Fran, súper Fran!, cómo ha cambiado mi vida desde que apareciste... por fin alguien que se riera con mis chistes malos, gracias por todos los cafés y birritas, por las conversas y el cariño, y a tirar para adelante que ahora el poder de los microcultivos es tuyo!. Anica, cuantos años juntos y cuantas charlas, eres una gran amiga y una gran investigadora, ánimos en esta última etapa de tu tesis, quién sabe si en una de esas terminamos trabajando en ciudades cercanas, qué ilusión me haría!. Cris, Ool.leeee! eres una persona muy amena, contigo no hay tiempo para aburrirse y eso se agradece mucho! Eli, es un placer tenerte como compañera de laboratorio y como amiga y muchas felicidades por tu piso nuevo! A los “nuevos” que ya no están en el laboratorio: a Rafa por tu sentido del humor característico y por ser tan buena gente y a Xavi, por tu amistad y simpatía, muchas gracias! Jony, no creas que me he olvidado de ti, de mi maestro del *western blot*, *dot blot* y otras tantas técnicas, qué paciencia has tenido conmigo, eres un santo! Gracias por aguantarme y aconsejarme durante todo este tiempo y gracias por las lecciones de piano... HHAAaaaaa!

A los “viejos” del laboratorio, Saqui y Laura por recibirme con alegría y por compartir buenos momentos juntos. A los amigos “del pasillo”: Alejandro, Xavi, Tanit, Sonia, Joan, Diana, Gloria, Andy, Laura, Miguel, Gemma y todos con quienes cruzo un saludo y que hacen que las travesías entre laboratorios y centrifugas sean más entretenidas.

A los de la 5º, Al Dr. Pau Gorostiza y a la Dra. Ana Méndez, a María Isabel, Santi, Natalia, Silvia por la compañía y consejos durante los seminarios de cada semana y por dedicarme un tiempo cada vez que podían. A Mercè, por tu optimismo y alegría inacabables, por aguantarme los lunes “de madrugada” mientras hacíamos los cultivos de cromafines, a la vez que entablábamos nuestra amistad, muchas felicidades por tu publicación y continúa así, que estoy seguro que llegarás muy lejos!

Quiero agradecer también a todo el personal de los servicios científicos técnicos de la UB con quien me ha tocado trabajar: María Calvo, Esther, Eva, Nuria Cortadelas, Almudena; al personal del estabulario de Bellvitge: Álvaro, Pedro, Pilar. Vuestra ayuda ha sido fundamental en mi proceso de aprendizaje.

Finalmente quiero agradecer a la persona más importante en mi vida, quien me ha acompañado desinteresadamente en todo este camino, quien me ha dado su apoyo incondicional y todo su cariño. Muchas gracias Fabi por ser como eres, por estar a mi lado a cada momento, por animarme cuando más lo necesitaba, sin ti nada sería lo mismo... porque somos un equipo!.

Por último, quiero hacer más las palabras de Gustavo Cerati (cantautor argentino):

“GRACIAS..... TOTALES!!!”