



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Optimización de la metodología para la identificación del
secretoma de los astrocitos cerebrales.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Sanchez Marco, Mercedes

Tutor/a: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Cotutor/a externo: MIRA APARICIO, HELENA

Director/a Experimental: CASARES CRESPO, LUCIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (UPV)

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL (ETSIAMN)

OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SECRETOMA DE LOS ASTROCITOS CEREBRALES

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

curso 2022/2023

Autora: Dña. Mercedes Sánchez Marco
Directora, tutora externa: Dña. Helena Mira Aparicio
Cotutora externa colaboradora: Dña. Lucía Casares Crespo
Tutora académica: Prof. Dña. Rosa Caridad Porcel Roldán

València, junio del 2023



RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Título: OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SECRETOMA DE LOS ASTROCITOS CEREBRALES

Resumen:

Los astrocitos juegan un papel esencial en la regulación del número de sinapsis y la conectividad y función sináptica durante el desarrollo y en el cerebro adulto. Esto se logra a través de factores proteicos que liberan a su entorno. Curiosamente, los cambios en la expresión génica a nivel de mRNA no siempre se correlacionan con los cambios de proteínas, ni con los niveles de proteínas secretadas. Por lo tanto, para estudiar la identidad de las proteínas secretadas por los astrocitos o “secretoma de astrocitos”, es obligatorio establecer cultivos celulares de astrocitos que mantengan las propiedades funcionales de los mismos y simultáneamente permitan recolectar medio condicionado de astrocitos (ACM) para efectuar análisis proteómicos. En este proyecto, se han optimizado los procedimientos necesarios para el análisis proteómico del ACM. Se han aislado astrocitos de cerebro de ratón empleando una estrategia basada en la expresión en la superficie celular del marcador de astrocitos ACSA-2, y también se han diferenciado astrocitos a partir de cultivos de células madre neurales de ratón. Se han crecido los astrocitos en un medio definido libre de suero y se han optimizado las condiciones de cultivo para la recolección del ACM en un medio mínimo. También se ha optimizado la concentración de ACM utilizando concentradores de proteínas por centrifugación.

Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: Salud y bienestar (ODS3), Educación de calidad (ODS4), Igualdad de género (ODS5) y Trabajo docente y Crecimiento económico (ODS8).

Palabras clave: astrocito; ACM; secretoma; NSCs; sinapsis

Autora: Dña. Mercedes Sánchez Marco

Directora, tutora externa: Dña. Helena Mira Aparicio

Cotutora externa colaboradora: Dña. Lucía Casares Crespo

Tutora académica: Prof. Dña. Rosa Caridad Porcel Roldán

València, junio del 2023



ABSTRACT AND KEY WORDS

Title: OPTIMIZATION OF THE METHODOLOGY FOR BRAIN ASTROCYTE SECRETOME IDENTIFICATION

Abstract:

Astrocytes play essential roles in regulating synapse numbers and synaptic connectivity and function during development and in the adult brain. This is achieved through secreted factors that are released to their surrounding. Interestingly, changes in gene expression at the mRNA level do not always correlate with protein changes or to the levels of secreted proteins. Therefore, to study the identity of the astrocyte secreted proteins or “astrocyte secretome”, it is mandatory to establish astrocyte cell cultures that maintain the astrocytic functional properties and at the same time allow to collect astrocyte conditioned medium (ACM) for proteomic analysis. In this project, the procedures for the proteomic analysis of ACM have been optimized. Astrocytes have been isolated from mouse brain employing a procedure based on the cell surface expression of the astrocyte marker ACSA-2, and astrocytes have also been differentiated from mouse neural stem cells cultures. Astrocytes have been grown *in vitro* in defined serum-free medium and culture conditions have been optimized for ACM collection in minimal medium. The concentration of ACM has also been optimized using centrifugal protein concentrators.

This work relates to the following SDGs of the 2030 Agenda: Health and Well-being (SDG3), Quality Education (SDG4), Gender Equality (SDG5) and Teachers' Work and Economic Growth (SDG8).

Key words: astrocyte; ACM; secretome; NSCs; synapse

Author: Miss. Mercedes Sánchez Marco

Director, external tutor: Ms. Helena Mira Aparicio

External collaborating tutor: Ms. Lucía Casares Crespo

Academic tutor: Prof. Ms. Rosa Caridad Porcel Roldán

Valencia, June 2023



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Helena la oportunidad que me dió para poder conocer un poco más de cerca su laboratorio, y aprender tanto sobre un tema que me apasiona. Ha sido todo un placer formar parte de tu grupo durante este tiempo.

También agradecer a Lucía y Carmina todo el esfuerzo que han puesto en enseñarme lo máximo posible, y en recibirme cada día con una sonrisa; ha sido una suerte poder estar con gente tan amable y cercana. Y también al resto de compañeros, por crear un ambiente laboral tan cómodo y hacer que tenga ganas de ir al laboratorio cada día .

Me gustaría también mencionar a Rosa, por ser tan próxima y atenta, por responder a tantas preguntas en momentos de estrés, y por lo dispuesta a ayudarme que ha estado siempre. Y a Rafa, quien me hace disfrutar de lo bonita que es la vida cuando la compartes con gente como él.

Por último, agradecer a mi familia lo mucho que me apoyan y motivan a seguir, ellos no saben que son el motor principal de mis ganas de moverme y avanzar. No alcanzan las palabras para describir lo afortunada que me siento con vosotros, sobre todo contigo Hugo.

ÍNDICE TEMÁTICO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Aproximación <i>in vitro</i>	6
3.1.1. Cultivo de NSCs y astrocitos	6
3.1.2. Generación de ACM.....	8
3.1.3. <i>Western Blot</i> (WB).....	8
3.1.4 Inmunocitoquímica	10
3.2. Aproximación <i>in vivo</i>	12
3.2.1 Aislamiento y cultivo de astrocitos	12
3.2.2. Generación de Medio condicionado por astrocitos (ACM)	13
3.2.3. Espectrometría de masas	14
3.2.4. RT-qPCR.....	14
3.2.5 Inmunocitoquímica	16
4. RESULTADOS	16
4.1. Establecimiento de un sistema <i>in vitro</i> para obtener astrocitos y ACM a partir de NSCs hipocampales	16
4.1.1. Ensayos de caracterización de astrocitos diferenciados <i>in vitro</i> a partir de NSCs	17
4.1.2. Optimización de la obtención de ACM para su posterior análisis.....	22
4.2. Establecimiento de un cultivo primario de astrocitos hipocampales aislados de animales postnatales y obtención del ACM	23
4.2.1. Ensayos de caracterización de astrocitos procedentes del hipocampo de ratones postnatales	23
4.2.2. Caracterización mediante análisis del ACM por espectrometría de masas. 29	
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	32
6. CONCLUSIONES	35
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS O BIBLIOGRAFÍA	36
8. ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezclas de muestras para cargar en el gel.....	9
Tabla 2. Composición del gel y el <i>stacking</i> preparados.....	9
Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en el ensayo WB.....	10
Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en las pruebas de inmunocitoquímica.....	11
Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados en las pruebas de inmunocitoquímica..	11
Tabla 6. Mezclas enzimáticas empleadas para la disgregación del tejido.....	12
Tabla 7. Secuencias de los cebadores empleados en la qPCR en sentido 5'→3'	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Neurogénesis y gliogénesis hipocampal.....	2
Figura 2. Expresión de ACSA-2 a diferentes edades y en distintas regiones del cerebro	3
Figura 3. Condiciones específicas para la qPCR.....	15
Figura 4. Esquema por pasos de la aproximación <i>in vitro</i>	17
Figura 5. Imagen conseguida por microscopía en campo claro de las NSCs y de los AD11.....	17
Figura 6. Resultado del WB tras la incubación con los anticuerpos anti-GFAP y anti- β -actina.....	18
Figura 7. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores Nestina, GFAP y ATP1B2.....	20
Figura 8. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores S100 β , THBS1 y Ki67.....	21
Figura 9. Esquemización del aumento o disminución de la expresión de los distintos marcadores de estudio en las NSCs y los astrocitos	22
Figura 10. Esquema por pasos de la aproximación <i>in vivo</i>	23
Figura 11. Condiciones empleadas para el cultivo de los astrocitos (P10).....	24
Figura 12. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores Nestina, GFAP y ATP1B2.....	25
Figura 13. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores S100 β , THBS1 y Ki67.....	27
Figura 14. Análisis de los niveles de expresión de la fracción ACSA-2 positiva y ACSA-2 negativa de ratones P6 de los genes <i>Atp1b2</i> , <i>Nestina</i> , <i>Gfap</i> y <i>Thbs1</i> respecto al <i>housekeeping Sdha</i>	29
Figura 15. Resultado de la tinción con Coomassie Coloidal de la membrana de electroforesis (SDS-PAGE).....	30
Figura 16. Resultado tras la precipitación con acetonitrilo.....	31
Figura 17. Tinción con Coomassie para testar el contenido en BSA de los distintos medios que hay en el laboratorio.....	31

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACM	Medio condicionado por astrocitos
NSCs	Células Madre Neurales
AD11	Astrocitos diferenciados <i>in vitro</i> durante 11 días
SNC	Sistema nervioso central
FGFb	Factor de crecimiento Fibroblástico básico
EGF	Factor de crecimiento Epidérmico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
ACSA-2	Antígeno-2 de la superficie celular de los astrocitos
THBS1	Trombospondina 1
DG	Giro dentado
CA	Cornu ammonis
EC	Corteza entorrinal
ND	Trastornos del neurodesarrollo
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PDL	Poli-D-lisina
TB	Tampón de bloqueo
FBS	Suero bovino fetal
WB	<i>Western Blot</i>
MS	Espectrometría de masas
P (6-10)	Postnatal de 6 a 10 días
CD1	Línea celular de ratones control -Crl:CD1 (ICR)
PM	Peso molecular
WT	<i>Wild type</i>
DIV	Días <i>in vitro</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
g	Constante de gravitación
APS	Persulfato amónico
TEMED	Tetrametiletilendiamina
PFA	Paraformaldehído
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
MACS	<i>Magnetic-activated Cell Sorting</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ODS	Objetivo de Desarrollo Sostenible
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

1. INTRODUCCIÓN

El hipocampo es una región del cerebro perteneciente al archicortex, y dividido en 4 subregiones, el giro dentado (DG), y el cornu ammonis 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3). Adicionalmente, esta estructura cerebral está organizada en múltiples capas, siendo estas el estrato oriens, el estrato piramidal, el estrato radiatum y el estrato molecular del CA1 en el hipocampo propiamente dicho, y luego el estrato molecular, el estrato granular y el hilus o capa polimórfica en el giro dentado (Kamsu *et al.*, 2013; Romani *et al.*, 2022). Las neuronas de los estratos piramidal y granular se encuentran conectadas por medio de un circuito trisináptico, el cual es la ruta principal del flujo de actividad a través del hipocampo. Este circuito está implicado en el procesamiento de la información, y consta de 3 sinapsis excitatorias glutamatérgicas (Corteza entorrinal (EC) capa II → DG → CA3 → CA1) (Stepan *et al.*, 2015). Además, se ha visto que existe una conectividad generalizada a lo largo del eje longitudinal que forma esta estructura (Knierim, 2015).

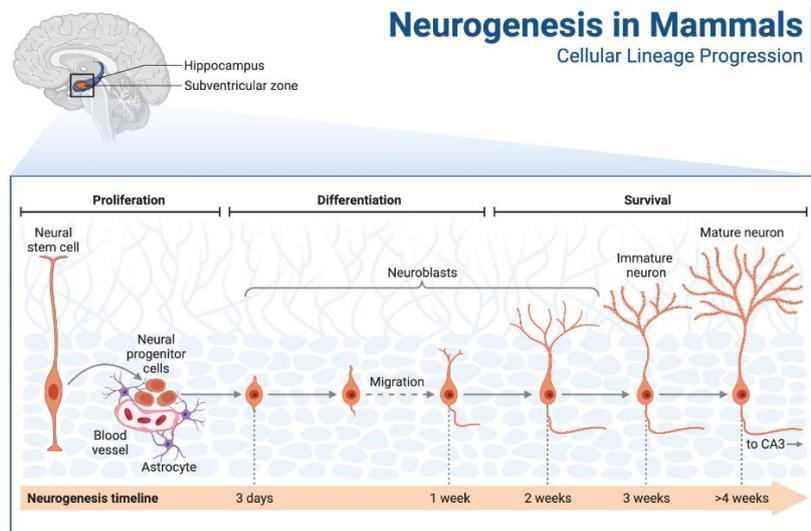
El hipocampo presenta un papel fundamental en diversas funciones como el aprendizaje y la memoria, y es capaz de regular otras como la emoción, el estrés, el miedo y la ansiedad. El hipocampo se emplea además como un modelo para el estudio de la neuroplasticidad, ya que presenta plasticidad sináptica, aunque ciertas condiciones como son el estrés crónico o el envejecimiento modifican la estructura y función del mismo, de manera que estas conducen a déficits cognitivos (Bartsch y Wulff, 2015). Esta plasticidad que presenta en general el sistema nervioso adulto, puesto que no es estático, posibilita la adaptación como respuesta a diferentes estímulos ambientales.

Es importante remarcar que el hipocampo contiene diversas poblaciones celulares, en concreto se han identificado células madre neurales (NSCs, del inglés *neural stem cells*), progenitores, neuronas inmaduras, neuronas excitadoras, neuronas inhibitorias, células de Cajal Retzius, astrocitos, células progenitoras de oligodendrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales (Zhong *et al.*, 2020). Concretamente en la zona subgranular de la circunvolución dentada es donde se ubican las NSCs, los progenitores y las neuronas inmaduras, pues es en esta zona donde se siguen generando nuevas neuronas, por la división de las NSCs y las células progenitoras, en los mamíferos adultos incluyendo los humanos, y esta capacidad para generar neuronas o “neurogénesis hipocampal adulta” se mantiene en el hipocampo adulto de por vida (Eriksson *et al.*, 1998). Este proceso de neurogénesis implica no solamente la proliferación de las NSCs y progenitores neurales, sino también su diferenciación, migración, supervivencia e integración en los circuitos hipocampales mediante la formación de sinapsis (Figura 1). Así pues, al ser el hipocampo una región involucrada en procesos de memoria y algunos comportamientos de tipo afectivo, la neurogénesis hipocampal adulta es de especial interés y contribuye de manera significativa en la enorme plasticidad comentada anteriormente (Kempermann *et al.*, 2015).

Para contextualizar el proyecto realizado, se van a destacar dos tipos celulares concretos del hipocampo. En primer lugar, las células madre neurales (NSCs), que están presentes tanto en el desarrollo, como en algunas regiones del sistema nervioso central (SNC) en el adulto (Ahmed, 2009), y que son capaces de generar todas las células neurales diferenciadas del SNC mediante distintos precursores intermedios, por lo que

estas células originan las neuronas (Figura 1,A) y la glía (Figura 1,B) de los mamíferos (Bergström y Forsberg-Nilsson, 2012).

A)



B)

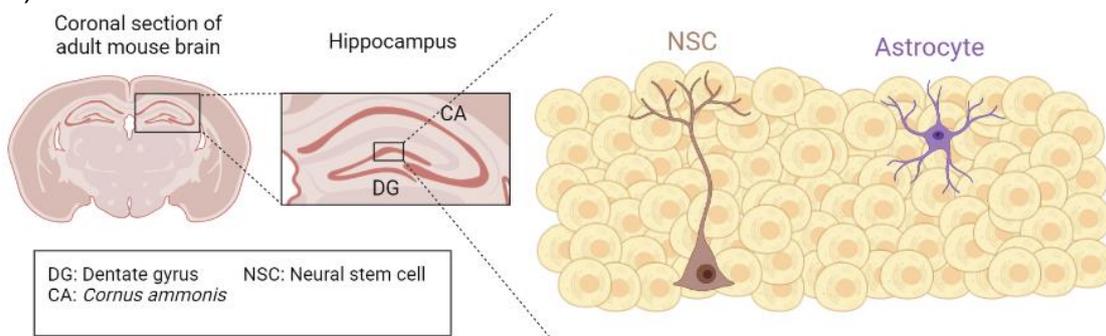


Figura 1. Neurogénesis y gliogénesis hipocampal. A. Neurogénesis hipocampal adulta en el giro dentado de los mamíferos. Este proceso abarca un periodo de unas 4 semanas, e incluye desde la generación de progenitores por parte de las NSCs, su proliferación, migración, supervivencia, maduración e integración en el circuito trisináptico hipocampal. Imagen tomada de BioRender.com. **B. Gliogénesis hipocampal y esquema de los tipos celulares de estudio,** creado en BioRender.com.

Y por otro lado, los astrocitos, los principales responsables de la homeostasis del SNC. Estos son uno de los tipos celulares más abundantes englobados en el término de “neuroglia” o “glia”, ya que son células de origen neuroepitelial (Escartin *et al.*, 2021). Los astrocitos se encuentran tanto en la médula espinal, como en la materia gris y blanca del cerebro, y son muy distintos entre ellos en cuanto a morfología, origen del desarrollo, perfil de expresión génica, propiedades fisiológicas, función y respuesta a lesiones y enfermedades (Zhang y Barres, 2010). A través de diferentes cascadas implicadas en la homeostasis tienen la capacidad de regular la creación, la maduración y la función de las redes neuronales, de manera que son importantes tanto en procesos de procesamiento de información y aprendizaje, como responsables de neuropatologías y de la astrogliosis protectora. Además, aportan a la barrera hematoencefálica, forman un sistema de drenaje “glinfático” del SNC, y también participan en la transmisión sináptica glutamatergica y γ -aminobutirato-érgica (los astrocitos contribuyen a la eliminación de neurotransmisores y a la creación y eliminación de sinapsis) (Khakh y Sofroniew, 2015).

Muchos trastornos neurológicos tienen una patogenia definida por la supresión o remodelación de esta función homeostática (Verkhratsky *et al.*, 2015), pero en el cerebro sano, los astrocitos respaldan al desarrollo neuronal, incluso mediante factores secretados (Caldwell *et al.*, 2022). Además, en el caso concreto del hipocampo, se sabe que los astrocitos liberan señales extrínsecas que regulan la neurogénesis adulta (Cope y Gould, 2019).

A través de análisis anatómicos, se ha observado que los astrocitos tienen diversas morfologías, lo que se traduce en diversidad y especializaciones funcionales. Estas diferencias morfológicas han sido estudiadas *in vivo* e *in vitro* (Raff *et al.*, 1983; Yong *et al.*, 1990; Bailey y Shipley, 1993). Por ejemplo, debido a diferencias morfológicas y de localización, los astrocitos pueden clasificarse en protoplásmicos y fibrosos (Khakh y Sofroniew, 2015). Además, estudios recientes de secuenciación de RNA de célula única indican una enorme heterogeneidad de los astrocitos también a nivel molecular. Esta heterogeneidad estructural y molecular presentada por los astrocitos puede ser de gran importancia en la región del hipocampo entre otras, puesto que es crítica para los comportamientos cognitivos y emocionales (Viana *et al.*, 2023).

Por otro lado, cabe destacar que los astrocitos presentan una serie de marcadores típicos que permiten su identificación. El primero es la proteína S100 β , que consiste en una proteína hélice-bucle-hélice y con un dominio de unión al calcio crucial, altamente expresada en astrocitos (Langeh y Singh, 2021).

El marcador de superficie celular ACSA-2 (del inglés, *astrocyte cell surface antigen-2*), característico de astrocitos y habitualmente empleado en los métodos de aislamiento y purificación de los mismos. La proteína asociada al antígeno ACSA-2 está codificada por el gen *Atp1b2*. La expresión de *Atp1b2* muestra el desarrollo de los astrocitos, y tal y como demuestran Batiuk *et al.* en su estudio del 2017, aumenta con los días en postnatales hasta alcanzar en la edad adulta un nivel estable y elevado, expresándose mucho en la mayoría de regiones del SNC (Figura 2).

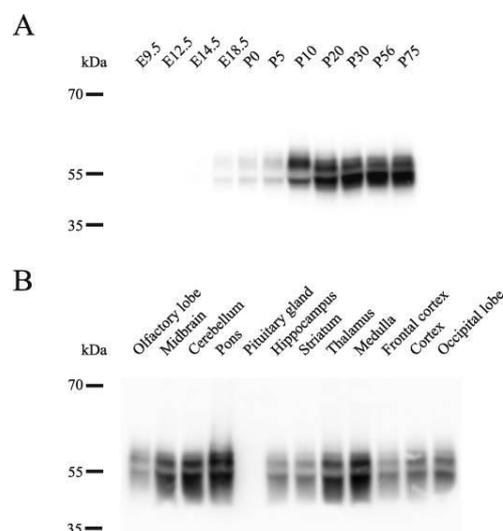


Figura 2. Expresión de ACSA-2 a diferentes edades y en distintas regiones del cerebro. Fuente: Batiuk *et al.*, 2017.

Otra de las proteínas empleada como marcador de astrocitos es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), una proteína de tipo III de los filamentos intermedios, relacionada con la estructura y función del citoesqueleto. A esta proteína se le atribuyen funciones muy importantes como la supresión de la proliferación neuronal y expansión de neuritas en el cerebro maduro, construcción de una barrera física para aislar el tejido lesionado, regulación tras la isquemia del flujo sanguíneo, aportación a la barrera hematoencefálica, suministro de fuerza mecánica y apoyo a la mielinización (Brenner, 2014). Finalmente, otra de las proteínas a destacar es la Ki67, que constituye un marcador nuclear de proliferación celular, de manera que se emplea como indicador de astrocitos proliferativos (Shoneye *et al.*, 2020).

Adicionalmente, es importante destacar un marcador también empleado en el flujo de trabajo, pero que se relaciona con las NSCs y con progenitores inmaduros, no con los astrocitos maduros, este es la Nestina. Esta es una proteína del filamento intermedio, y consiste en un marcador molecular de las células progenitoras del linaje neural. Se ha visto que esta es indispensable para la proliferación de estas células, puesto que promueve la activación de PI3K en respuesta a mitógenos factores de crecimiento (Xue y Yuan, 2010). Además, la pérdida de expresión de esta se relaciona, tanto *in vivo* como *in vitro*, como un evento temprano de diferenciación, y esta pérdida está regulada por Notch y controlada por la degradación del proteasoma (Mellodew *et al.*, 2004).

Como se ha comentado, los astrocitos juegan un papel esencial en la regulación de múltiples funciones del cerebro, incluyendo por ejemplo el control del número de sinapsis y la conectividad y función sináptica tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto, o también la propia neurogénesis adulta a distintos niveles. Esto se logra a través de la secreción de factores mayoritariamente proteicos a su entorno con capacidad de activar cascadas de señalización en las células circundantes. Para estudiar la identidad de las proteínas secretadas por los astrocitos o “secretoma de astrocitos” no es suficiente con efectuar análisis transcriptómicos, pues se ha visto que los cambios en la expresión génica a nivel de mRNA no siempre se correlacionan con los cambios de proteínas, ni con los niveles de proteínas secretadas. En un estudio muy reciente se ha visto que los cambios en el secretoma de los astrocitos se relacionan con la patología en diversos modelos genéticos de trastornos del neurodesarrollo (ND) (Rett, X frágil y síndrome de Down) (Caldwell *et al.*, 2022). Por lo tanto, no solamente los cambios intrínsecos en las neuronas generan trastornos en el neurodesarrollo, sino que cambios en las células gliales como los astrocitos también se ven involucrados (Blanco-Suárez *et al.*, 2017). En este caso, la contribución de los astrocitos a las enfermedades mencionadas es mediante la liberación alterada de factores secretados, a través de los cuales el desarrollo normal de las neuronas se ve modificado (atrofia en el crecimiento de las neuritas, reducción de sinapsis y espinas dendríticas inmaduras (Ballas *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2018); de forma que los factores secretados, liberados *in vitro* a los medios condicionados por astrocitos (ACM) son los que dictan el crecimiento, formación de sinapsis y supervivencia de las neuronas. El estudio de los cambios de expresión a nivel de proteínas y a nivel de proteínas secretadas se analizan por enfoques proteómicos, ya que no siempre se correlacionan con cambios en el mRNA (Meissner *et al.*, 2013). Es de gran importancia el estudio del secretoma de los

astrocitos, puesto que tras el análisis realizado por Caldwell *et al.* en el 2022, se ha observado que el 95% de las proteínas reguladas al alza en estos trastornos se encuentran fuera de la célula.

El secretoma se define como el conjunto de moléculas secretadas por las células vivas, de alta complejidad y abundancia, incluyendo también las que se desprenden de la superficie de las células, teniendo todas estas proteínas del secretoma un papel en la señalización, comunicación y migración celular (Makridakis y Vlahou, 2010). Para el estudio de las proteínas secretadas por los astrocitos se requiere la preparación de una muestra concentrada del denominado medio condicionado de astrocitos (ACM), a través del uso de medios mínimos, libres de otras proteínas contaminantes, para su condicionamiento. Esto permite la detección, en mezclas complejas, de proteínas de baja abundancia a través de espectrometría de masas (MS).

Puesto que las señales secretadas por los astrocitos son importantes para la sinapsis, el objetivo último es la identificación de aquellas proteínas liberadas que puedan ser de interés para las sinapsis hipocampales y/o para la regulación de la neurogénesis adulta. Son varias las proteínas reguladas al alza en la secreción por astrocitos de individuos con enfermedades del neurodesarrollo, entre ellas destacan Igfbp2 (que inhibe el crecimiento de las neuritas, ya que bloquea el IGF) y BMP6 (que induce la maduración estructural de los propios astrocitos), ambos tienen efectos negativos en el desarrollo neuronal, pero puede rescatarse antagonizando las funciones de estas proteínas (Caldwell *et al.*, 2022). En cambio, los astrocitos *Wild Type* (WT) presentan de manera abundante secreción y expresión de otras, como *Dbi* (que es un modulador de los receptores de GABA), *ApoE* (componente de las partículas lipídicas de los astrocitos) o *Sparc* (regulador negativo de la formación de sinapsis).

Por otro lado, una proteína de enorme importancia en el establecimiento de las sinapsis es la Trombospondina 1 (THBS1), glicoproteína multimérica y multidominio secretada por los astrocitos, que participa en las interacciones entre células y de las células con la matriz, y que promueve la sinaptogénesis, observando su contribución impulsando la neurogénesis (Park *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la THBS1 participa en el desarrollo y reparación del SNC después de una lesión, y que la introducción de esta proteína al ACM incrementa el número de sinapsis (Christopherson *et al.*, 2005).

Esta proteína se ha visto involucrada en enfermedades de patología sináptica como la esquizofrenia, por aumentar la susceptibilidad a sufrirla. Enfermedad en la cual también se observa una reducción de la GFAP, del marcador de astrocitos S100 β y del transportador de aminoácidos excitatorios 2 (EAAT2) (Park *et al.*, 2012). Cabe destacar que en un estudio no publicado del laboratorio se han identificado cambios en la expresión de *Thbs1* en astrocitos hipocampales ACSA-2⁺ durante el envejecimiento, siendo esta más abundante en animales jóvenes con respecto a los animales viejos.

Por otro lado, el aislamiento y cultivo de astrocitos hipocampales ACSA-2⁺ de animales es técnicamente más complejo, por el bajo rendimiento, que el cultivo de los astrocitos diferenciados *in vitro*. Durante el desarrollo hipocampal postnatal se observa un pico de formación de la glía, dado que las células astrogiales son fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de las neuronas y las redes neuronales, y se pueden

encontrar dos fenotipos astrogiales, dependiendo del momento del desarrollo, si es temprano (P1-P7) o tardío (P14-adulto) (Rurak *et al.*, 2022). Sobre el P7, la organización espacial de las células y los marcadores que expresan son distintas a los presentados en el estado adulto (Nicola *et al.*, 2015). Los astrocitos a edades cercanas a P7 son fáciles de cultivar, por lo que constituyen un buen modelo celular para optimizar la preparación del medio condicionado de cara al estudio del secretoma de astrocitos.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es establecer un flujo experimental que permita más adelante utilizar la espectrometría de masas y los enfoques proteómicos para identificar las proteínas secretadas por los astrocitos hipocampales de ratón.

Para ello, se han explorado dos opciones:

1. El establecimiento de un sistema *in vitro* para obtener astrocitos a partir de NSCs hipocampales, valorando el grado de diferenciación de los astrocitos y recogiendo y concentrando su medio condicionado.
2. El establecimiento de un cultivo primario de astrocitos hipocampales aislados de animales postnatales, ensayando distintos medios, valorando el grado de diferenciación de los astrocitos, y recogiendo y concentrando su medio condicionado.

A nivel metodológico, nuestro objetivo ha sido la caracterización de los cultivos celulares mediante diversas técnicas, como son la inmunocitoquímica, el WB y la qPCR, y la concentración del medio condicionado por centrifugación empleando columnas de ultrafiltración.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Aproximación *in vitro*

3.1.1. Cultivo de NSCs y astrocitos

Con el objetivo de la realización de los experimentos propuestos, se emplearon células madre neurales (NSCs) aisladas del hipocampo de ratones control -Crl:CD1 (ICR) (Charles River), denominadas NSCs CD1. Estas células madre se crecieron en el medio Neurobasal con diversos suplementos, concretamente, con un 2% de B27, un 1% de L-glutamina y un 0,5% de antibióticos penicilina + estreptomina (HyClone, SV30010) en un cultivo con condiciones estándar: 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. A continuación, se adicionaron respectivamente 20 ng/mL del mitógeno FGFb (ReproTech, 100-18B) y 10 ng/mL del mitógeno EGF (ReproTech, 100-47), para así permitir su proliferación y evitar su muerte. Las NSCs crecen en adherido en placas P100, por lo que, para ello, se hace un tratamiento previo de recubrimiento o *coating* a las placas con el fin último de conseguir la adhesión celular en la superficie. Así pues, para la realización del *coating* de las P100, estas se tratan con 10 µg/mL de poli-D-lisina

(PDL, Sigma, P6407) a 4 °C durante una noche y, al día siguiente, se realizan 3 lavados consecutivos con agua milliQ, y se tratan con 5 µg/mL de laminina (Sigma, L2020) a 37 °C durante 3h. Luego, se lavan de nuevo con tampón fosfato salino (PBS, Corning, 20-031-cv) 3 veces y así quedan listas para su uso.

El pase de las NSCs CD1 se realiza cada 3 días de incubación, tiempo en el que proliferan y se quedan adheridas a la placa. Así, en primer lugar, mediante la adición de 3 mL de tripsina (HyClone, SV30037.01) con una dilución 1:5 con PBS, se despegan las células de la superficie de la placa, y se recogen en un tubo de 15mL. Posteriormente, se adicionan 2 mL de medio para acabar de recolectar todas las células, ya que con este medio se frena la reacción, se neutraliza la solución y se evita la lisis celular. Una vez recogidas, el tubo es centrifugado a 100 g (g, constante de gravitación) en una centrífuga eppendorf y modelo Centrifuge 5804 R durante 5 minutos, del cual el sobrenadante se descarta y el pellet se resuspende con 1-2 mL de medio Neurobasal (dependiendo de la cantidad de pellet). Una vez hecho esto, se procede a su recuento con una cámara de Neubauer para su posterior siembra. Las células se diluyen 1:1 (volumen/volumen, v/v) con azul tripán al 0,1% en PBS y se procede a su contaje en el microscopio invertido en la cámara de Neubauer. Con este procedimiento, las células viables poseen color blanco y las muertas color azul, debido a que el colorante penetra en las células dañadas por no mantener la integridad de su membrana plasmática.

Finalmente, y sabiendo la cantidad de células vivas por mL, se realiza la siembra de nuevo en una P100. Se siembran 1.000.000 de células, así que se añade a la placa el volumen necesario para adicionar esta cantidad de NSCs CD1 y se completan los 8 mL de volumen con medio Neurobasal. Por último, se añaden los mitógenos, en este caso 8 µL de EGF y 16 µL de FGFb de los stocks para alcanzar las concentraciones finales mencionadas anteriormente.

Por otro lado, es necesaria la diferenciación de estas NSCs CD1 en astrocitos, ya que se requiere la recuperación del medio mínimo condicionado (ACM) de estos para los análisis siguientes. Así pues, esta diferenciación se consigue con la adición de un 5% de suero bovino fetal (FBS) al medio Neurobasal en placas P100 (con un volumen final de 8 mL) y la eliminación de los mitógenos. Esta placa se deja en el incubador unos 11 días hasta conseguir la diferenciación de las células madre neurales en astrocitos, y así poder empezar a recoger el ACM que producen. A diferencia de las NSCs, con los astrocitos no se hacen pases cada 3 días, si no que cada 4 días se cambia su medio, de forma que se aspira el que hay, se hacen 2 lavados de la placa con PBS y ya se adiciona medio Neurobasal fresco suplementado con FBS.

Además de las placas P100 para NSCs y diferenciación de astrocitos, también se hace la siembra de células madre en pocillos de una placa P24 con cristales para hacer un posterior análisis por inmunocitoquímica. En la mitad de pocillos se mantienen las células madre con mitógenos (20 ng/mL del mitógeno FGFb y 10 ng/mL del mitógeno EGF), y en los otros 4 se adiciona medio con FBS al 5%, para obtener astrocitos diferenciados a día 11.

3.1.2. Generación de ACM

A los 11 días los astrocitos ya están diferenciados, así que se quita el medio Neurobasal que hay en la placa, se realizan 3 lavados con PBS para quitar toda la proteína que pudiera quedar y se sustituye por 6 mL de medio de condicionamiento mínimo bajo en proteínas. Siguiendo el procedimiento empleado por Caldwell, *et al.* 2022, el medio mínimo contiene 97,75% NeuroMACS (Miltenyi Biotec), 1 mM de piruvato sódico, 0,5 mM de L-glutamina, 1% de antibióticos penicilina y estreptomycinina y 5 µg/mL de N-acetil-L-cisteína. Los astrocitos se dejaron en este medio durante 5 días en el incubador, en unas condiciones de 37 °C y un 5% de CO₂. Pasados estos días, se recogió el ACM de los astrocitos a día 16 (se consiguieron unos 4 mL ya que del volumen introducido inicialmente una parte se evaporó) y se pasó a su concentración.

La concentración del ACM se realiza con los concentradores centrífugos de Vivaspin 2, que tienen un corte de peso molecular (PM) de 3 kDa (Sartorius, VS0291). Estos concentradores aceptan un volumen máximo de 2 mL, así que la concentración se hizo en dos tandas consecutivas usando la misma columna. Primero, se equilibran las columnas (la de muestra y la empleada para compensar en la centrifuga) pasando 2 mL de agua desionizada y con una centrifugación de 30 minutos a 4 °C y 4000 g. A continuación, se concentra la muestra introduciendo 2 mL de ACM en la columna (2 veces para poder concentrar los 4 mL), y con una centrifugación de 75 minutos a 4 °C y 4000 g. Con las muestras concentradas y sin concentrar de ACM se evalúa la concentración de proteína mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, 500-0006) y se congelan a -20 °C para posibles análisis posteriores.

3.1.3. Western Blot (WB)

Esta técnica analítica es usualmente empleada para identificar proteínas específicas en una mezcla compuesta, y además, con el uso de una proteína *housekeeping* (que se expresa por igual en todas las células del organismo, ya que este nivel de expresión es necesario para el mantenimiento de la función celular) puede realizarse la cuantificación relativa de la proteína que se quiere estudiar. Este procedimiento se realiza con los astrocitos que estaban en la placa P100 de la cual se ha concentrado el medio condicionado, de forma que estos se lisan a día 16 (AD16) para hacer el WB, y por otro lado, la otra muestra empleada es la que se consigue con la lisis de las NSCs CD1 de la otra placa P100. El buffer de lisis empleado contenía TNE (Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,5) con 1% de Tritón X-100 (Sigma), 2 mM de Na₃VO₄(Sigma), 1 mM de NAF (Sigma), 1 mM de PMSF y 1X de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma). El buffer es preparado al momento y en frío, y se adicionan 400 µL de este en los tubos con el pellet de células (NSCs CD1 y AD16), luego se deja 15 minutos en hielo (haciendo un vórtex cada 5 minutos) y a continuación se pasa a la centrifuga en frío (4 °C) durante 15 minutos a 15800 g. Se descarta el pellet con los restos celulares y se selecciona el sobrenadante resultante que contiene las proteínas solubilizadas, y estas se cuantifican mediante el ensayo Bradford (comparando astrocitos y células madre neurales *in vitro*).

Se busca cargar el gel con una cantidad de 40 µg de proteína total en cada pocillo, por lo que se hace el cálculo de cuánto se debe adicionar de cada muestra y de TNE (Tabla 1).

Tabla 1. Mezclas de muestras para cargar en el gel.

	NSCs CD1	AD16
Volumen de muestra	3,25 μ L	65,195 μ L
TNE	61,75 μ L	/
TC 4x (240 mM Tris-HCl, 40% glicerol, 8% SDS, 0,004% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol, pH 6,8)	16,25 μ L	16,25 μ L
β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, M6250-100ML)	3,9 μ L	3,9 μ L

Por otro lado, para poder realizar la separación de proteínas correspondiente, se prepara un gel al 10% de acrilamida con dodecilsulfato sódico, SDS (Tabla 2) ya que, en este caso, las proteínas objetivo son la trombospondina (THBS1) de 70 kDa y la GFAP de 60 kDa, y este es un porcentaje que permite su resolución. Además, al tratarse de un gel desnaturizante, las proteínas se desplazan únicamente en función de su tamaño porque su relación carga/masa se iguala.

Tabla 2. Composición del gel y el *stacking* preparados.

	Gel separador al 10%	Gel concentrador <i>stacking</i>
H ₂ O	5 mL	3,25 mL
Tris-HCl (1,5M pH 8,8 gel, 0,5M pH 6,8 <i>stacking</i>)	2,5 mL	1,25 mL
Acrilamida 40% (thermo scientific, Acrylamide/Bisacrylamide Solution)	2,5 mL	0,5 mL
SDS 10%	100 μ L	50 μ L
APS persulfato sódico, APS	100 μ L	50 μ L
Tetrametiletilendiamina, TEMED (ROTH, 2367.3)	10 μ L	5 μ L

Después de dejar las muestras 5 minutos a 95 °C, se introducen en hielo, y seguidamente se cargan en el gel de forma individual en cada carril, correspondiendo al carril inicial el marcador de peso molecular 'Nzytech Marker II', a continuación, las muestras de las NSCs CD1 y por último la de los astrocitos AD16. La electroforesis se realiza a 120V hasta superar el *stacking* y luego a 150V, durante 1 hora y 15 minutos en tampón de electroforesis (0,25M Tris HCl, 0,2M glicina (Scharlau, AC04021000) y 3 mM SDS). Luego, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA85, 0,45 μ m, Whatman) con una corriente de 100V durante 1 hora y media, con la cubeta en hielo y con el tampón de transferencia (25mM Tris-HCl, 192mM glicina y 20% (v/v) methanol (VWR Chemicals, 20903.368). Y posteriormente, a modo de

comprobación, se adiciona Ponceau S (Sigma) para corroborar que la electroforesis y transferencia han sido correctas, y se elimina más tarde el producto mediante 3 lavados con T-TBS (20mM Tris-HCl, pH 7,6, 136 mM NaCl y 1% Tween-20) (todo en agitación).

El paso siguiente se corresponde con la incubación de la membrana con los anticuerpos, pero requiere un paso previo de bloqueo de la membrana con leche en polvo al 5%, durante 40 minutos, para eliminar los sitios inespecíficos que podrían interferir con la detección. Así, y con 3 lavados de T-TBS posteriores al bloqueo y de nuevo en agitación, ya pueden ser preparadas las bolsas donde se hará la incubación de la membrana con los anticuerpos primarios (Tabla 3) durante toda la noche, a 4 °C y en agitación.

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en el ensayo WB.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario
THBS1 mouse (Santa Cruz, sc-59887)	1:1000	anti-mouse verde (Invitrogen, A32789)
GFAP mouse (Sigma-Aldrich, G3893)	1:1000	anti-mouse verde (Invitrogen, A32789)
Beta-actina mouse (Sigma-Aldrich, A5441)	1:5000	anti-mouse verde (Invitrogen, A32789)

Al día siguiente se recupera el anticuerpo primario, seguidamente se realizan 3 lavados con T-TBS durante 10 minutos, y se incuba la membrana con el anticuerpo secundario durante una hora, en agitación y oscuridad. Tras este tiempo, se hacen 3 lavados más con T-TBS y se revela la membrana en un equipo de Odyssey Imager (Li-Cor). Todas las incubaciones y lavados hechos en el proceso se realizan en agitación. Para comprobar que la carga proteica es equivalente en ambas muestras, se usa como proteína control o *housekeeping* la β -actina.

3.1.4 Inmunocitoquímica

Las células son fijadas con PFA (paraformaldehído) al 2%, las NSCs CD1 a día 1 y los astrocitos diferenciados *in vitro* a día 11, y se almacenan en tampón fosfato (PB) con un 0.05% de azida para evitar contaminantes y un crecimiento indeseado de bacterias y hongos. Estos cristales se transfieren a una nueva placa para hacer las detecciones correspondientes y se lavan 3 veces durante 5 minutos con PB para eliminar los posibles restos de azida. Más tarde, se añaden 300 μ L de tampón de bloqueo (TB) con un 0,2 o un 0,5% de tritón X-100 durante 1 hora (dependiendo de dónde se localiza la proteína de interés). La función del TB es la de impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos empleados y que el marcaje sea óptimo, y con el tritón X-100 se permeabilizan las membranas celulares de forma que los anticuerpos pueden acceder al interior celular y llegar a su lugar de unión correcto atravesando la célula por los poros generados. Tras dejar actuar el TB, se pasa a la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 4), empleando 20 μ L de la mezcla en cada cristal, y dejando los cristales invertidos, con las células hacia abajo en contacto directo con los anticuerpos, en una placa grande cubierta con parafilm y manteniendo la humedad del interior, durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, la solución de anticuerpos primarios es recuperada y guardada, y los cristales son lavados de nuevo 3 veces, 5 minutos, con PB.

El paso siguiente es la incubación con los anticuerpos secundarios (Tabla 5), así pues, se añaden 250 μ L de esta solución a cada pocillo y estos actúan durante 1h en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PB, se realiza la tinción de los núcleos con 250 μ L de DAPI (a concentración 1:1000) durante 10 minutos, y después de retirarlo y volver a lavar los cristales, se adicionan 15 μ L del medio de montaje mowiol/Dabco (2,5% p/v) en el portaobjetos, ya que esta sustancia densa consigue el pegado del cristal en el portaobjetos y además preserva la fluorescencia. Finalmente, tras una noche a temperatura ambiente y en oscuridad, las células teñidas se visualizan en el microscopio confocal Leica SP8 a 40 aumentos (40x).

Se toman varias fotos de distintas zonas del cristal y en distintos planos, para más tarde hacer una cuantificación y representación estadística del número de células y los porcentajes de cada marcaje con anticuerpos. Para la visualización de las fotos y su recuento se utiliza la herramienta ImageJ del programa Fiji y el GraphPad Prism 8 para su representación y análisis estadístico.

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en las pruebas de inmunocitoquímica.

Anticuerpo primario I	marcaje	dilución
Nestina chicken (Aves Lab, NES)	células madre	1:500
GFAP mouse (SIGMA, G3893)	células madre y astrocitos	1:300
Atp1b2 rabbit (Alomine Labs, ANP-012)	membrana de los astrocitos	1:500
Anticuerpo primario II	marcaje	dilución
S100 β guinea pig (Synamptic System, 287004)	astrocitos	1:250
Ki67 rabbit (Abcam, ab15580)	proliferación	1:150
THBS1 mouse (Santa Cruz, sc-59887)	sinapsis	1:50

Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados en las pruebas de inmunocitoquímica.

Anticuerpo secundario I	fluorescencia	dilución
Alexa 488 anti-chicken (Jackson, 703-546-155)	verde	1:500
Alexa 555 anti-mouse (Invitrogen, A31570)	rojo	1:500
Alexa 647 anti-rabbit (Invitrogen, A31573)	rojo lejano	1:500
Anticuerpo secundario II	fluorescencia	dilución
Alexa 647 anti-guinea pig (Jackson, 706-605-148)	rojo lejano	1:500
Alexa 488 anti-rabbit (Invitrogen, A21206)	verde	1:500
Alexa 555 anti-mouse (Invitrogen, A31570)	rojo	1:500

3.2. Aproximación *in vivo*

3.2.1 Aislamiento y cultivo de astrocitos

Para la realización de los análisis propuestos, se emplean ratones postnatales de 6, 7 y 10 días de edad (P6 a P10), y se procede al aislamiento de los astrocitos procedentes del hipocampo y al posterior cultivo de los mismos. El primer paso es el recubrimiento de la placa de cultivo, con poli-L-lisina al 0,01% (P9155, Sigma) durante una noche a 37 °C y luego se hacen 3 lavados con agua bidestilada y se seca en condiciones estériles para su uso inmediato.

El siguiente paso es el aislamiento de los astrocitos siguiendo el Kit de disociación de tejido neural (P) (Miltenyi Biotec 130-092-628). Brevemente, en primer lugar se sacrifican los ratones postnatales, de forma que su cerebro puede ser extraído y los hipocampos se diseccionan en HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) frío (sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , Sigma-Aldrich 55021C), bajo un microscopio binocular. Luego se determina el peso del tejido en 1 mL del mismo HBSS y se transfieren 1950 μL de la mezcla enzimática 1 (Tabla 6) para hasta 400 mg de tejido a un tubo gentle MACS C (Miltenyi Biotec 130-093-237). El tejido es cortado en trozos pequeños con la ayuda de un bisturí y se transfiere el tejido al tubo C que contiene la mezcla enzimática 1. A continuación, se añaden 30 μL de la mezcla enzimática 2 (Tabla 6) al tubo C (es decir, en este caso, las enzimas empleadas son papaína y luego enzima A) y este tubo C es cerrado herméticamente y colocado boca abajo en la funda del disociador de tejidos (Miltenyi Biotec). El programa que se ejecuta es el 37C_NTDK_1 (es decir, se hace una disgregación tanto enzimática como mecánica) y una vez ha finalizado el programa, se separa el tubo C del disociador, y adicionalmente, se emplea una pipeta de vidrio flameada para disociar completamente el tejido. Luego, se aplican 10 mL de HBSS (con Ca^{2+} y Mg^{2+} , Sigma-Aldrich 55037C) en el tubo C y la suspensión celular a un MACS SmartStrainer (70 μm , Miltenyi Biotec 130-098-462) colocado en un tubo de 15 mL (el MACS SmartStrainer con tampón se humedece antes de utilizarlo). Posteriormente, se desecha el MACS SmartStrainer (70 μm), y se centrifuga la suspensión celular a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se aspira el sobrenadante completamente.

Tabla 6. Mezclas enzimáticas empleadas para la disgregación del tejido.

	Mezcla enzimática 1		Mezcla enzimática 2	
NTDK (P)	Enzyme P 50 μL	Buffer X 1900 μL	Buffer Y 20 μL	Enzyme A 10 μL

El tercer paso es el uso del Kit de MicroBeads Anti-ACSA-2 (Miltenyi Biotec 130-097-678) para aislar los astrocitos, de forma que se resuspende el pellet de células en 80 μL de tampón (PBS, pH 7,2, y 0,5% de albúmina sérica bovina (BSA) por 10^7 de células totales), se añaden 10 μL de reactivo de bloqueo de FcR por cada 10^7 de células totales y todo esto se mezcla bien sin agitar, y se deja incubar durante 10 minutos en el frigorífico (2-8 °C). A continuación se añaden 10 μL de Anti-ACSA-2 MicroBeads por cada 10^7 células totales, y de nuevo se vuelve a mezclar bien sin agitar, y se deja incubando durante 15 minutos en el frigorífico (2-8 °C). Luego se lavan las células

añadiendo 1-2 mL de tampón por cada 10^7 células y se centrifugan a 300 g durante 10 minutos, y se aspira el sobrenadante completamente. Después, en 500 μ L de tampón se resuspenden hasta 10^7 células y se coloca la columna MS (Miltenyi Biotec 130-042-201) en el campo magnético de un separador MACS adecuado (separación magnética de una población celular específica). Seguidamente, se prepara la columna equilibrándola con 500 μ L de tampón y se aplica en esta la suspensión celular, recogiendo el eluido que contiene las células no marcadas. Luego la columna es lavada con la cantidad adecuada de tampón ($3 \times 500 \mu$ L) y se recogen las células no marcadas que hayan pasado (estas se combinan con el eluido del paso anterior), esta es la fracción de células ACSA-2 negativas (los pasos de lavado se realizan añadiendo alícuotas de tampón tan pronto como se vacíe el depósito de la columna). Al final se retira la columna del separador y esta es colocada en un tubo de recogida adecuado (15 mL), se pipetea 1 mL de tampón en la columna e inmediatamente se vacían las células marcadas magnéticamente empujando firmemente el émbolo en la columna, siendo esta la fracción de células ACSA-2 positivas. Así pues, se determina el número de células (células ACSA-2⁺), en este caso mediante la cámara de Neubauer y se centrifuga la suspensión celular a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El cuarto y último paso para poder proceder a trabajar con estos astrocitos es el cultivo de los mismos. Para ello, se resuspenden las células ACSA-2⁺ y se ajustan a $5 \cdot 10^4$ - $8 \cdot 10^4$ células por 50 μ L de medio AstroMACS atemperado (Miltenyi Biotec 130-117-031) y se coloca una gota en el centro de cada pocillo. Esto se incuba durante 30 minutos a 37 °C. Luego se añaden a cada pocillo cuidadosamente 450 μ L del medio AstroMACS y se mantiene el cultivo sustituyendo el 50% del medio cada 2 días. El cultivo de P7 se mantuvo los 14 días con el medio AstroMACS, mientras que el cultivo de P10, a los 7 días *in vitro* el medio de cultivo se sustituyó por las distintas condiciones estudiadas. Todas tienen en común que están cultivadas en el MACS Neuro Medium (Miltenyi Biotec), pero adicionalmente, los P7 y P10 controles contienen un par de suplementos, el NeuroBrew21 (Miltenyi Biotec) y el AstroMACS supplement (Miltenyi Biotec), mientras que por otro lado, los P10 en medio mínimo además del MACS Neuro Medium contienen L-acetil-cisteína, Piruvato sódico, antibiótico, L-glutamina y los respectivos mitógenos si corresponden a las condiciones empleadas (10 ng/mL de FGFb o 5 ng/mL de EGF). A los 14 DIV, se fijó el cultivo con PFA al 2% durante 10 minutos.

3.2.2. Generación de ACM

Para la generación de ACM de los astrocitos postnatales P10 se emplean placas multipocillo P24. Para conseguir el volumen suficiente que se requiere en los posteriores análisis, la producción se realizó en dos tandas de 5 días cada una. De nuevo, se siguen los pasos realizados por Caldwell, *et al.* 2022.

A los 10 días se recoge el ACM mínimo y se pasa a la concentración del mismo mediante los concentradores centrífugos Vivaspin 2, siguiendo el mismo procedimiento que el explicado en el apartado 3.1.2, y en esta ocasión, al cuantificar la concentración del medio mediante ensayo Bradford y ver que hay suficiente proteína, el medio se congela y se lleva a realizar el análisis por espectrometría de masas.

3.2.3. Espectrometría de masas

Realizada por el Servicio de Proteómica de la Universitat de València. En primer lugar se corre un gel SDS-PAGE al 12%, cargando 10 µg de proteína del ACM en un pocillo, para corroborar que no haya ninguna contaminación, y luego se realiza una tinción del gel con Coomassie Coloidal. A continuación, se pasa al análisis de las proteínas contenidas en la muestra. Este proceso finalmente no consigue llevarse a cabo por la contaminación con BSA.

3.2.4. RT-qPCR

a) Extracción, cuantificación y medida de pureza de RNA.

Previamente, antes de la realización de la propia qPCR, se realiza la extracción de RNA a partir de los pellets de células positivas y ACSA-2 negativas de hipocampo de ratones P6, es decir, de los astrocitos por un lado, y de todas aquellas células que no son astrocitos por otro lado, estos últimos funcionan a modo de control para corroborar la especificidad de la expresión génica por parte de los astrocitos, para ello se emplea el *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare, UK) basado en el uso sucesivo de columnas de purificación.

Los pasos a seguir en la utilización de este kit consisten en, inicialmente, la homogeneización y lisis del cultivo celular con un pellet de hasta $5 \cdot 10^6$ células cultivadas, se centrifuga a 5000 g durante 1 minuto y se elimina el sobrenadante, luego el pellet es lavado con 500 µL de PBS, y de nuevo se centrifuga a 5000 g durante 1 minuto. Una vez se elimina el sobrenadante, se añaden 350 µL de solución de lisis y 3,5 µL de β-mercaptoetanol, de forma que con la ayuda de la pipeta se lisan las células directamente. Seguidamente, se pasa a la filtración, que reduce la viscosidad y aclara el lisado, y esta filtración se realiza mediante el *RNAspin Mini Filter*, que se coloca en un tubo colector y sobre él se aplica el lisado. Luego de una centrifugación de 1 minuto a 11000 g se descarta el *RNAspin Mini Filter* y se transfiere el filtrado, evitando aspirar cualquier pellet formado, a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL libre de RNAsas. A continuación, se ajustan las condiciones de unión del RNA, de manera que se añaden 350 µL de etanol al 70% y se mezcla con el vortex dos veces durante 5 segundos. Y una vez se han ajustado, se pasa a la unión del RNA, en la cual se comienza pipeteando arriba y abajo el lisado 3 veces y cargándolo en la columna de *RNAspin Mini Column*, después se centrifuga a 8000 g durante 30 segundos y se transfiere la columna a un nuevo tubo, para continuar con la desalinización, de manera que se añaden para este paso 350 µL de *desalting buffer* y se centrifuga a 11000 g durante 1 minuto para secar la membrana, descartando el fluido del tubo y colocando de nuevo la columna en él. Para seguir con el proceso, se realiza la digestión del DNA, con la preparación de la *DNase I reaction mixture* en un tubo de microcentrífuga estéril (contiene 10 µL de DNase I y 90 µL de *DNase reaction buffer*) y aplicando 95 µL de este directamente en el centro de la columna con membrana de sílice y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. El siguiente paso en el flujo de trabajo es la realización de 3 lavados y un secado; el primer lavado se realiza con la adición de 200 µL de *Wash Buffer I* a la *RNAspin Mini Column*, se centrifuga durante 1 minuto a 11000 g, y se cambia la columna a un nuevo tubo. El segundo lavado se da con la adición de 600 µL de *Wash Buffer II* a la *RNAspin Mini Column*, y se centrifuga durante 1 minuto a 11000 g, para descartar el fluido del tubo y volver a colocar en él la columna. Y el tercer lavado se consigue con la

adición de 250 μL de *Wash Buffer II* en la *RNAspin Mini Column* y la siguiente centrifugación de 2 minutos a 11000 g para conseguir que la membrana quede completamente seca, y se coloca la columna en un nuevo tubo, para finalmente acabar este proceso con la elución de RNA con 20 μL de H_2O libre de RNasas y una centrifugación de 1 minuto a 11000 g.

Una vez se ha conseguido extraer el RNA de las muestras, se mide la concentración y la pureza de cada una de ellas en el NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, United States), calculadas a partir de la absorbancia ofrecida por este espectrofotómetro. En cuanto a la calidad del RNA, esta se calcula gracias a los cocientes A260/A230 (que indica la cantidad de proteína en muestra, y debe ser mayor de 2) y A260/A280 (que indica presencia de fenoles, y este cociente debe estar entre 2 y 2,2).

b) RT

Se busca retrotranscribir el RNA de las muestras mediante una transcripción reversa (RT), y partiendo de la misma cantidad de RNA, a cDNA (con los reactivos del *PrimeScript RT reagent Kit*). Para ello se calcula qué cantidad de muestra hay que añadir en el mix para la RT buscando que la concentración en ambos casos sea igual (y la de mayor concentración por lo tanto se diluye en agua), siendo el contenido del mix, para 20 μL de volumen, 4 μL de *Buffer*, 0,5 μL de *Random Primers*, 0,5 μL de oligodT, 0,5 μL de Enzima y 14,5 μL de RNA (o RNA diluido en agua) para tener una concentración de 300 ng, para cada muestra. Una vez hecho el mix, se introducen las dos muestras en el termociclador, con una configuración de 1 ciclo a +37 °C durante 15 minutos y un segundo ciclo a +85 °C de 5 segundos.

c) qPCR

Finalmente, se realiza la PCR cuantitativa (qPCR) para conseguir ver la expresión génica de los astrocitos partiendo del cDNA equivalente a la retrotranscripción de 3 ng de RNA. Para esto, se emplea el equipo QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems, EE. UU.) y se ajustan las condiciones de duración y temperatura para cada ciclo (Figura 3).

<u>DES NATURALIZACIÓN INICIAL (1 CICLO)</u>		
95°C	10 minutos	1,6°C/seg
<u>CURVA DE AMPLIFICACIÓN (40 CICLOS)</u>		
95°C	15 segundos	1,6°C/seg
60-62°C	60 segundos	0,5°C/seg
<u>CURVA DE MELTING (1 CICLO)</u>		
95°C	15 segundos	1,6°C/seg
65-67°C	60 segundos	1,6°C/seg
95°C	15 segundos	0,1°C/seg
<u>EXTENSIÓN (1 CICLO)</u>		
60°C	15 segundos	1,6°C/seg

Figura 3. Condiciones específicas para la qPCR.

Previamente, se carga en la placa para la qPCR 8 μ L de mix *TB Green Premix Ex Taq* (Takara Bio, Japan), basado en agentes intercalantes fluorescentes que se unen al DNA de doble cadena, y 2 μ L de muestra, de manera ordenada. En este caso se realiza la amplificación de los genes *Sdha*, *Thbs1*, *Gfap*, *Nestina* y *Atp1b2*, para los dos tipos de muestra, y con 3 réplicas cada una. Esta placa, tapada herméticamente con film, es introducida en el equipo y tras 96 minutos, y con las condiciones indicadas anteriormente, se da la qPCR. Se emplea la expresión del gen *Sdha* como *housekeeping* para normalizar los datos de expresión (esta referencia se consigue con un gen que no varía en su expresión). Los cebadores empleados constan en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de los cebadores empleados en la qPCR en sentido 5'→3'.

Gen estudiado	cebador directo	cebador reverso
<i>Atp1b2 (ACSA-2)</i>	TGTGTTGGCAAGAGAGATGAAGA	GGGTCACATTCAGGAACCTTTACA
<i>Gfap</i>	CACCTACAGGAAATTGCTGGAGG	CCACGATGTTCTCTTGAGGTG
<i>Nestina</i>	CCTCCTGGAGGCTGAGAACTC	AAGGCTGGCACAGGTGTCTC
<i>Thbs1</i>	CAAGGGCTCAGGGATACTCA	TGAGACGCCATCTGTATGCA
<i>Sdha</i>	AGAGGACAACCTGGAGATGGCATT	AACTTGAGGCTCTGTCCACCAA

3.2.5 Inmunocitoquímica

Los astrocitos aislados del hipocampo de ratones P7 y P10 y fijados a día 14 *in vitro* son utilizados para inmunocitoquímica.

El proceso realizado y los anticuerpos empleados son los mismos que los descritos en el apartado 3.1.4, solamente varían las células y condiciones estudiadas.

4. RESULTADOS

4.1. Establecimiento de un sistema *in vitro* para obtener astrocitos y ACM a partir de NSCs hipocampales

La primera aproximación para lograr obtener medio condicionado de astrocitos que, posteriormente, permita identificar las proteínas secretadas por los astrocitos o secretoma, mediante técnicas proteómicas, ha consistido en poner a punto la diferenciación de astrocitos *in vitro* partiendo de cultivos de NSCs hipocampales.

Para ello, se expandió una línea de NSCs hipocampales originalmente aislada del hipocampo de animales control (CD1) *in vitro* empleando un medio definido suplementado con mitógenos (bFGF y EGF). Posteriormente, se sembraron NSCs de diferenciación sin mitógenos, suplementado con suero bovino fetal (FBS), para favorecer su diferenciación a astrocitos. A los 11 días, se compararon las dos

condiciones empleando una serie de técnicas complementarias (Figura 4) para verificar la obtención de los astrocitos diferenciados.

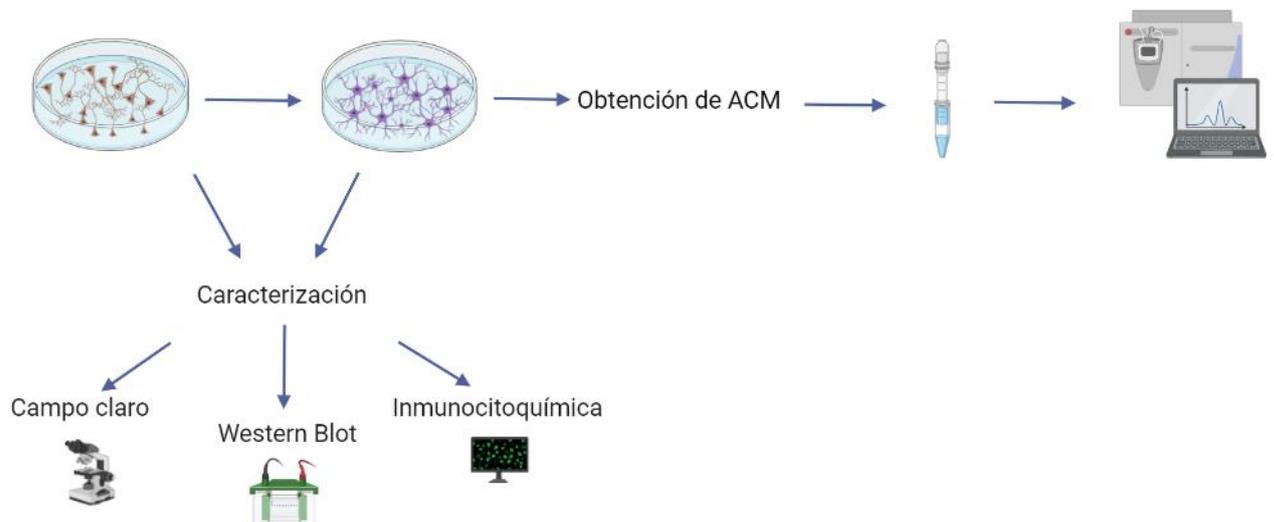


Figura 4. Esquema por pasos de la aproximación *in vitro*, desde el cultivo de NSCs y su diferenciación a astrocitos, y su caracterización, hasta la obtención y análisis del ACM.

4.1.1. Ensayos de caracterización de astrocitos diferenciados *in vitro* a partir de NSCs

La caracterización de los cultivos se realizó mediante microscopía en campo claro, WB e inmunofluorescencia. Se utilizaron en todo momento astrocitos diferenciados *in vitro* a partir de NSCs CD1 durante 11 días (AD11), realizando a su vez los mismos procedimientos en las NSCs para comparar las dos poblaciones celulares.

- *Caracterización mediante microscopía de campo claro*

Como primera aproximación, se observaron los cambios morfológicos de las células al microscopio de campo claro. Tal y como se muestra en la Figura 5, las NSCs son células de morfología elongada y aspecto refringente. En cambio, en las condiciones de siembra y crecimiento empleadas, las células diferenciadas a día 11 tienen una morfología distinta, siendo mucho más ramificadas y recubriendo casi por completo la superficie del pocillo a modo de monocapa. Esta morfología es compatible con la de un astrocito.

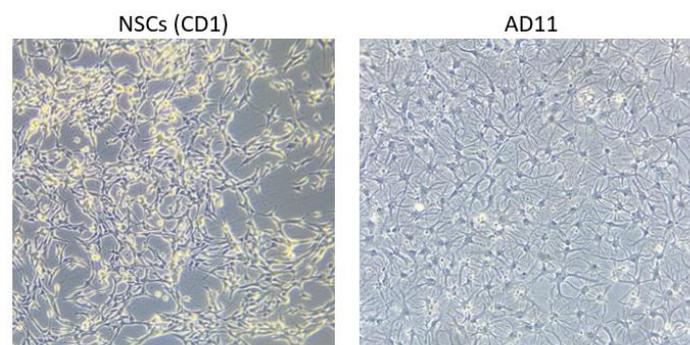


Figura 5. Imagen conseguida por microscopía en campo claro de las NSCs y de los AD11. La imagen de la izquierda muestra el aspecto típico de un cultivo de NSCs indiferenciadas, creciendo en un medio de proliferación con mitógenos, y la de la derecha el de un cultivo crecido durante 11 días *in vitro* en medio de diferenciación.

- *Caracterización mediante WB*

Para profundizar en la caracterización de estas células, se analizaron las diferencias de expresión de varios marcadores mediante extracción de proteínas de las muestras (NSCs y AD16) tras su lisis, separación electroforética en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE) y transferencia a membrana por WB.

Se empleó la tinción con Ponceau de la membrana para corroborar la presencia de proteína en los extractos celulares y verificar por un lado que la carga proteica era similar en todas las muestras y por otro que se habían transferido correctamente a la membrana (Figura 6.A).

Se empleó un anticuerpo que reconoce la proteína GFAP como marcador de diferenciación astrogliar. Por otro lado, se exploró la posible expresión de THBS1, como proteína sintetizada por los astrocitos implicada en la formación de las sinapsis neuronales, y la β -actina como control de carga. Los resultados de la Fig 6.B muestran la ausencia de GFAP en las NSCs en proliferación y la presencia de una banda a 60 kDa que corresponde a esta proteína a los 11 días *in vitro*, corroborando la diferenciación de las células a astrocitos.

Por otro lado, la banda de 48 kDa correspondiente a la β -actina se visualiza en ambos carriles por igual, corroborando que la carga proteica es equivalente. La THBS1 no se detectó mediante esta técnica en ninguna de las dos condiciones celulares (no mostrado).

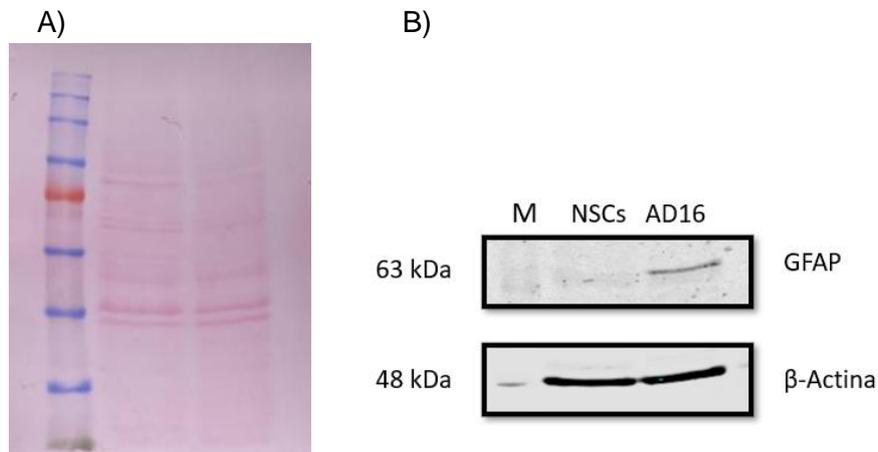


Figura 6. Resultado del WB tras la incubación con los anticuerpos anti-GFAP y anti- β -actina. A. La imagen de la izquierda muestra la tinción con Rojo de Ponceau tras efectuar la transferencia de las proteínas a la membrana. **B.** La imagen de la derecha muestra el resultado de revelar el WB con los anticuerpos que reconocen de manera específica las proteínas GFAP (marcador de astrocito) y β -actina (control de carga). M: marcador de peso molecular.

- *Caracterización mediante inmunocitoquímica*

Otra prueba empleada para tratar de caracterizar los astrocitos diferenciados *in vitro* a partir de NSCs fue la inmunocitoquímica. Para ello, las NSCs y los AD11 en sus respectivos pocillos fueron fijados con paraformaldehído y los cristales se transfirieron a una nueva placa, donde se realizó un tratamiento para el bloqueo de las uniones inespecíficas y a continuación las correspondientes incubaciones con los anticuerpos

primarios y secundarios seleccionados. Son diversos los marcadores que permiten la diferenciación de astrocitos maduros e inmaduros, y así caracterizarlos de manera adecuada, por lo que, se realizaron dos pruebas inmunocitoquímicas.

La primera de ellas empleó los anticuerpos primarios que detectan la Nestina (marcador de citoesqueleto de células madre y progenitores, también expresado por astrocitos no maduros), GFAP (marcador típico de astrocitos, citoplasmático, y también presente a niveles más bajos en las NSCs) y ATP1B2 (marcador de membrana específico de astrocitos). En la Figura 7 se muestra un panel representativo de la visualización por campos del resultado de la inmunocitoquímica y la cuantificación y análisis estadístico de la misma, en el que se representa el porcentaje de células del cultivo cuyos núcleos son DAPI positivos que también son positivas para Nestina, y a los DAPI positivos que también son positivos para GFAP.

Los porcentajes obtenidos tras la cuantificación son: un 84,7% de las NSCs y un 99,62% de las AD11 son Nestina⁺/DAPI⁺, mientras que un 92,48% de las NSCs y un 90,67% de las AD11 son GFAP⁺/DAPI⁺. Por tanto ambos tipos celulares presentan, en prácticamente todas las células viables, un marcaje con los anticuerpos empleados en casi la totalidad de las células. No obstante, a pesar de que por esta técnica no podemos corroborar el aumento de GFAP a nivel de proteína total detectado por WB, si apreciamos un claro cambio en la morfología de las células y en la distribución de la señal. Por otro lado, puesto que la Nestina es un marcador de célula indiferenciada, su expresión en AD11 indica que los astrocitos en este caso son inmaduros. Con respecto a la señal de ATP1B2, en las NSCs se observa una señal nuclear inespecífica y en los astrocitos se observa el marcaje citoplasmático esperado.

La segunda prueba inmunocitoquímica se realizó con los anticuerpos primarios contra S100 β (marcador típico de astrocitos), Ki67 (marcador de proliferación) y THBS1 (marcador de astrocito con capacidad de promover la formación de sinapsis), por lo que aporta otra información valiosa para la identificación y caracterización de las muestras. Para esta prueba, de nuevo se realizó un panel representativo, y una cuantificación y análisis estadístico, representando los DAPI positivos que también son positivos en Ki67. En cuanto a la THBS1, ninguna célula presente en las muestras (NSCs y AD11) es positiva para este marcador (Figura 8).

Tras este análisis, los porcentajes que se obtuvieron fueron los siguientes: un 10,6% de las NSCs y ninguna célula AD11 son Ki67⁺/DAPI⁺, mientras que ninguna es positiva para THBS1. El resultado observado de esta prueba inmunocitoquímica, por lo tanto, consiste en un claro marcaje de los astrocitos por S100 β en todas las células vivas, este marcador típico de astrocitos presenta el marcaje en el citoplasma y se produce en ellos de manera específica, mientras que en las NSCs donde no debería aparecer marca, sí aparece, pero consiste en una marca inespecífica y nuclear, además de poco intensa. El marcaje con Ki67 puede observarse únicamente en las NSCs, pero no en los astrocitos (ya diferenciados y por tanto no proliferativos). Y el marcador THBS1 no consigue visualizarse mediante análisis inmunocitoquímico (al igual que tampoco se conseguía mediante WB).

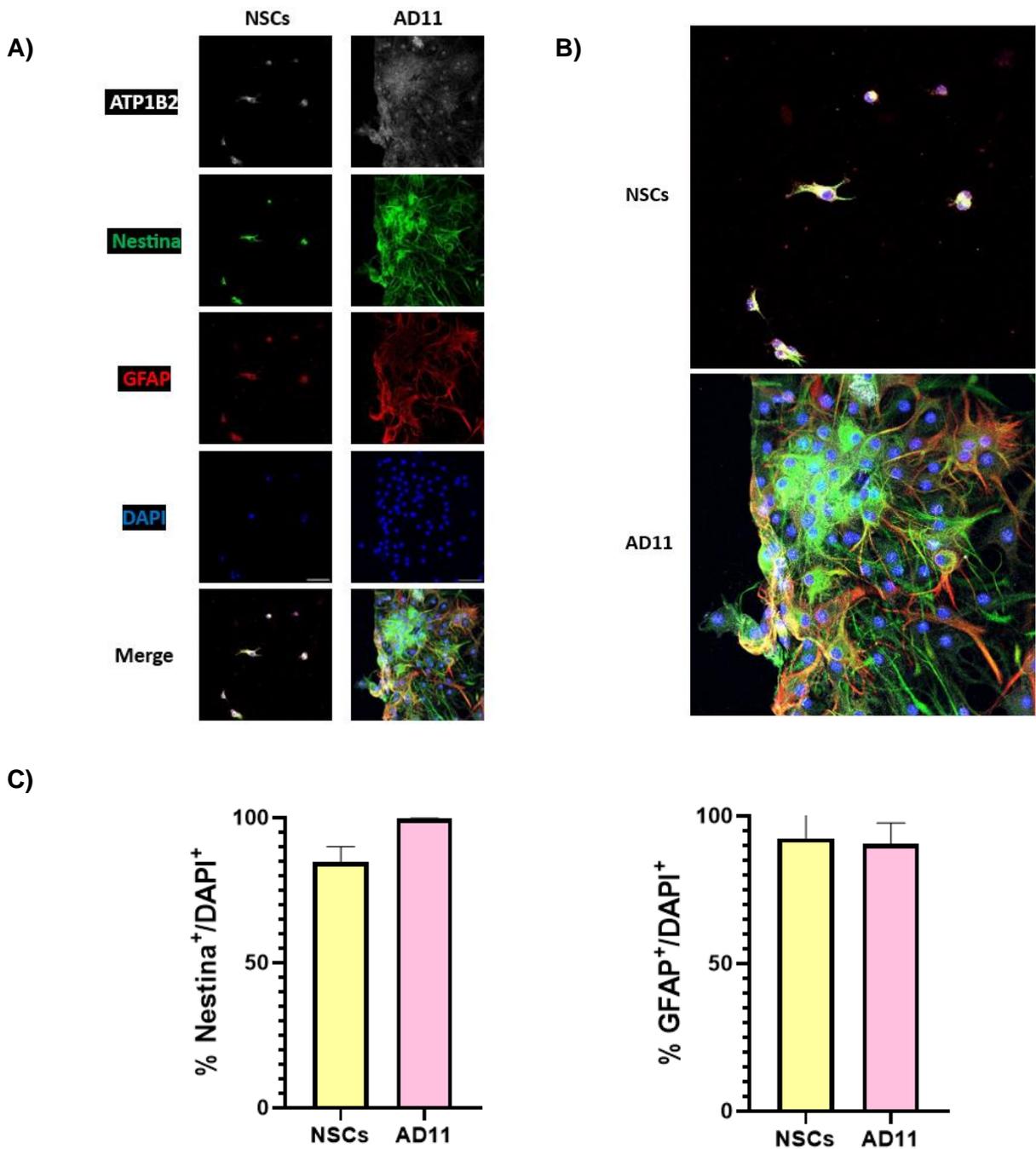


Figura 7. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores Nestina, GFAP y ATP1B2. A) Ensayo de inmunocitoquímica como valoración de la diferenciación a astroglia basada en niveles proteicos. Se emplean varios marcadores: DAPI para marcar los núcleos celulares, Nestina como marcador de NSCs y células inmaduras, ATP1B2 como marcador de astroglia y GFAP como marcador de ambas (aunque más expresado en astrocitos), pudiéndose analizar la diferenciación adquirida por las células. La escala, de 50 μ m, se presenta en la imagen de los DAPI. B) Ampliación de la imagen tomada visualizando todos los campos y marcadores simultáneamente, en ambas muestras. C) Cuantificación en base a los DAPI de células viables, de cada uno de los marcadores empleados, y representación estadística de los mismos, diferenciando ambas muestras (NSCs y AD11).

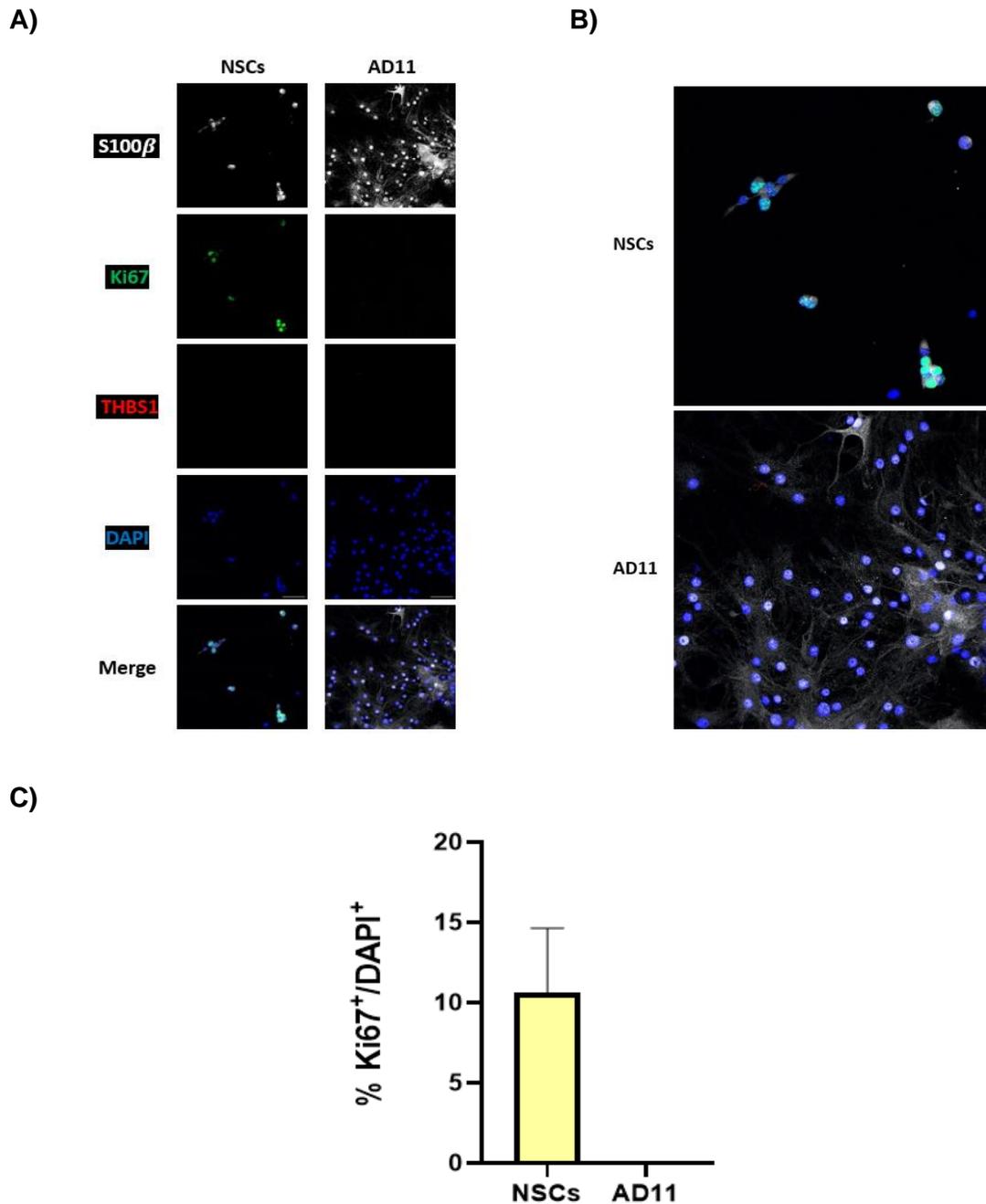


Figura 8. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores S100 β , THBS1 y Ki67. A) Ensayo de inmunocitoquímica como valoración de la diferenciación a astrogliá basada en niveles proteicos. Se emplean varios marcadores: DAPI para marcar los núcleos celulares, S100 β como marcador de astrogliá, Ki67 como marcador de proliferación y THBS1 como marcador de sinapsis. Así pues, se consigue analizar la diferenciación adquirida por las células. La escala, de 50 μ m, se presenta en la imagen de los DAPI. B) Ampliación de la imagen tomada visualizando simultáneamente todos los campos y marcadores en ambas muestras. C) Cuantificación en base a los DAPI de células viables, de cada uno de los marcadores empleados, y representación estadística de los mismos, diferenciando las muestras empleadas (NSCs y AD11).

Tras los diversos análisis realizados en las dos poblaciones celulares de estudio, puede resumirse, por lo tanto, que la variación de los niveles de expresión de los marcadores empleados para la caracterización, son los representados en la Figura 9.

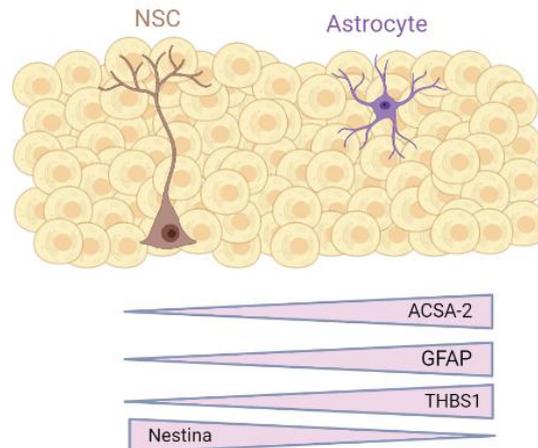


Figura 9. Esquematación del aumento o disminución de la expresión de los distintos marcadores de estudio en las NSCs y los astrocitos.

4.1.2. Optimización de la obtención de ACM para su posterior análisis

Tras el mantenimiento del cultivo celular de astrocitos, una vez estos se diferenciaron, se sustituyó el medio Neurobasal por un medio mínimo bajo en proteínas, el cual fue condicionado por los astrocitos durante 5 días (AD16), y luego se recogió para pasar a su concentración. Cabe mencionar que del volumen inicial de 6 mL aplicado al cultivo, tras los 5 días de condicionamiento se recogieron finalmente 4 mL, debido a la evaporación en el incubador de cultivo.

Así, el ACM fue concentrado mediante centrifugación en columnas de ultrafiltración, que presentaban un filtro por el que las proteínas eran seleccionadas en base a su peso molecular, puesto el límite en 3 kDa. Hasta conseguir una concentración adecuada de la muestra, se hicieron muchas pruebas para poner a punto la técnica. Se empezó tratando de equilibrar las columnas con agua desionizada con una centrifugación de 5 minutos a 4000 g, de forma que se vió que era necesario hacerlo durante 30 minutos. A partir de un volumen de 4 mL, y tras haber puesto a punto el sistema empleando distintos tiempos de centrifugación, se realizó la concentración en 2 tandas de 2 mL cada una empleando la misma columna. El volumen de la fracción concentrada fue 210 μ L, por tanto, se logró concentrar el ACM aproximadamente 19 veces.

Con las muestras del medio condicionado concentrado y del mismo sin concentrar como control, se cuantificó la cantidad de proteína por el ensayo Bradford. Tras los cálculos de concentración referenciados al patrón de la BSA, el ACM de los AD16 presentó una concentración proteica de 0,02 μ g/ μ L, siendo esta cantidad insuficiente para proseguir con su análisis por espectrometría de masas. Por otro lado, en el medio mínimo sin concentrar no se logró detectar proteína.

4.2. Establecimiento de un cultivo primario de astrocitos hipocampales aislados de animales postnatales y obtención del ACM

La segunda aproximación para lograr obtener medio condicionado de astrocitos que, posteriormente, nos permita identificar las proteínas secretadas por los astrocitos o secretoma, mediante técnicas proteómicas, ha consistido en poner a punto el cultivo primario de astrocitos hipocampales aislados de animales postnatales. La razón por la cual se trabajó con ratones postnatales y no adultos es por su comodidad y facilidad, y se realiza el cultivo con postnatales de 6 a 10 días ya que la gliogénesis es un proceso mayoritario en postnatales tempranos.

En primer lugar, los astrocitos debían ser extraídos de los propios ratones, y seleccionados de entre todos los tipos celulares existentes en el hipocampo, mediante el uso de microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-ACSA-2 (que reconoce la proteína ATP1B2, marcador de astrocitos) y la técnica MACS (*Magnetic-activated cell sorting*). Una vez diseccionado el tejido y disgregado por métodos mecánicos y enzimáticos, la suspensión celular incubada con las microperlas de interés se pasó por una columna que retiene las microperlas magnéticas unidas a las células ACSA-2⁺. Este aislamiento fue realizado por la Dra. Lucía Casares. Conseguida la fracción de células ACSA-2 positivas, en la que están contenidos los astrocitos, se pasó al cultivo de los mismos en el medio AstroMACS, y tras 7 días en este medio, este se sustituyó por el medio establecido según la condición de estudio, es decir, algunos siguieron en AstroMACS y otros pasaron a un medio mínimo bajo en proteínas, con o sin mitógenos, los cuales fueron condicionados por los astrocitos (Figura 10).

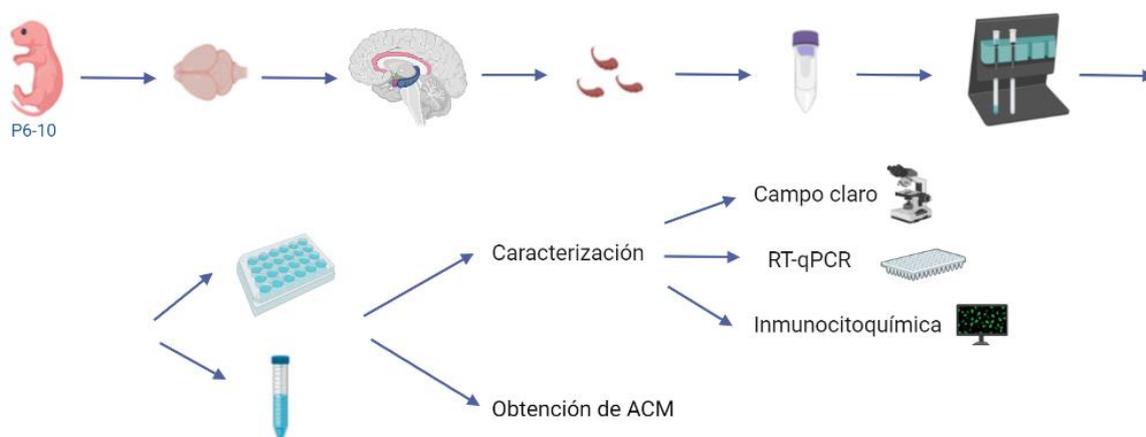


Figura 10. Esquema por pasos de la aproximación *in vivo*, desde la obtención de los astrocitos de los hipocampos de ratones postnatales, hasta su caracterización y análisis del ACM.

4.2.1. Ensayos de caracterización de astrocitos procedentes del hipocampo de ratones postnatales

La caracterización de los cultivos pudo hacerse mediante microscopía en campo claro, RT-qPCR e inmunofluorescencia. Se emplearon en todas las técnicas los astrocitos procedentes de las distintas condiciones de cultivo, realizando los mismos procedimientos en todos ellos para poder compararlos.

- *Caracterización mediante microscopía de campo claro*

Como se observa en las imágenes al microscopio de campo claro (Figura 11), prácticamente no hay diferencias entre los astrocitos de las distintas condiciones, puesto que todos han sido capaces de establecer una monocapa sobre la superficie del cristal y de crecer con su característica morfología ramificada.

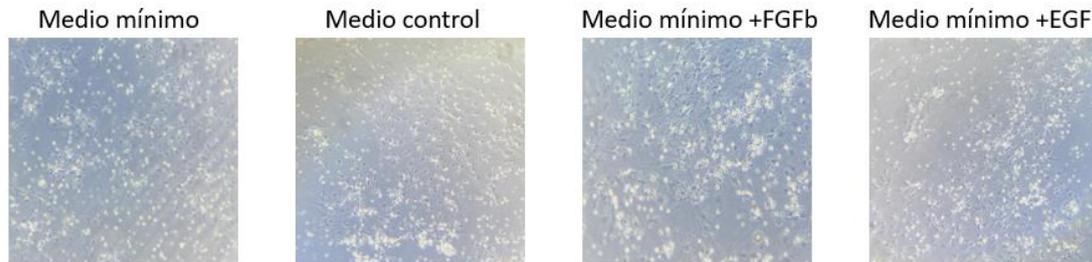


Figura 11. Condiciones empleadas para el cultivo de los astrocitos (P10).

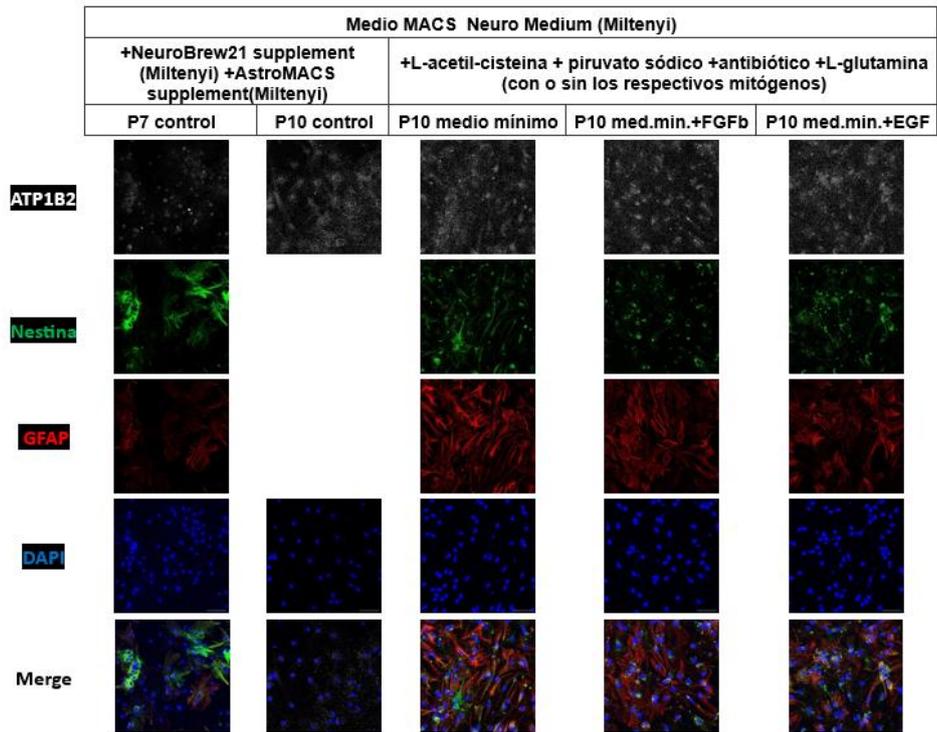
- *Caracterización mediante técnicas de inmunocitoquímica*

La siguiente prueba que se realizó para tratar de caracterizar los astrocitos aislados del hipocampo de ratones P7 y P10 y fijados *in vitro* a día 14 fue la inmunocitoquímica. Tras un procedimiento idéntico al ya comentado con anterioridad, los cristales con los astrocitos fueron fijados e incubados siguiendo todo el proceso.

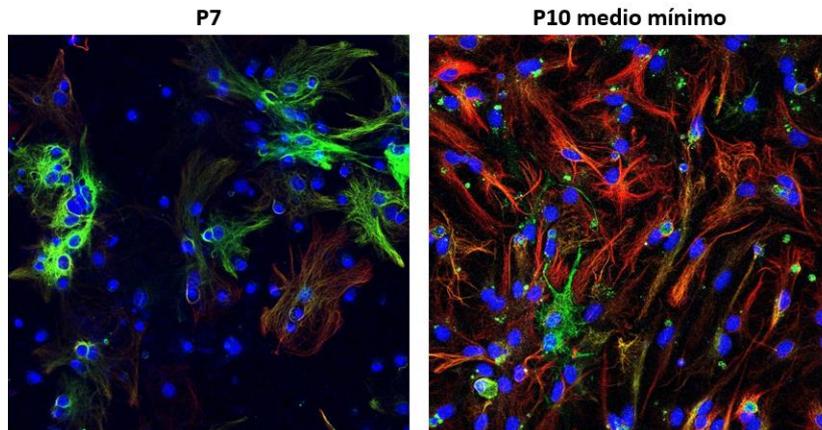
Se realizaron las mismas inmunocitoquímicas que las analizadas con la aproximación *in vitro*, y también se representaron a través de un panel que permite la visualización por campos del resultado de la inmunocitoquímica junto con la cuantificación y análisis estadístico de las misma (Figura 12). La primera prueba por lo tanto se realizó con Nestina (marcador de citoesqueleto de células madre y progenitores, también expresado por astrocitos no maduros), GFAP (marcador típico de astrocitos, citoplasmático, y también presente a niveles más bajos en las NSCs) y ATP1B2 (marcador de membrana específico de astrocitos).

Los porcentajes que se consiguieron tras la cuantificación son: un 76,31% de los P7 control, un 98,64% de los P10 en medio mínimo, un 99,32% de los P10 suplementados con FGFb y un 98,65% de los suplementados con EGF son Nestina⁺/ATP1B2⁺; mientras que los GFAP⁺/ATP1B2⁺ se presentaron en un 69,72% de los P7 control, en un 94,98% de los P10 en medio mínimo, en un 98,02% de los P10 en medio mínimo con FGFb y en un 94,82% de los P10 en medio mínimo suplementados con EGF. El resultado de la primera prueba de inmunocitoquímica, observando el panel y la cuantificación estadística, consiste por tanto en un marcaje de Nestina por parte de los astrocitos P7 y también de los P10, en los cuales prácticamente todas las células presentan este marcador. El marcaje por GFAP tiene una tendencia a incrementarse de los P7 a los P10, independientemente del medio empleado, puesto que son más maduros. ATP1B2 también se expresa en todas las muestras de análisis, puesto que es marcador típico de astrocitos, y estos son aislados con respecto a las bolas magnéticas anti-ACSA-2, que reconoce un epítipo de ATP1B2 en la membrana celular.

A)



B)



C)

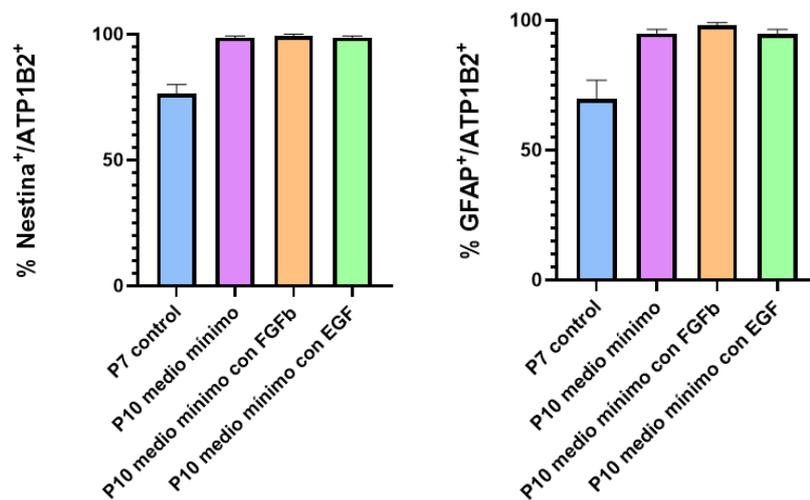
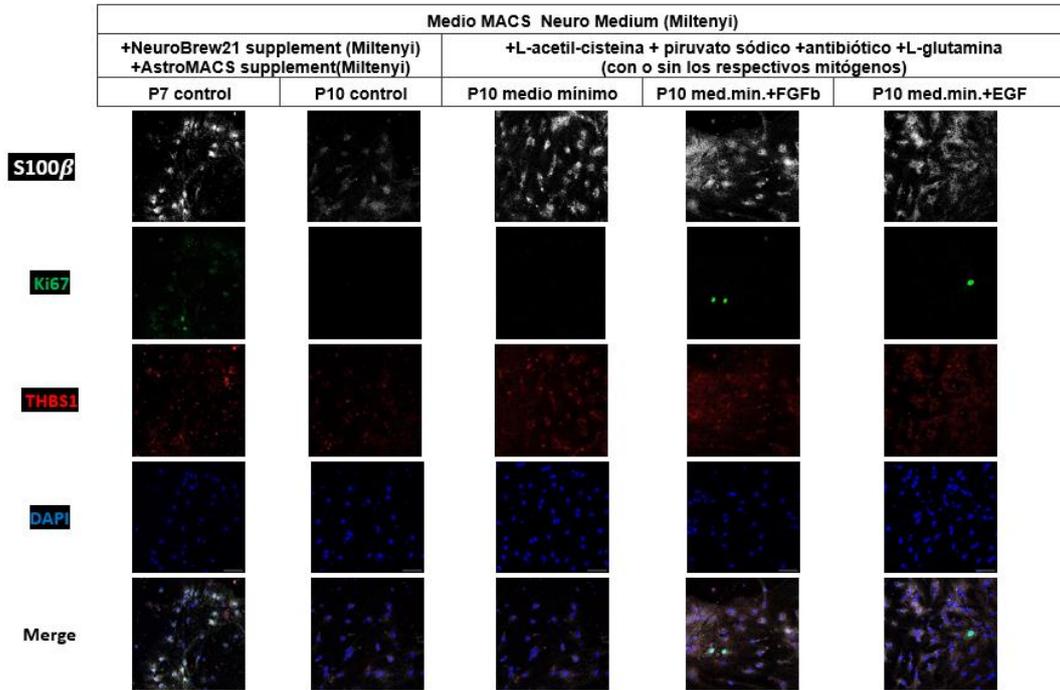


Figura 12. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores Nestina, GFAP y ATP1B2. A) Ensayo de inmunocitoquímica como valoración de la diferenciación a astrogliá basada en niveles proteicos. Se emplean varios marcadores: DAPI para marcar los núcleos celulares, Nestina como marcador de NSCs, ATP1B2 como marcador de astrogliá y GFAP como marcador de ambas, pudiendo analizar la diferenciación adquirida por las células. La escala, de 50 μm , se presenta en la imagen de los DAPI. B) Ampliación de la imagen tomada visualizando simultáneamente todos los campos y marcadores en ambas muestras. C) Cuantificación en base a los ATP1B2 de células viables, de cada uno de los marcadores empleados, y representación estadística de los mismos, diferenciando las condiciones de generación de ACM empleadas.

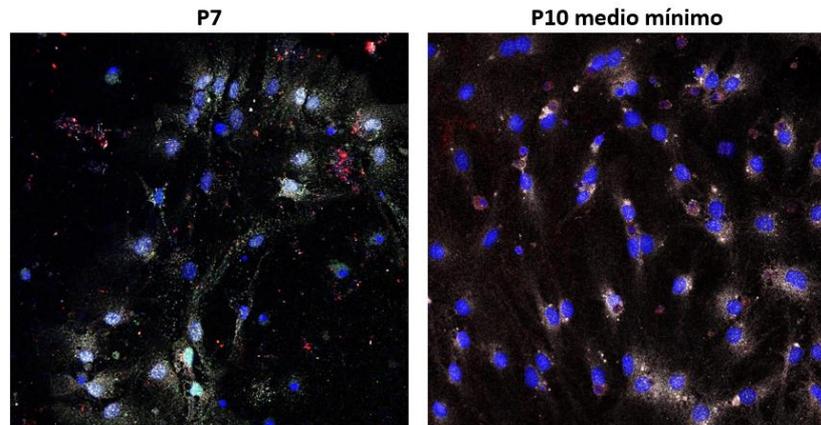
La segunda prueba emplea los anticuerpos primarios S100 β (marcador típico de astrocitos), Ki67 (marcador de proliferación) y THBS1 (marcador de astrocito con capacidad de promover la formación de sinapsis), y se realizan las mismas pruebas que las anteriormente descritas (Figura 13).

Tras la cuantificación, los porcentajes conseguidos para Ki67⁺/S100 β ⁺ son: un 25,35% de los P7 control, ninguno de los P10 control, un 0,44% de los P10 en medio mínimo, un 0,98% de los P10 en medio mínimo con FGFb y un 0,31% de los P10 en medio mínimo con EGF. En cambio, los porcentajes en el caso de las células THBS1⁺/S100 β ⁺ son un 81,46% de los P7 control, un 81,2% de los P10 control, un 68,88% de los P10 en medio mínimo, un 81,63% de los P10 en medio mínimo y suplementados con FGFb y un 91,64% de los P10 en medio mínimo con EGF. Por tanto, se puede destacar entonces la presencia de Ki67 en los P7 que no están tan diferenciados, puesto que proliferan más, pero no hay presencia en los P10, con la excepción de los dos casos donde se adicionan mitógenos al medio, ya que si tienen un poco de marcaje con Ki67. El THBS1 en este caso sí se presenta en este análisis inmunocitoquímico, al contrario que en la aproximación *in vitro*, y se da con un marcaje bastante similar en todos los casos. Por último, S100 β se presenta de forma generalizada al ser característico de los astrocitos.

A)



B)



C)

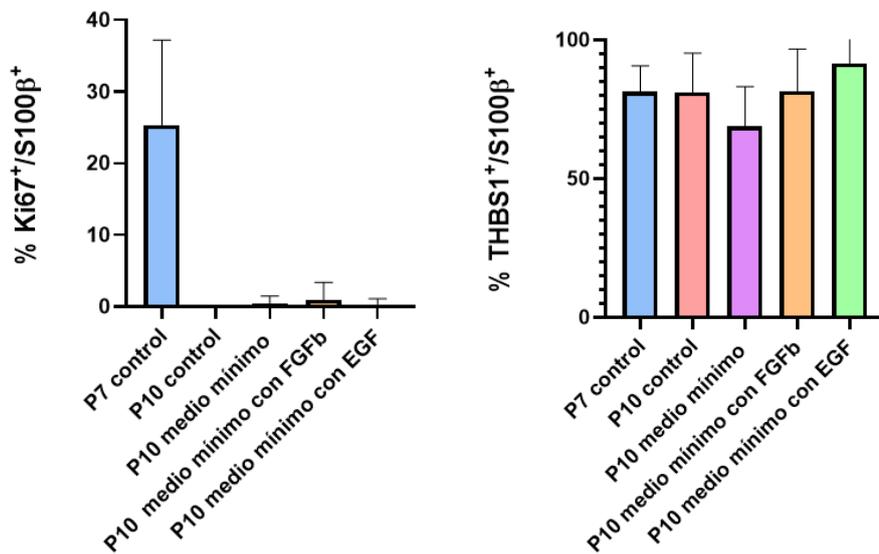


Figura 13. Ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores S100 β , THBS1 y Ki67. A) Ensayo de inmunocitoquímica como valoración de la diferenciación a astrogliía basada en niveles proteicos. Se emplean varios marcadores, DAPI para marcar los núcleos celulares, S100 β como marcador de astrogliía, Ki67 como marcador de proliferación y THBS1 marcador de sinapsis, pudiendo analizar la diferenciación adquirida por las células. La escala, de 50 μ m, se presenta en la imagen de los DAPI. B) Ampliación de la imagen tomada visualizando todos los campos y marcadores simultáneamente, en ambas muestras. C) Cuantificación en base a los S100 β de células viables, de cada uno de los marcadores empleados, y representación estadística de los mismos, diferenciando las condiciones de generación de ACM empleadas.

- *Caracterización mediante RT-qPCR*

Tras el aislamiento con microperlas Anti-ACSA-2, se consiguieron dos pellets celulares, por una parte la fracción de ACSA-2⁺ y por otro lado la fracción de ACSA-2⁻ del hipocampo de ratones P6, de los cuales había que extraer el RNA para realizar la RT-qPCR, y tras la homogeneización, lisis, filtrado y todos los pasos del proceso descrito detalladamente en el apartado de Material y Métodos, se consiguió el RNA de las muestras. Posteriormente se realizó su retrotranscripción, y el cDNA fue empleado como molde en una qPCR.

Es necesario saber a qué nivel aumenta o disminuye la expresión de los diferentes marcadores empleados a lo largo de este trabajo, así que la prueba de qPCR se emplea como análisis para conocer esta expresión como parámetro cuantitativo. Y de nuevo, se emplean los marcadores ya comentados con anterioridad y que facilitan la caracterización de las muestras.

La interpretación del resultado se hace empleando la expresión de un gen *housekeeping* para la normalización (en este caso *Sdha*), y tomando como referencia la fracción de ACSA-2 negativas (valor 1), viendo si el marcador aumenta o disminuye su expresión en las ACSA-2 positivas. Así pues, en relación a *Atp1b2*, la expresión de este marcador es mayor en la fracción positiva, puesto que su valor tras el cálculo es de 5,89. Para la *Gfap* también hay un aumento de la expresión del marcador en las ACSA-2 positivas, con un valor de 3,76. En cuanto a *Thbs1*, la expresión es más elevada en la fracción de positivas, pero su diferencia de expresión no es tan grande como en los casos anteriores, puesto que la fracción positiva consigue un valor de 1,20. Finalmente, es la *Nestina*, a diferencia de los demás, la que presenta una mayor expresión en los ACSA-2 negativos, con un valor de 0,63 en las ACSA-2 positivas (Figura 14).

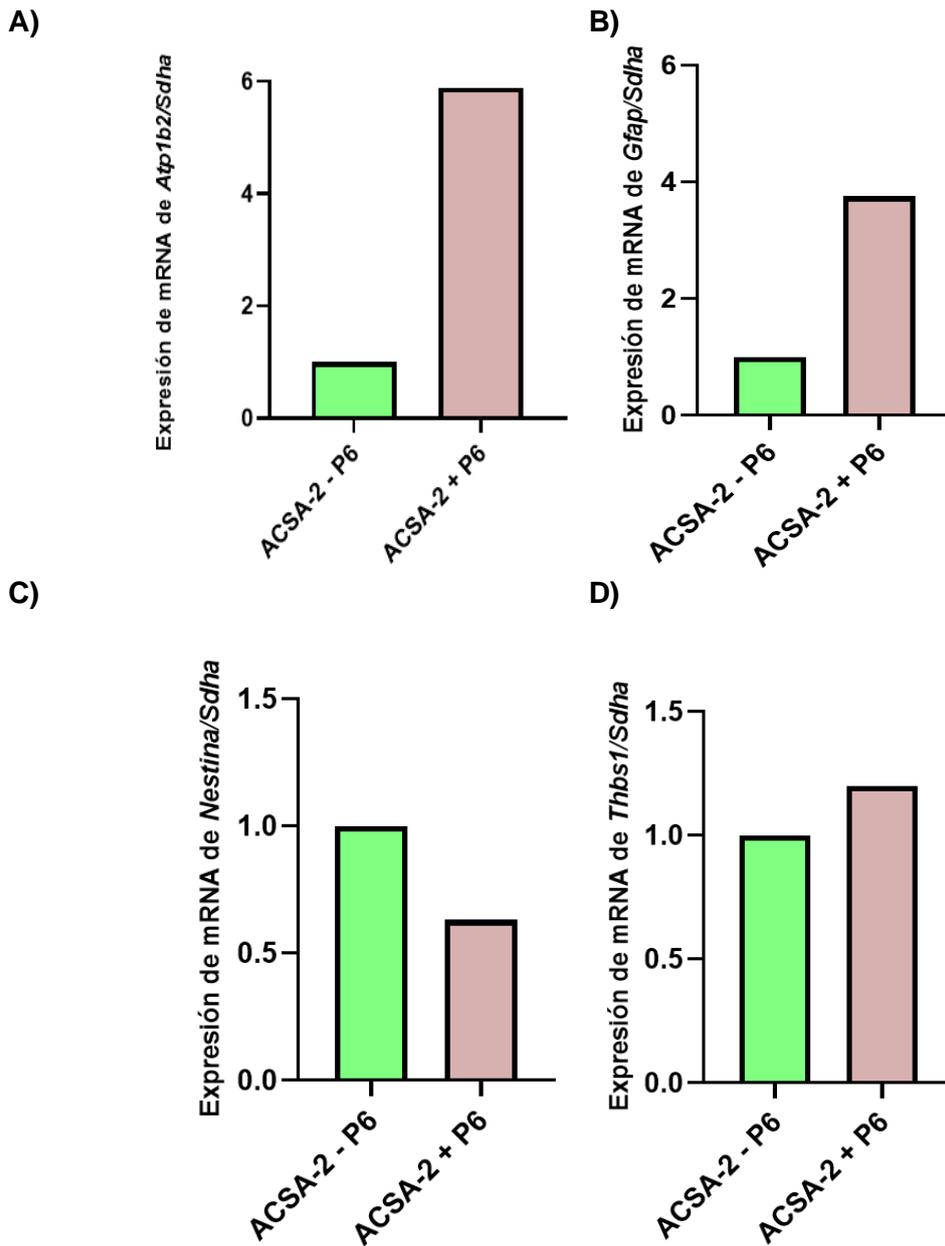


Figura 14. Análisis de los niveles de expresión de la fracción ACSA-2 positiva y ACSA-2 negativa de ratones P6 de los genes *Atp1b2*, *Nestina*, *Gfap* y *Thbs1* respecto al *Sdha*. A) Expresión de mRNA de *Atp1b2* respecto a *Sdha*. B) Expresión de mRNA de *Gfap* respecto a *Sdha*. C) Expresión de mRNA de *Nestina* respecto a *Sdha*. D) Expresión de mRNA de *Thbs1* respecto a *Sdha*.

4.2.2. Caracterización mediante análisis del ACM por espectrometría de masas

Tras el aislamiento de los astrocitos, el cultivo de los mismos en medio AstroMACS y la sustitución por el medio acorde a la condición de estudio, fue el ACM del cultivo de los astrocitos P10 en medio mínimo el que se recogió. Esta decisión fue tomada tras ver, en varias pruebas, que no había diferencias notorias (ni morfológicas ni de crecimiento) entre los astrocitos de las distintas condiciones. Se optó por tanto por recoger el medio que tenía menos factores proteicos añadidos para facilitar posteriormente la proteómica.

Así, el ACM fue recogido en dos tandas de condicionamiento de 5 días cada una, y se concentró con las mismas columnas empleadas en el apartado 4.1.2, con un filtro marcado por un límite de peso molecular establecido en 3 kDa. Fueron varios los intentos de concentración, puesto que se empezó con un volumen de 780 μL de medio mínimo, que se concentró mediante centrifugación durante 75 minutos a 4000 g, en el que se consiguió un volumen concentrado de 410 μL , pero tras el ensayo Bradford se vio que no contenía suficiente proteína (presentaba una concentración por debajo de la curva patrón). Así que se volvió a concentrar la fracción pre-concentrada, pero al tratarse de un volumen bajo, de 400 μL , no pudo recogerse volumen en la región de concentración. Tras estos intentos se juntó el ACM recogido de la muestra con el mitógeno FGFb y de la muestra con EGF, para conseguir así un volumen mayor, de unos 2 mL (1,7 mL) que es el óptimo que acepta la columna, y así se consiguió un volumen concentrado de 82 μL (es decir, se logró concentrar 19,5 veces). De nuevo, no se detectó proteína mediante el ensayo Bradford.

Tras los varios intentos fallidos, se pasó a la concentración del ACM de los P10 que presentaban el medio mínimo sin mitógenos, y se tuvo en cuenta la realización de un equilibrado de 30 minutos, la introducción del volumen próximo a 2 mL, puesto que es el necesario para que funcione la concentración, y tras la introducción de 1,95 mL de ACM, se consiguió un volumen concentrado de 55 μL (35 X). Con las muestras tanto de medio concentrado como sin concentrar, y también del medio mínimo sin condicionar por astrocitos como control, se cuantificó la cantidad de proteína por el ensayo Bradford, y se consiguió una concentración de 0,53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Al contener suficiente proteína como para analizar este medio por espectrometría de masas, las muestras se mandaron al Servicio de Proteómica de la Universitat de València, donde se realizó un primer análisis de calidad de la muestra.

En primer lugar, en el servicio se corrió un gel SDS-PAGE al 12%, cargando 10 μg de proteína del ACM concentrado en un pocillo. Tras la tinción del gel con Azul de Coomassie Coloidal pudo observarse la presencia de una proteína de 67 kDa, que probablemente corresponde con la BSA junto con otras proteínas (Figura 15). Para proseguir con el análisis, se intentó deplecionar la BSA de la muestra para evitar posteriores interferencias en el análisis proteómico.



Figura 15. Resultado de la tinción con Coomassie Coloidal de la membrana de electroforesis (SDS-PAGE).

Trataron de eliminarla a través de una precipitación con acetonitrilo al 70%, durante toda la noche y a -20 °C. Al día siguiente se centrifugó la muestra, en el precipitado pellet estaban las proteínas, y se esperaba que en el sobrenadante estuviese la mayor parte de la BSA, pero no fue así (Figura 16). Así pues, sin éxito en la eliminación de BSA, no se puede realizar el análisis, y no se puede determinar qué proteínas contiene exactamente el secretoma de los astrocitos.

Precipitación con acetonitrilo al 70% del medio ACM: 0,5ug/ul

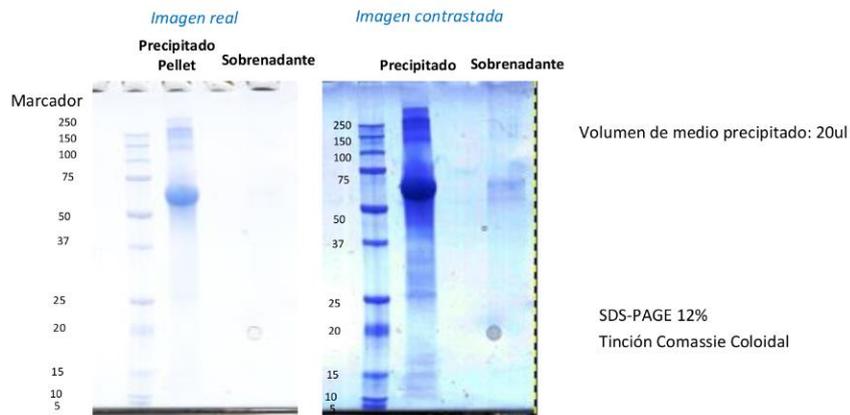


Figura 16. Resultado tras la precipitación con acetonitrilo.

Como no se sabe de dónde procede la BSA del ACM, se testaron todos los medios que hay en el laboratorio, para encontrar alguno libre de proteínas que pudiera emplearse en el futuro. Se emplearon 20 µL de cada medio, hasta conseguir las muestras que se cargaron en un gel. Los medios analizados fueron AstroMACS (como medio completo suplementado que sabemos que contiene BSA en abundancia), MACs Neuro Medium, el medio mínimo MACs Neuro (anteriormente empleado para generar el ACM, y que según la casa comercial no contiene BSA), Neurobasal y DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

Después del proceso, se realizó una tinción del gel con Coomassie, y así se consiguió ver que todos contenían BSA excepto el medio DMEM (Figura 17).

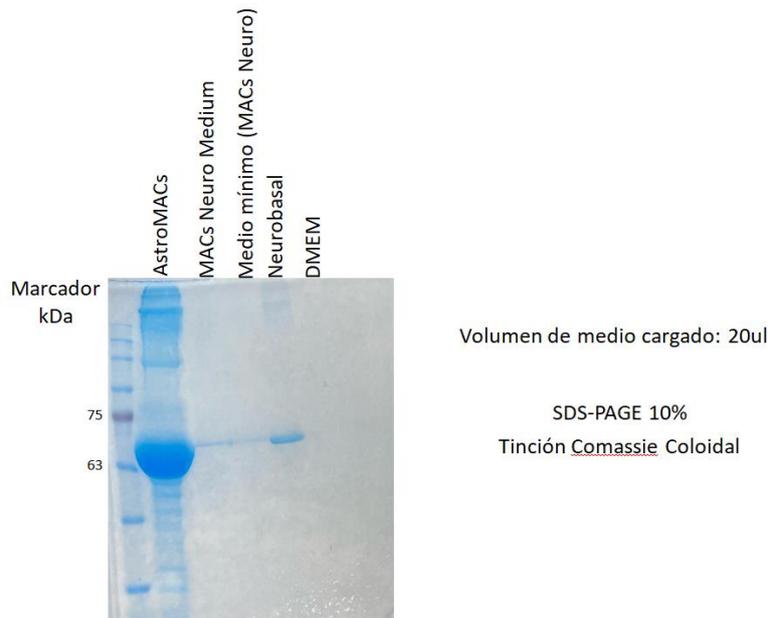


Figura 17. Tinción con Coomassie para testar el contenido en BSA de los distintos medios que hay en el laboratorio.

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En primer lugar, acerca de la aproximación *in vitro*, los resultados obtenidos con las diversas técnicas empleadas se detallan a continuación. Mediante el WB, observamos una clara expresión de la proteína GFAP en los astrocitos y una ausencia de dicha proteína en la muestra de células madre. La proteína GFAP es un marcador común de ambos tipos celulares, pero mucho más abundante en astrocitos, pudiendo esto explicar la menor expresión de la proteína por parte de las NSCs. Esto ha sido corroborado por otros laboratorios, como Holt y Olsen, en el estudio que realizaron en el 2016, en el que también emplearon la GFAP (entre otras proteínas) para identificar astrocitos, y tras un análisis por WB, se observó que la fracción enriquecida en astrocitos presentaba una banda muy clara para la proteína GFAP. Por tanto, este resultado junto con los cambios morfológicos observados indican que el protocolo empleado promueve la diferenciación de las NSCs a astrocitos.

La THBS1 sin embargo no ha conseguido visualizarse mediante WB ni en NSCs ni en astrocitos diferenciados *in vitro*. Posiblemente se deba a que su expresión es muy baja o nula en estas células. Además, a través de la técnica de inmunocitoquímica tampoco pudo detectarse su expresión. El resultado sugiere que los astrocitos generados *in vitro*, al menos a los tiempos analizados, posiblemente no son completamente funcionales puesto que no expresan proteínas implicadas en la formación de sinapsis tales como THBS1. El sistema *in vitro* no acaba de reflejar lo que ocurre *in vivo*, ya que en el cultivo postnatal sí que puede verse esta proteína por inmunocitoquímica, y su expresión por qPCR.

En cuanto al análisis inmunocitoquímico de las NSCs *versus* astrocitos diferenciados, la razón por la que los astrocitos expresan Nestina puede ser porque estos son inmaduros todavía, por lo que presentan un marcador de célula madre o progenitora, pero a su vez están ligeramente diferenciados a astrocito, razón por la cual presentan el marcador típico de astrocito, GFAP. Además, que las NSCs presenten también ambos marcadores se ha visto en otros estudios, como el realizado por Gonçalves *et al.* 2016, en el que observan que las NSCs también pueden expresar GFAP. Adicionalmente, el análisis de Nicola *et al.* en el 2015 muestra que aquellas células positivas para la Nestina se caracterizan por ser células progenitoras, mientras que las negativas en Nestina consisten en células menos proliferativas (más diferenciadas); pero, se vió que algunas células, denominadas de tipo 1 y similares a la glía radial (células que exhiben propiedades de NSCs), son positivas tanto para Nestina como para GFAP. Además, un resultado inesperado sería la marca de las NSCs con ATP1B2; no obstante, esta marca posiblemente es inespecífica, puesto que marca el núcleo y no el citoplasma, como debería hacer y hace en los astrocitos.

Por otra parte, las células madre presentan marcaje con Ki67 y los astrocitos no, ya que las NSCs sí que proliferan mientras que los AD11, como están diferenciados, no lo hacen. Esto corrobora que los astrocitos generados son células postmitóticas. El Ki67 se emplea en el estudio de células madre, como por ejemplo se hizo en el trabajo de Tobin *et al.*, 2019 en el que emplearon Ki67 para ver proliferación de estas células, así, no observar marcaje en los astrocitos diferenciados es lo esperable.

La THBS1 de nuevo no se observa en ninguna de las dos muestras, tal y como ocurría en el WB, tal vez porque expresan muy poco, o lo expresan de manera puntual y luego

desaparece, no pudiendo ser detectado mediante el microscopio Confocal Leica SP8. O tal vez porque las condiciones *in vitro* no mimetizan completamente las *in vivo*, y los astrocitos no generan THBS1 (en las condiciones *in vitro* no hay neuronas ni el mismo ambiente). Como ya se ha comentado, THBS1 es una proteína que participa en la formación de sinapsis, así que su ausencia sugiere que los astrocitos son inmaduros. En cuanto al marcador S100 β , los AD11 están prácticamente todos marcados puesto que es un marcador típico de astrocitos. Dado que las NSCs también presentan marcaje, la interpretación podría ser la misma que en el caso de la inmunofluorescencia para ATP1B2, pues se observa una marca nuclear que se piensa que es inespecífica, mientras que la marca citoplasmática específica únicamente puede verse en los astrocitos diferenciados. Es decir, las NSCs están marcadas con S100 β , pero con una marca muy poco intensa e inespecífica. Para mejorar la inmunofluorescencia tanto de S100 β como de ATP1B2 tal vez debería hacerse una dilución mayor del anticuerpo primario.

Por otro lado, tras la optimización de la obtención de ACM empleando astrocitos diferenciados *in vitro* y su concentración volumétrica, se obtuvo un rendimiento muy bajo en cuanto a concentración de proteína. Esta insuficiente cantidad proteica tras la concentración podría deberse a que el ritmo de maduración y en general de adquisición de funciones podría estar ralentizado en los astrocitos diferenciados *in vitro*, pues no es comparable la condición que encuentran las células *in vivo* en el propio organismo, que las simuladas a través de cultivos celulares. Cabe destacar que los parámetros de tiempo, volumen y reciclaje de la columna son los que interfieren en el proceso de concentración.

En segundo lugar, acerca de la aproximación *in vivo*, también han sido diversas las pruebas realizadas para llegar a caracterizar correctamente estos astrocitos. En cuanto a la prueba de inmunocitoquímica, cabe destacar los siguientes resultados. En primer lugar, se observa marcaje de Nestina tanto en los astrocitos provenientes de ratones P7 como de los P10, y ya que la Nestina es un marcador característico de célula madre y progenitor (Nicola *et al.*, 2015), esto justifica el hecho de que estos astrocitos todavía no son maduros. En cuanto a la GFAP, sí que hay una tendencia a incrementarse el marcaje entre los astrocitos provenientes de ratones P7 y de los P10, que en este caso sí que es lo esperado, puesto que si expresan más GFAP indicaría que estos astrocitos son más maduros, están más diferenciados, tal y como se ve en el estudio de Kantzer *et al.* 2017, donde hay un claro marcaje de GFAP en las células ACSA-2 positivas, y también en el estudio de Kantzer *et al.* 2021 (en ambos trabajos se realizan pruebas inmunohistoquímicas en lugar de inmunocitoquímicas, pero se alcanza la misma conclusión). Además aquí se confirma que no hay prácticamente diferencias entre la condición de crecimiento en medio mínimo o suplementado con mitógenos, justificando la elección del medio mínimo para el trabajo realizado.

Respecto al ensayo de caracterización de astrocitos por prueba inmunocitoquímica basada en los marcadores Ki67, GFAP y ATP1B2, puede destacarse que a P7 los astrocitos proliferan más, puesto que no están tan diferenciados, y que por lo tanto tienen mayor cantidad de células positivas para Ki67 que los P10 (en la gráfica de cuantificación se observan las diferencias de forma muy notable), aunque cabe añadir

que la adición de mitógenos aquí sí que parece tener un ligero impacto, puesto que tienen un efecto aumentando un poco la proliferación. La THBS1 en este caso sí que puede observarse mediante inmunocitoquímica, presentando marca todos los astrocitos en general, y coincidiendo con lo visto en el análisis por qPCR. Por último, el marcador S100 β se presenta en todos los astrocitos aislados del tejido, ya que es marcador de astrogliá, y tal y como se ha visto en otros trabajos como el de Kantzer *et al.* 2017, donde muestran que los ACSA-2 positivos presentan marcaje con S100 β .

Tras el análisis por RT-qPCR se observa que la expresión de *Atp1b2* es mayor en las células ACSA-2 positivas que en las negativas, al igual que ocurre con *Gfap*, puesto que en la fracción de ACSA-2 positivas es donde se encuentran la mayoría de los astrocitos. La expresión de *Nestina* por el contrario, se ve incrementada en la fracción de ACSA-2 negativas, ya que en esta es donde se encuentran mayoritariamente las células madre. Por último, la expresión de *Thbs1* da una amplificación adecuada, y muy similar entre las 3 réplicas, donde se observa que su expresión es mayor en las células ACSA-2 positivas que en las ACSA-2 negativas, ya que este gen codifica para una proteína secretada por astrocitos. Los análisis por qPCR son habitualmente empleados en muchos trabajos de este estilo, como el de Holt y Olsen en el 2016, donde también evaluaron la expresión de diversos genes, y mediante esta técnica, en astrocitos a lo largo del desarrollo, también observaron por ejemplo mayor expresión de *Gfap* en los ACSA-2 positivos que en la fracción no retenida (es decir, en las células negativas no unidas a las microperlas magnéticas conjugadas a ACSA-2 en el aislamiento). Cabe destacar por tanto que se ha visto con el trabajo realizado para este TFG que la THBS1 puede observarse tras análisis de astrocitos extraídos *in vivo* de ratones, mientras que mediante la aproximación *in vitro* no es posible ver su expresión.

Por último, se realizó la optimización de la recogida y la concentración del ACM de los cultivos de astrocitos primarios ACSA-2 positivos para su futuro análisis por espectrometría de masas. Ya se había confirmado anteriormente con los resultados de este trabajo que los astrocitos sobreviven igual con o sin mitógenos en el medio, por lo que el trabajo con el ACM se centró en la concentración de únicamente el medio mínimo condicionado por los astrocitos. En este caso tras la concentración volumétrica del medio sí que se obtiene una concentración de proteína suficiente como para poder analizar la muestra mediante espectrometría de masas.

No obstante, tras la tinción del gel con Coomassie Coloidal se observa que ha habido una contaminación con BSA, siendo esta difícil de explicar puesto que se ha empleado de partida un medio mínimo supuestamente sin proteínas añadidas y, además, antes de pasar el cultivo a medio mínimo para generar el ACM, se realizaron varios lavados. El servicio de proteómica de la Universitat de València trató de eliminar la BSA empleando un protocolo que permite eliminar la albúmina humana, pero lamentablemente este no funcionó para la BSA, de origen bovino. Tras este resultado se plantearon varias posibilidades, como que la BSA podría estar contenida en el NeuroMACs a pesar de que la casa comercial (Miltenyi Biotec) aseguró que su medio no presentaba la proteína

Finalmente se optó por analizar todos los medios de cultivo disponibles en el laboratorio mediante electroforesis gel SDS-PAGE, para aclarar la procedencia de la BSA. Tras la

prueba se observó cómo el único medio de cultivo en el que no se encontraba proteína BSA de partida es el DMEM. Así, en próximos experimentos se testará si los astrocitos pueden sobrevivir en él, y luego se tratará de condicionar este medio, para en un futuro realizar el análisis por espectrometría de masas y poder determinar el secretoma de los astrocitos. En caso de que los astrocitos no logren sobrevivir en el medio DMEM, la alternativa planteada es la eliminación de la BSA del medio mínimo NeuroMACS mediante kits comerciales o empleando otros protocolos específicos para la albúmina bovina.

6. CONCLUSIONES

1. El análisis de marcadores característicos de astrocitos, a través de diversas técnicas como la inmunocitoquímica, el WB y la RT-qPCR, permite caracterizar las poblaciones celulares del hipocampo, concretamente en este trabajo los astrocitos y las NSCs.
2. El estudio de los cultivos primarios de astrocitos aislados del tejido *in vivo* es más adecuado que el estudio *in vitro* puesto que, a través de las distintas técnicas empleadas, se ha comprobado que los astrocitos de los cultivos primarios están más maduros y diferenciados, y liberan más proteínas (secretoma), mientras que los obtenidos por diferenciación *in vitro* no acaban de alcanzar su funcionalidad normal, como indica por ejemplo la falta de expresión de THBS1.
3. Se ha conseguido encontrar un medio mínimo en proteínas en el que los astrocitos pueden crecer, y se ha podido concentrar este medio lo suficiente como para poder hacer su análisis mediante espectrometría de masas, aunque por el momento no ha sido posible el estudio del secretoma debido a la contaminación con BSA.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS O BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed, S. (2009). The culture of neural stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(1), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jcb.21972>
2. Araujo, B. H. S., Kaid, C., De Souza, J. S., Gomes da Silva, S., Goulart, E., Caires, L. C. J., Musso, C. M., Torres, L. B., Ferrasa, A., Herai, R., Zatz, M., Okamoto, O. K., & Cavalheiro, E. A. (2018). Down Syndrome iPSC-Derived Astrocytes Impair Neuronal Synaptogenesis and the mTOR Pathway *In Vitro*. *Molecular neurobiology*, 55(7), 5962–5975. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0818-6>
3. Bailey, M. S., & Shipley, M. T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *The Journal of comparative neurology*, 328(4), 501–526. <https://doi.org/10.1002/cne.903280405>
4. Ballas, N., Liou, D. T., Grunseich, C., & Mandel, G. (2009). Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nature neuroscience*, 12(3), 311–317. <https://doi.org/10.1038/nn.2275>
5. Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>
6. Batiuk, M. Y., de Vin, F., Duqué, S. I., Li, C., Saito, T., Saido, T., Fiers, M., Belgard, T. G., & Holt, M. G. (2017). An immunoaffinity-based method for isolating ultrapure adult astrocytes based on ATP1B2 targeting by the ACSA-2 antibody. *The Journal of biological chemistry*, 292(21), 8874–8891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765313>
7. Bergström, T., & Forsberg-Nilsson, K. (2012). Neural stem cells: Brain building blocks and beyond. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 117(2), 132–142. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.665096>
8. Blanco-Suárez, E., Caldwell, A. L., & Allen, N. J. (2017). Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *The Journal of physiology*, 595(6), 1903–1916. <https://doi.org/10.1113/JP270988>
9. Brenner M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience letters*, 565, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.055>
10. Caldwell, A. L. M., Sancho, L., Deng, J., Bosworth, A., Miglietta, A., Diedrich, J. K., Shokhirev, M. N., & Allen, N. J. (2022). Aberrant astrocyte protein secretion contributes to altered neuronal development in multiple models of neurodevelopmental disorders. *Nature neuroscience*, 25(9), 1163–1178. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01150-1>
11. Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Moshier, D. F., Bornstein, P., & Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>
12. Cope, E. C., & Gould, E. (2019). Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell stem cell*, 24(5), 690–705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.023>
13. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
14. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
15. Holt, L. M., & Olsen, M. L. (2016). Novel Applications of Magnetic Cell Sorting to Analyze Cell-Type Specific Gene and Protein Expression in the Central Nervous System. *PLoS one*, 11(2), e0150290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150290>

16. Jacobs, S., Nathwani, M., & Doering, L. C. (2010). Fragile X astrocytes induce developmental delays in dendrite maturation and synaptic protein expression. *BMC neuroscience*, *11*, 132. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-132>
17. Kamsu, J. M., Constans, J. M., Lamberton, F., Courtheoux, P., Denise, P., Philoxene, B., Coquemont, M., & Besnard, S. (2013). Structural layers of ex vivo rat hippocampus at 7T MRI. *PLoS one*, *8*(9), e76135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076135>
18. Kantzer, C. G., Boutin, C., Herzig, I. D., Wittwer, C., Reiß, S., Tiveron, M. C., Drewes, J., Rockel, T. D., Ohlig, S., Ninkovic, J., Cremer, H., Pennartz, S., Jungblut, M., & Bosio, A. (2017). Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia*, *65*(6), 990–1004. <https://doi.org/10.1002/glia.23140>
19. Kantzer, C. G., Parmigiani, E., Cerrato, V., Tomiuk, S., Knauel, M., Jungblut, M., Buffo, A., & Bosio, A. (2021). ACSA-2 and GLAST classify subpopulations of multipotent and glial-restricted cerebellar precursors. *Journal of neuroscience research*, *99*(9), 2228–2249. <https://doi.org/10.1002/jnr.24842>
20. Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *7*(9), a018812. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>
21. Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature neuroscience*, *18*(7), 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>
22. Knierim J. J. (2015). The hippocampus. *Current biology : CB*, *25*(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
23. Langeh, U., & Singh, S. (2021). Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders. *Current neuropharmacology*, *19*(2), 265–277. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200729100427>
24. Makridakis, M., & Vlahou, A. (2010). Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *Journal of proteomics*, *73*(12), 2291–2305. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.001>
25. Meissner, F., Scheltema, R. A., Mollenkopf, H. J., & Mann, M. (2013). Direct proteomic quantification of the secretome of activated immune cells. *Science (New York, N.Y.)*, *340*(6131), 475–478. <https://doi.org/10.1126/science.1232578>
26. Mellodew, K., Suhr, R., Uwanogho, D. A., Reuter, I., Lendahl, U., Hodges, H., & Price, J. (2004). Nestin expression is lost in a neural stem cell line through a mechanism involving the proteasome and Notch signalling. *Brain research. Developmental brain research*, *151*(1-2), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.03.018>
27. Nicola, Z., Fabel, K., & Kempermann, G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Frontiers in neuroanatomy*, *9*, 53. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00053>
28. Park, H. J., Kim, S. K., Kim, J. W., Kang, W. S., & Chung, J. H. (2012). Association of thrombospondin 1 gene with schizophrenia in Korean population. *Molecular biology reports*, *39*(6), 6875–6880. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1513-3>
29. Raff, M. C., Abney, E. R., Cohen, J., Lindsay, R., & Noble, M. (1983). Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *3*(6), 1289–1300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-06-01289.1983>
30. Romani, A., Schürmann, F., Markram, H., & Migliore, M. (2022). Reconstruction of the Hippocampus. *Advances in experimental medicine and biology*, *1359*, 261–283. https://doi.org/10.1007/978-3-030-89439-9_11
31. Rurak, G. M., Simard, S., Freitas-Andrade, M., Lacoste, B., Charih, F., Van Geel, A., Stead, J., Woodside, B., Green, J. R., Coppola, G., & Salmaso, N. (2022). Sex

- differences in developmental patterns of neocortical astroglia: A mouse transcriptome database. *Cell reports*, 38(5), 110310. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110310>
32. Shoneye, T., Orrego, A. T., Jarvis, R., Men, Y., Chiang, M. S. R., & Yang, Y. (2020). Differential Proliferation and Maturation of Subcortical Astrocytes During Postnatal Development. *Frontiers in neuroscience*, 14, 435. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00435>
 33. Stepan, J., Dine, J., & Eder, M. (2015). Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit *in vitro*: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. *Frontiers in neuroscience*, 9, 160. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00160>
 34. Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., Kim, N., Dawe, R. J., Bennett, D. A., Arfanakis, K., & Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell stem cell*, 24(6), 974–982.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.003>
 35. Verkhratsky, A., Nedergaard, M., & Hertz, L. (2015). Why are Astrocytes Important? *Neurochemical Research*, 40(2), 389–401. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1403-2>
 36. Viana, J. F., Machado, J. L., Abreu, D. S., Veiga, A., Barsanti, S., Tavares, G., Martins, M., Sardinha, V. M., Guerra-Gomes, S., Domingos, C., Pauletti, A., Wahis, J., Liu, C., Cali, C., Henneberger, C., Holt, M. G., & Oliveira, J. F. (2023). Astrocyte structural heterogeneity in the mouse hippocampus. *Glia*, 71(7), 1667–1682. <https://doi.org/10.1002/glia.24362>
 37. Xue, X. J., & Yuan, X. B. (2010). Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences*, 45(1), 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.05.006>
 38. Yong, V. W., Yong, F. P., Olivier, A., Robitaille, Y., & Antel, J. P. (1990). Morphologic heterogeneity of human adult astrocytes in culture: correlation with HLA-DR expression. *Journal of neuroscience research*, 27(4), 678–688. <https://doi.org/10.1002/jnr.490270428>
 39. Zhang, Y., & Barres, B. A. (2010). Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current opinion in neurobiology*, 20(5), 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.005>
 40. Zhong, S., Ding, W., Sun, L., Lu, Y., Dong, H., Fan, X., Liu, Z., Chen, R., Zhang, S., Ma, Q., Tang, F., Wu, Q., & Wang, X. (2020). Decoding the development of the human hippocampus. *Nature*, 577(7791), 531–536. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1917-5>

8. ANEXOS

- GRADO DE RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS ODS DE LA AGENDA 2030

Para el año 2030 se han propuesto 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), los cuales pretenden alcanzarse puesto que están diseñados e interconectados para conseguir un futuro más sostenible. Este proyecto presenta un grado de relación alto, y contribuye por lo tanto a los siguientes ODS: Salud y bienestar (ODS3), puesto que con este trabajo se pretende optimizar la metodología para la identificación del secretoma de los astrocitos cerebrales, y ya que la liberación de estas señales extracelulares contribuye a diversos procesos fisiológicos, y muestra diferencias entre pacientes sanos y enfermos (enfermedades del neurodesarrollo) o entre pacientes jóvenes y adultos, ayuda en aumentar el conocimiento y por ende a promover el bienestar de las personas. También se relaciona con la Educación de calidad (ODS4), puesto que en el laboratorio se consigue una educación inclusiva y en igualdad de oportunidades para todos. El proyecto está relacionado también con la Igualdad de género (ODS5), ya que el grupo se encuentra bajo la dirección de una mujer, y este está formado, a su vez, por diversas mujeres, en igualdad de condiciones con los hombres, los cuales han conseguido un sitio por sus capacidades y no por su género. Por último, también presenta un grado de relación alto con el Trabajo docente y Crecimiento económico (ODS8), por formar a profesionales para la investigación y para la educación. Por lo tanto, este Trabajo de Final de Grado se relaciona con los distintos ODS tal como puede observarse en la tabla siguiente:

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.	X			
ODS 5. Igualdad de género.	X			
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.	X			
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.		X		