



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EFECTO DEL SILENCIAMIENTO
DE *PINK1* SOBRE LA DINÁMICA
DE ESPINAS DENDRÍTICAS EN UN
CULTIVO PRIMARIO DE
NEURONAS HIPOCAMPALES**

TESIS MAESTRÍA EN NEUROCIENCIAS

**Efecto del silenciamiento de *PINK1*
sobre la dinámica de espinas dendríticas en
un cultivo primario de neuronas hipocampales**

CÉSAR JAVIER HERNÁNDEZ

Cédula: 79914641

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Neurociencias

Director:

Dr. Gonzalo H. Arboleda B.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias
Grupo de Investigación Muerte Celular
Bogotá D.C., Colombia

2017

A mi mamá y mi hermano

“beautiful is that which we see; more beautiful
that which we know; by far the most beautiful
that which we do not know”

Nicolaus Steno (1638 - 1686)

“To fire or not to fire. That is the question”

Jeanette Norden, Ph.D. (19 - 19)

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial quiero agradecer al profesor Gonzalo Arboleda del departamento de Patología por su dedicación total en la dirección de este trabajo de investigación. También por su invaluable colaboración y por la actitud amable y respetuosa con la que siempre atendió todas mis inquietudes. Además por el continuo apoyo y la valiosa motivación que siempre me ha brindado. Finalmente, le agradezco el haberme hecho miembro del grupo de investigación Muerte Celular, por el equipo de laboratorio y por el espacio que me brindó para llevar a cabo los objetivos previstos en este proyecto.

Quiero agradecer a cada uno de los profesores que a lo largo de mis estudios de maestría contribuyeron en mi crecimiento intelectual y me brindaron la posibilidad de ver y aplicar conceptos de biología celular y molecular de manera más fácil y eficaz, en especial a los profesores Humberto Arboleda director de la maestría en Neurociencias, al profesor Alejandro Múnera del departamento de Electrofisiología y Juan Yuñiz del departamento de Patología, de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

De igual forma a todos mis compañeros que estuvieron a lo largo de este proceso y que siempre me brindaron su apoyo incondicional, en especial a María José Contreras, mi mentora en el laboratorio, a Keydy Vasquez, Estefania Valencia, Tatiana Baez y Adrián Sandoval.

Al personal de administrativo de la maestría en Neurociencias y personal del laboratorio del Instituto de Genética y del Centro de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá D.C. donde se realizó la microscopía confocal.

Por último y no menos importante, a mi hermano Jorge Ignacio Villa Hernández por brindarme su apoyo y amor incondicional.

Muchas gracias a todos

Mutaciones en el gen PINK1 causan enfermedad de Parkinson. Los síntomas no motores de la enfermedad, como la depresión, demencia y trastornos del sueño probablemente son la consecuencia de la degeneración de los sistemas sinápticos dopaminérgicos y no dopaminérgicos. La deficiencia de PINK1 afecta la plasticidad sináptica de las neuronas del hipocampo. La sinapsis excitatoria entre las neuronas está mediada por conexiones sinápticas entre axones y dendritas, y la mayoría de las sinapsis excitatorias se producen en protuberancias ricas en actina de las dendritas llamadas espinas dendríticas. Las espinas son estructuras dinámicas y la eficacia de la sinapsis está estrechamente relacionada con la morfología de la espina. Las anomalías en el tamaño, forma y número de espinas son comunes en enfermedades neurológicas como el autismo, esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, se desconoce si mutaciones de PINK1 pueden afectar las espinas de las neuronas. Para evaluar si el silenciamiento de PINK1 tiene algún efecto sobre la dinámica de espinas de las neuronas del hipocampo, cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón se transfectaron con plásmidos para silenciar PINK1 y expresar GFP. El análisis de las imágenes de las neuronas obtenidas por microscopía confocal mostró que el silenciamiento de PINK1 aumentó la densidad de espinas y desarrolló más espinas Thin, mientras que no tuvo ningún efecto sobre la densidad de los Filopodios y espinas Stubby y Mushroom. Además, el silenciamiento de PINK1 redujo la cabeza de las espinas Stubby. El análisis de la expresión de proteínas sinápticas por Western blot mostró que el silenciamiento de PINK1 disminuyó la expresión de las proteínas postsinápticas PSD95 y Shank y la expresión de los receptores de glutamato NR2B y mGluR5, mientras que aumentó la expresión de las proteínas reguladoras del citoesqueleto RhoGAP29 y ROCK2. Detectamos que el silenciamiento de PINK1 reguló proteínas presinápticas disminuyendo la expresión de Syn1 y aumentando la expresión de vGluT1. Y encontramos que el silenciamiento de PINK1 disminuyó la activación de Akt. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de PINK1 puede desviar el funcionamiento sináptico de las neuronas de hipocampo a través de la regulación de la morfología de las espinas. La dinámica de espinas causada por el silenciamiento de PINK1 podría generar efectos sutiles en la neurotransmisión de las neuronas de hipocampo. Estos efectos eventualmente pueden conducir a la neurodegeneración y deterioro cognitivo que a menudo se observa en la enfermedad

de Parkinson.

Palabras clave: PINK1, Espinas Dendríticas, Sinapsis, Neuronas de hipocampo, Enfermedad de Parkinson.

PINK1 mutations cause Parkinson's disease. The non-motor symptoms of disease such as depression, dementia and sleep abnormalities are probably the consequence of the degeneration of the dopaminergic and non-dopaminergic synaptic systems. PINK1 deficiency impairs the synaptic plasticity of hippocampal neurons. Neuron communication is mediated by synaptic connections between axons and dendrites, and most of the excitatory synapses occur in actin-rich protrusions in dendrites called dendritic spines. Spines are dynamic structures and the strength of the synapse is closely related to spine morphology. Abnormalities in size, shape and number of spines are common in neurological diseases such as autism, schizophrenia and Alzheimer's disease. However, whether mutations of PINK1 can affect neuron spines is unknown. To assess whether silencing of PINK1 has any effect on spine dynamics of hippocampal neurons, primary cultures of hippocampal neurons from mice were transfected with plasmids to silence PINK1 and express GFP. Analysis of neuron images obtained by confocal microscopy showed that PINK1 silencing increased spine density and developed more Thin spines, while it had no effect on the density of Filopodia and Stubby and Mushroom spines. In addition, PINK1 silencing reduced the spinehead of Stubby spines. Analysis of synaptic protein expression by Western blot showed that PINK1 silencing decreased the expression of the postsynaptic proteins PSD95 and Shank and the expression of the glutamate receptors NR2B and mGluR5, while increased the expression of the cytoskeleton regulatory proteins RhoGAP29 and ROCK2. We detected that PINK1 silencing regulated presynaptic proteins decreasing the expression of Syn1 and increasing the expression of vGluT1. And we found that PINK1 silencing decreased Akt activation. These results suggest that PINK1 silencing can divert synaptic functioning of hippocampal neurons through regulation of spine morphology. The spine dynamics caused by PINK1 silencing could generate subtle effects in neurotransmission of hippocampal neurons. These effects can eventually lead to neurodegeneration and the cognitive decline that is often seen in Parkinson's disease.

Keywords:PINK1, Dendritic spines, synapses, hippocampal neurons, Parkinson's disease.

Resumen	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	x
Lista de Tablas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Enfermedad de Parkinson	3
2.2. PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)	3
2.3. PINK1 y funciones mitocondriales	4
2.4. PINK1 y funciones citosólicas	5
2.5. PINK1 y sinapsis del circuito del estriado	7
2.6. Enfermedad de Parkinson y modificaciones de sinapsis glutamatérgicas	9
2.7. Enfermedades neurológicas y modificaciones de espinas dendríticas	10
2.8. Espinas dendríticas	11
2.9. Dinámica de espinas dendríticas	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo General	19
4.2. Objetivos Específicos	19

5. METODOLOGÍA	20
5.1. Materiales	20
5.1.1. Reactivos	20
5.1.2. Equipos	23
5.2. Diseño del estudio	23
5.3. Procedimiento	24
5.3.1. Cultivo primario de neuronas de hipocampo	24
5.3.2. Transformación de bacterias y purificación de los plásmidos	25
5.3.3. Transfección de las células	25
5.3.4. Fijación de las neuronas	25
5.3.5. Análisis de las espinas dendríticas	26
5.3.6. Lisado de las células y cuantificación de proteína	27
5.3.7. Western blot	28
5.3.8. Análisis de los datos	28
6. RESULTADOS	29
6.0.1. Silenciamiento de PINK1 en neuronas de hipocampo de ratón	29
6.0.2. El silenciamiento de PINK1 aumenta la densidad y regula la morfología de las espinas de las neuronas de hipocampo de ratón	31
6.0.3. El silenciamiento de PINK1 disminuye el tamaño de la cabeza de las espinas de las neuronas de hipocampo de ratón	31
6.0.4. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de proteínas de la densidad postsináptica de las neuronas de hipocampo de ratón	32
6.0.5. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de receptores de glutamato de las neuronas de hipocampo de ratón	33
6.0.6. El silenciamiento de PINK1 aumenta la expresión de proteínas reguladoras de la organización de actina de las neuronas de hipocampo de ratón	34
6.0.7. El silenciamiento de PINK1 regula la expresión de proteínas presinápticas de las neuronas de hipocampo de ratón	35
6.0.8. El silenciamiento de PINK1 no afecta la expresión de Akt, aunque disminuye su fosforilación, de las neuronas de hipocampo de ratón	36
7. DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	49
Anexo A: Dificultades con la adhesión de las células	50
Anexo B: Dificultades con experimentos de inmunofluorescencia 1	52
Anexo C: Dificultades con experimentos de inmunofluorescencia 2	54
BIBLIOGRAFÍA	56

LISTA DE FIGURAS

2.1. Dominios e isoformas de PINK1	4
2.2. Modelo de la importación y procesamiento de PINK1 en la mitocondria	5
2.3. Diagrama esquemático que ilustra los efectos mitocondriales de la de- ficiencia de PINK1	6
2.4. PINK1 promueve la actividad sináptica	7
2.5. PINK1 promueve la diferenciación neuronal	8
2.6. Clasificación morfológica de las espinas dendríticas	12
2.7. Variabilidad morfológica de las espinas	13
2.8. Algunos componentes importantes de las espinas dendríticas	16
5.1. Transfección de cultivos primarios de neuronas de hipocampo	26
6.1. Estandarización del silenciamiento de PINK1 en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón.	30
6.2. Efectos del silenciamiento de PINK1 sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas	32
6.3. El silenciamiento de PINK1 disminuye el tamaño de cabeza de las espinas de las neuronas de hipocampo	33
6.4. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de las proteínas de la densidad postsináptica PSD95 y Shank	34
6.5. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de los receptores de glutamato NR2B y mGluR5	35
6.6. PINK1 regula la expresión de RhoGAP29 y ROCK2, proteínas regu- ladoras de la organización de actina	36
6.7. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de Syn1 y aumenta la expresión de vGluT1	37
6.8. El silenciamiento de PINK1 no afecta la expresión, pero sí la fosfori- lación de Akt	37

7.1. Modelo del efecto de PINK1 sobre la espina dendrítica	48
1. Transfección de cultivos primarios de neuronas de hipocampo	51
1. Regulación de proteínas sinápticas	53
1. Transfección de cultivos primarios de neuronas de hipocampo	55

LISTA DE TABLAS

5-1. Composición del medio	21
5-2. Secuencias de los constructos de los plásmidos	21
5-3. Anticuerpos primarios para Western Blot	22
5-4. Anticuerpos secundarios para Western Blot	22
5-5. Composición de la mezcla de la transfección	27

LISTA DE ABREVIATURAS

Unidad	Término
---------------	----------------

<i>% p/p</i>	porcentaje peso/peso
<i>°C</i>	grados centígrados
<i>g</i>	gramos
<i>h</i>	horas
<i>kb</i>	kilobases
<i>kDa</i>	kiloDalton
<i>μL</i>	microlitros
<i>μM</i>	micromolar
<i>μm</i>	micrómetros
<i>mg</i>	miligramos
<i>mL</i>	mililitros
<i>mm</i>	milímetros
<i>mM</i>	milimolar
<i>mV</i>	milivoltios
<i>min</i>	minutos
<i>ng</i>	nanogramos

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

<i>Akt</i>	protein kinase B
<i>ARPC2</i>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2
<i>BCA</i>	Bicinchoninic Acid
<i>BSA</i>	Bovine serum albumin
<i>DA</i>	Dopamine
<i>DIV</i>	Días in vitro

<i>DJ-1</i>	Protein deglycase DJ-1
<i>DNA</i>	Deoxyribonucleic acid
<i>EP</i>	Enfermedad de Parkinson
<i>EA</i>	Enfermedad de Alzheimer
<i>F – actin</i>	Fibras de actina
<i>GFP</i>	Green Fluorescent Protein
<i>GSDB</i>	Goat Serum Dilution Buffer
<i>HBSS</i>	Hanks' balanced salt solution
<i>Hsp90</i>	Heat-shock protein 90
<i>HtrA2</i>	High temperature requirement protein A2
<i>LB</i>	Luria-Bertani medium
<i>LDH</i>	Lactate dehydrogenase
<i>LIM1</i>	LIM domain kinase 1
<i>LRKK2</i>	Leucine-rich repeat kinase 2
<i>MAP2B</i>	Microtubule-associated protein-2B
<i>LTD</i>	Long Term Depression
<i>LTP</i>	Long Term Potentiation
<i>mGluR5</i>	metabotropic Glutamate Receptor 5
<i>MPP</i>	Mitochondrial processing protease
<i>NMDA</i>	N-Methyl-D-aspartic acid
<i>NSF</i>	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
<i>NSF-1</i>	Neural Survival Factor-1
<i>Opa</i>	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial
<i>P0</i>	Postnatal day 0
<i>PARL</i>	Mitochondrial intra-membrane protease presenilin-associated rhomboid-like protein
<i>PARK3</i>	Parkinson disease 3 (Lewy body)
<i>Parkin</i>	Parkin E3 ubiquitin protein ligase
<i>PINK1</i>	PTEN-induced putative kinase 1
<i>PKA</i>	Protein kinase A
<i>PNGM</i>	Primary Neuron Growth Medium
<i>PSD95</i>	Postsynaptic density protein 95
<i>PVDF</i>	Polyvinylidene difluoride membrane
<i>RhoA</i>	Ras homolog gene family, member A
<i>ROCKII</i>	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2
<i>RNAi</i>	RNA interference
<i>RNA_m</i>	RNA mensajero
<i>ROS</i>	Reactive Oxygen Species
<i>SDS-PAGE</i>	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<i>Shank</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein
<i>shRNA</i>	small hairpin Ribonucleic Acid
<i>SNCA</i>	Synuclein alpha

<i>Syn1</i>	Synapsin 1
<i>TBS</i>	Tris-buffered saline
<i>TH</i>	Tyrosine Hydroxylase
<i>TRAP1</i>	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial
<i>UCH-L1</i>	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
<i>vGluT1</i>	vesicular Glutamate Transporter 1

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) (MIM 168600) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer (EA) [1]. En Colombia existen aproximadamente 220.000 personas con EP. Los síntomas que presentan los pacientes incluyen temblores, bradicinesia y rigidez. En etapas posteriores de la enfermedad, muchos pacientes también pueden sufrir de problemas cognitivos y psiquiátricos. Actualmente, la población anciana tiene una tendencia mundial a aumentar por lo que se estima que en los próximos años la EP aumentará su prevalencia actual, convirtiéndose así en un serio problema de salud pública.

No se conoce una causa específica de la enfermedad en la mayoría de los pacientes con EP [2]. Aunque se han identificado algunas formas hereditarias de la enfermedad causadas por genes específicos: α -sinucleína, Parkin, DJ1, UCHL-1, LRRK2, HtrA2/omi y PINK1 [3]. Mutaciones de pérdida de función en el gen PINK1 representan la segunda causa más común de EP recesiva de inicio temprano [4]. Algunas veces, mutaciones de PINK1 se transmiten dentro de una misma familia causando EP en muchos de sus miembros. Otras veces, mutaciones de PINK1 están presentes en personas sin antecedentes familiares poniendo a estas personas en mayor riesgo de desarrollar la enfermedad [2].

Se desconoce cómo mutaciones en PINK1 causan EP. Una hipótesis es que mutaciones en PINK1 resultan en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas debido a la acumulación de proteínas mal plegadas y la formación de cuerpos de Lewy [1]. Otra hipótesis es que mutaciones en PINK1 resultan en una mayor vulnerabilidad a la disfunción mitocondrial inducida por estrés y estímulos apoptóticos [4]. Recientemente, se han identificado funciones fisiológicas de PINK1 que podrían verse afectadas por mutaciones [5]. Algunas funciones fisiológicas de PINK1 se han vinculado con la diferenciación y crecimiento del árbol dendrítico [6], la activación de factores de transcripción de supervivencia celular [5], la activación de la vía de señalización de Akt [7] y la regulación de la transmisión sináptica [8].

Funciones de PINK1 regulando la transmisión sináptica se han vinculado con deficiencias presinápticas [8–10]. PINK1 debilita la transmisión sináptica debido a anomalías presinápticas mediadas por ATP [11]. Anomalías postsinápticas de distintas enfermedades neurológicas se deben a deficiencias de la densidad o morfología de las espinas dendríticas [12]. Se desconoce si mutaciones de PINK1 pueden afectar las espinas dendríticas de las neuronas.

Para probar si la deficiencia de PINK1 tiene algún efecto sobre las espinas dendríticas de las neuronas de hipocampo, cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón se transfectaron con plásmidos para silenciar PINK1 y expresar GFP. Para analizar cómo la deficiencia de PINK1 puede afectar las espinas dendríticas, se analizó la expresión de proteínas sinápticas por Western blot. Para calcular la densidad y clasificar la morfología de las espinas dendríticas, se analizaron las imágenes de las neuronas obtenidas por microscopía confocal. Las neuronas de hipocampo se obtuvieron de los cerebros de neonatos de ratón cultivadas por 13 DIV. Estas neuronas son células postmitóticas que desarrollan espinas dendríticas, pasan por los distintos estados de diferenciación y forman conexiones sinápticas excitatorias bien establecidas [75].

Esta investigación está enfocada a comprender los mecanismos de plasticidad sináptica de las neuronas de hipocampo de ratón deficientes de PINK1. Se reportan los datos de tres experimentos independientes. Los resultados de esta investigación pueden generalizarse a las neuronas de hipocampo debido a que los mecanismos de plasticidad sináptica estudiados en las neuronas de hipocampo de ratón son comunes entre los mamíferos. De esta forma, el análisis de los datos reportados puede utilizarse en futuras investigaciones dirigidas a comprender las causas neuropatológicas de las mutaciones de PINK1 y de la enfermedad de Parkinson.

2.1. Enfermedad de Parkinson

La EP es un trastorno neurológico común en el que los pacientes desarrollan rigidez, temblor, lentitud de movimiento y dificultad para mantener el equilibrio. Se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta en el tronco cerebral [13]. Los síntomas motores de los pacientes con EP sólo son evidentes después de que más del 50 % de las neuronas dopaminérgicas han muerto [14]. Estas neuronas liberan dopamina (DA) para suprimir hiperactividad en el globo pálido y núcleo subtalámico. Estos efectos inhibitorios se pierden cuando estas neuronas mueren, causando hiperactividad neuronal y los síntomas motores [15].

La causa de la EP aún se desconoce. Es probable que sea el resultado de la interacción de múltiples factores como envejecimiento, susceptibilidad genética o exposición a factores ambientales. Una persona puede desarrollar EP de forma esporádica en el 90 % de los casos, mientras que en el 10 % restante, la EP puede ser hereditaria [2]. En el 5 % de los pacientes con EP, la enfermedad fue causada por mutaciones en uno de varios genes específicos –esto explica las formas mendelianas de la enfermedad. Estos genes se agrupan si la EP es autosómica dominante (SNCA, PARK3, UCH-L1, LRRK2) o autosómica recesiva (PARKIN, DJ-1, PINK1) [1, 4].

2.2. PINK1

El gen PINK1 codifica una proteína quinasa serina/treonina acompañada de un dominio de unión mitocondrial que puede anclarla a la membrana mitocondrial externa y un dominio regular que afecta su localización [16]. Tiene dos sitios de clivaje: uno en el dominio de unión mitocondrial y otro en el dominio regulatorio, los cuales dan lugar a tres isoformas (figura 2.1). En condiciones basales, gran parte de PINK1 se importa a la mitocondria para su clivaje por



Figura 2.1: Dominios e isoformas de PINK1. Dominio mitocondrial (MTS, residuos 1-77), dominio transmembranal (TM, residuos 94-110), dominio quinasa Serina/Treonina (residuos 156-511) y dominio C-terminal regulatorio (residuos 511-581). Arriba se muestra la isoforma inmadura (63 kDa) y en el centro y abajo las 2 isoformas maduras: sin dominio mitocondrial(54 kDa) y sin dominio regulatorio (45 kDa) respectivamente.

proteasas [17], exportando las formas maduras al citosol donde pueden ser degradadas o estabilizadas [5] (figura 2.2). Mutaciones homocigóticas en este gen causan un tipo de EP hereditaria de inicio temprano, mientras que mutaciones heterocigóticas aumentan la susceptibilidad de tener EP esporádica [18]. PINK1 confiere resistencia contra la estaurosporina, la C2-ceramida y neurotoxinas asociadas a la EP: MPTP y 6-hidroxidopamina (OHDA) [4, 19, 20]. PINK1 puede inhibir apoptosis a través de varias vías [21, 22], incluyendo la vía de señalización de Akt [7, 23].

2.3. PINK1 y funciones mitocondriales

En condiciones patológicas donde el potencial de membrana mitocondrial se ha desestabilizado, la isoforma completa de PINK1 permanece en la membrana externa de las mitocondrias [5]. PINK1 regula la función y morfología mitocondrial [24], almacenamiento de Ca^{+2} mitocondrial, transporte mitocondrial y mitofagia [25–27]. La protección mitocondrial conferida por la localización de PINK1 en la membrana externa de las mitocondrias se asocia al reclutamiento y activación de Parkin, una E3 ubiquitina ligasa que media el marcaje y degradación de proteínas vía lisosoma [28]. El complejo PINK1/Parkin interviene en la protección de las células ante varios estímulos tóxicos [29].

Por ejemplo, en células SH-SY5Y silenciadas para PINK1, los niveles de DNA mitocondrial y la síntesis de proteínas disminuyen afectando el funcionamiento de la cadena respiratoria [30]. En neuronas de ratones knockout para PINK1, el potencial de membrana mitocondrial se desestabiliza, causando la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial y liberando proteínas proapoptóticas [22]. Los niveles de Ca^{2+} intracelular y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) incrementan, afectando la disponibilidad de glucosa y aumentando la vulnerabilidad a la muerte neuronal [25] (figura 2.3). De este modo, la deficiencia de PINK1 compromete la viabilidad celular y aumenta la vulnerabilidad mitocondrial.

PINK1 regula el transporte mitocondrial a través de los microtúbulos al formar un complejo con las proteínas Miro y Milton [32]. Mutaciones de PINK1 inhiben la formación de este comple-

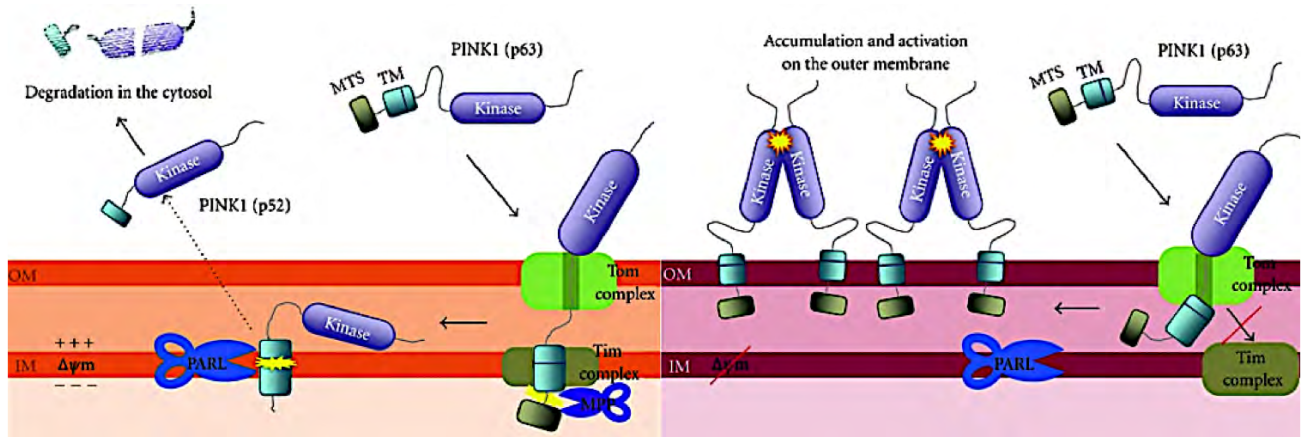


Figura 2.2: Modelo de la importación y procesamiento de PINK1 en la mitocondria. **Izquierda:** En condiciones basales, la forma inmadura de PINK1 (63 kDa) se importa a la membrana interna mitocondrial a través de los complejos Tom y Tim. Allí, MPP cliva el dominio de unión mitocondrial y genera PINK1 (54 kDa). Luego, PARL cliva el dominio C-terminal y genera PINK1 (45 kDa). Las formas maduras de PINK1 se liberan al citosol y pueden estabilizarse o degradarse. **Derecha:** En condiciones de estrés mitocondrial, PINK1 se acumula y autoactiva en la membrana externa [31].

jo, deteniendo el transporte mitocondrial y alterando las funciones que demandan altas cargas energéticas [33]. PINK1 también regula la dinámica de fusión y fisión mitocondrial [34]. Mutaciones de PINK1 en *Drosophila* producen mitocondrias anormales: hinchadas y alargadas, formando redes mitocondriales en los tejidos con alta demanda energética [35]. De la misma forma, en ratones deficientes de PINK1, el tamaño de las mitocondrias incrementa anormalmente [36]. En ambos casos, la deficiencia de PINK1 produce disfunción mitocondrial e interrumpe los procesos de fusión y fisión generando mitocondrias anormales que no se degradan eficientemente cuando se incrementa la demanda energética o bajo condiciones de estrés celular, causando así muerte celular [24].

2.4. PINK1 y funciones citosólicas

En condiciones basales, PINK1 permanece principalmente en el citosol después de que se metaboliza en la mitocondria [5]. PINK1 se traduce en el citosol y puede unirse a la mitocondria o estabilizarse en el citosol. La mitocondria libera las isoformas maduras de PINK1 que pueden degradarse via lisosoma o estabilizarse en el citosol a través de la chaperona heat-shock protein 90 (Hsp90) [5]. PINK1 puede estar involucrado en la regulación de distintas vías de señalización dependiendo de la localización subcelular. Cuando se encuentra en la mitocondria, PINK1 puede proteger a las mitocondrias y ayudar a su degradación por mitofagia, mientras que cuando está en el citosol, participa en la activación de vías de supervivencia [23], regula la transmisión sináptica [9], interviene en la síntesis y liberación de DA [8,37] y modula la morfología del árbol dendrítico [6].

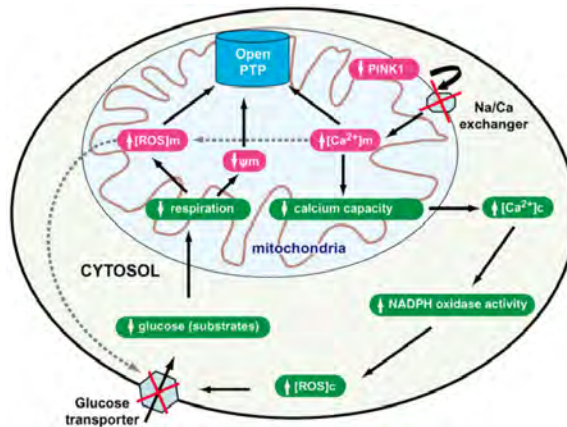


Figura 2.3: Diagrama esquemático que ilustra los efectos mitocondriales de la deficiencia de PINK1. La deficiencia de PINK1 incrementa la concentración de Ca^{2+} mitocondrial y reduce la capacidad de almacenarlo debido a la anomalía del transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Esto incrementa la concentración de Ca^{2+} citosólico, lo que activa la oxidasa NADPH e la producción de ROS. Se disminuye el consumo y disponibilidad de glucosa, reduciendo la respiración y despolarizando la membrana mitocondrial [25]).

En nuestro grupo de investigación hemos encontrado que PINK1 hace parte de la vía de señalización de supervivencia activada por el receptor IGF1 [23]. El silenciamiento de PINK1 disminuye la supervivencia de células mesencefálicas. Cuando se activa la vía de supervivencia de PI3K/Akt exponiendo a las células al factor de crecimiento IGF1, el silenciamiento de PINK1 inhibe la fosforilación del receptor IGF1, es decir, inhibe su activación. El silenciamiento de PINK1 inhibe la activación de Akt y otras proteínas efectoras de la protección celular [23]. Por otro lado, también hemos encontrado que la sobreexpresión de PINK1 protege a estas células de la neurotoxicidad producida por C2-ceramida [38]. PINK1 protege a estas células de dos formas: contrarresta la inhibición de la activación de Akt e inhibe de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida por la toxina, disminuyendo así la expresión de proteínas asociadas a muerte celular activadas por daño mitocondrial [38].

PINK1 regula la liberación de DA de neuronas del circuito negroestriado de ratones [8]. La sinapsis de las neuronas espinosas medianas del estriado reciben entradas excitatorias de las neuronas de la corteza, como también entradas moduladoras de las neuronas dopaminérgicas, principal objetivo de la DA de las neuronas de la sustancia negra. La deficiencia de PINK1 disminuye la liberación de DA estimulada por potenciación a largo plazo. Esta anomalía en la liberación de DA no se debe a una reducción de las neuronas dopaminérgicas, ni a una reducción de la síntesis de DA o receptores dopaminérgicos. Sin embargo, la deficiencia de PINK1 debilita la plasticidad sináptica de las neuronas espinosas medianas. En particular, la inducción de potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) se debilita a causa de la disminución de la liberación de DA. Se presume que esta disminución de DA se debe a un defecto en el proceso de exocitosis [8] (figura 2.4).

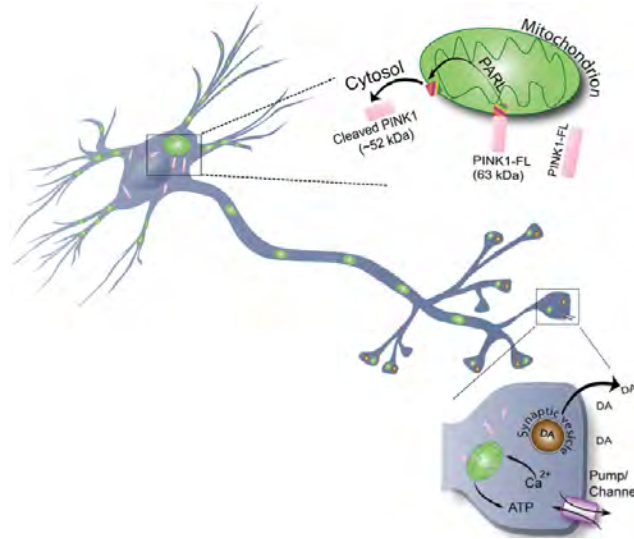


Figura 2.4: PINK1 promueve la actividad sináptica. En condiciones basales, PINK1 está presente en las mitocondrias y el citosol. La forma completa de PINK1 es clivada por PARL y liberada al citosol. PINK1 citosólico promueve el transporte anterógrado mitocondrial hacia los botones sinápticos, resultando en una liberación normal de dopamina. Bajo condiciones patológicas, PINK1 permanece sin clivar en la mitocondria debilitando la liberación de dopamina [39].

El silenciamiento de PINK1 reduce la longitud de las dendritas y simplifica la complejidad del árbol dendrítico de neuronas de la corteza de ratón [6]. El silenciamiento de PINK1 también inhibe la formación de sinapsis mediante la inhibición de la vía de señalización de la proteína quinasa A (PKA) (figura 2.5). La inhibición de la vía de señalización de PKA reduce el nivel de expresión de las proteínas proteína asociada al microtúbulo-2B (MAP2B), asociada con el crecimiento de las dendritas y proteína de la densidad postsináptica 95 (PSD95), una proteína de soporte de la densidad postsináptica. Los autores proponen que la inhibición del crecimiento y complejidad del árbol dendrítico de las neuronas debida al silenciamiento de PINK1 es mediada por las mitocondrias ubicadas en las dendritas. Específicamente, el silenciamiento de PINK1 disminuye el transporte mitocondrial anterógrado e inhibe la vía de señalización de PKA. Esta clase de alteraciones en las dendritas y sinapsis puede ayudar a la degeneración de las neuronas y al desarrollo de la EP [6].

2.5. PINK1 y sinapsis del circuito del estriado

La deficiencia de PINK1 puede deteriorar las sinapsis de las neuronas del circuito del estriado [8, 40]. Por un lado, la deficiencia de PINK1 deteriora las sinapsis corticoestriado de las neuronas espinosas mediales y debilita la plasticidad sináptica a largo plazo [8]. Por otro lado, la deficiencia de PINK1 fortalece las sinapsis del circuito corteza-sustancia negra de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra e incrementa la vulnerabilidad a la muerte neuronal

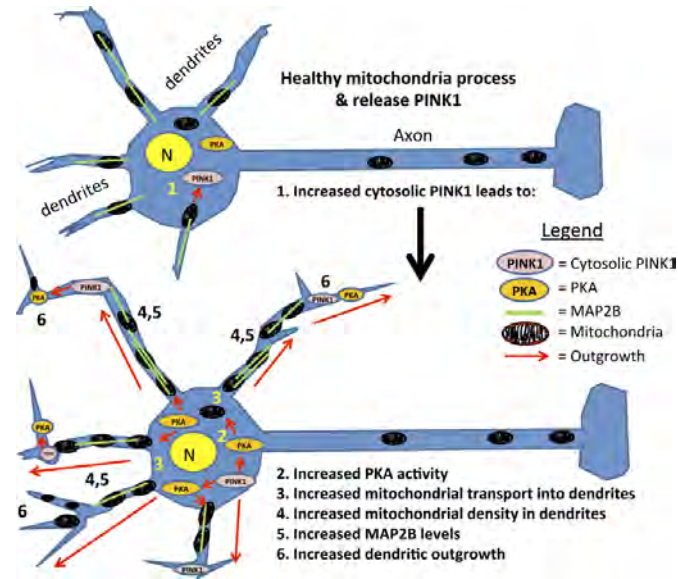


Figura 2.5: PINK1 promueve la diferenciación neuronal. PINK1 citosólico promueve la supervivencia neuronal, revirtiendo el acortamiento de las dendritas y la apoptosis en las neuronas deficientes para PINK1. Este efecto en la supervivencia neuronal es causado por el incremento en la actividad de PKA y el transporte mitocondrial hacia las dendritas. Esto sugiere que la liberación de PINK1 desde la mitocondria podría señalar la diferenciación neuronal en neuronas mesencefálicas y corticales [6].

por excitotoxicidad [40,41]. Estas anomalías sinápticas de las neuronas del del estriado no se asocian a ninguno de los síntomas característicos de los pacientes con EP. De esta forma, estos hallazgos sugieren la deficiencia de PINK1 causa anomalías sutiles, los cuales pueden asociarse a eventos perjudiciales de los primeros estadios del desarrollo de la EP que eventualmente pueden resultar en la degeneración y muerte de estas neuronas.

La deficiencia de PINK1 sobreactiva las neuronas espinosas medianas del estriado de ratón debido al deterioro de las sinapsis dopaminérgicas [8, 42]. La deficiencia de PINK1 disminuye la liberación DA y la expresión de receptores dopaminérgicos en la sinapsis de las neuronas espinosas medianas del estriado que reciben entradas dopaminérgicas de las neuronas de la sustancia negra. Este deterioro del input dopaminérgico incrementa la fuerza de las sinapsis glutamatérgicas [43]. Del mismo modo, en ratones transgénicos con mutaciones heterocigotas de PINK1, la liberación de DA se deteriora cuando se exponen a una dosis no letal de rotenona, una toxina mitocondrial [42]. La dosis de rotenona es tal que no altera la integridad mitocondrial, ni la producción de ATP, así que el deterioro de la plasticidad sináptica en las sinapsis corticoestriado es independiente de la activación de la vía de señalización de muerte neuronal activada por daño mitocondrial [42].

2.6. Enfermedad de Parkinson y modificaciones de sinapsis glutamatérgicas

Existen profundas alteraciones del sistema glutamatérgico en la EP que contribuyen a las deficiencias motoras y cognitivas asociadas con esta enfermedad. Se ha encontrado aumentos de la expresión de transportador vesicular de glutamato 1 (vGluT1) y vGluT2 en las terminales axonales de las sinapsis corticoestriado de las neuronas corticales de cerebros de pacientes con EP [43]. Por el contrario, se encontraron reducciones de la expresión de vGluT1 y vGluT2 de las neuronas de la corteza prefrontal y temporal [43]. Así que las alteraciones glutamatérgicas asociadas a la EP son complejas y pueden depender de qué clase de red neuronal las neuronas hacen parte. Por otro lado, en modelos animales, los ratones transgénicos que expresan mutaciones de Parkin, las neuronas de hipocampo incrementan la expresión de vGluT1 lo que se asocia a un incremento en la fuerza sináptica y proliferación de sinapsis excitatorias [44].

Utilizando un modelo en el que se elimina el input dopaminérgico de las neuronas del estriado de rata, las neuronas espinosas mediales incrementan los niveles de expresión de los NMDARs y disminuyen los niveles de expresión de los AMPARs, lo que resulta en el deterioro funcional del circuito de los basos gangliales de controlar la conducta [45]. Trás la eliminación de la DA que llega al estriado, la liberación espontánea de glutamato incrementa en las sinapsis corticoestriado de estas neuronas. Estos resultados sugieren que el aumento de los eventos sinápticos y el incremento de la expresión de receptores de glutamato pueden estar asociados con los síntomas motores de la EP [45]. Este fenotipo fue similar en los núcleos de salida de los basos gangliales, donde los niveles de AMPARs disminuyeron, pero los niveles de NMDARs no se modificaron [45]. Estos resultados sugieren que las anormalidades de las sinapsis glutamatérgicas debidas a la EP pueden alterar la expresión de receptores glutamatérgicos.

En otro estudio, la deficiencia de PINK1 aumenta la sensibilidad de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) del grupo 2 [42]. El aumento de la sensibilidad de esta clase de receptores se ve reflejado en un aumento de su actividad permitiendo una mayor entrada de Ca^{2+} . La magnitud del aumento de la actividad de los mGluRs del grupo 2 es semejante al aumento producido por la neurotoxina 6-Hydroxydopamina (6OHDA) en ratas y en el en el modelo de ratón deficiente de Parkin [42]. Los mGluRs del grupo 2 se ubican en las terminales axonales de las sinapsis corticoestriado de las neuronas espinosas mediales. Estos hallazgos sugieren que un aumento en la sensibilidad de los mGluRs del grupo 2 puede representar una respuesta compensatoria a la disminución de la sinapsis dopaminérgica [42].

Estos hallazgos sugieren que las alteraciones de las sinapsis glutamatérgicas pueden aumentar la vulnerabilidad a la muerte neuronal por excitotoxicidad. Las anormalidades en el transporte y liberación de glutamato y la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos pueden resultar en un aumento de la concentración de glutamato [46]. El glutamato media la mayoría de las sinapsis excitatorias, pero también puede ser altamente tóxico para las neuronas, fenómeno

conocido como excitotoxicidad. Esta clase de muerte neuronal es el resultado de la estimulación excesiva de los NMDARs y la subsecuente entrada masiva de Ca^{2+} al espacio intracelular. El incremento en el Ca^{2+} intracelular puede activar enzimas dependientes de Ca^{2+} involucradas en el catabolismo de las proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos, como en la síntesis de óxido nítrico. Estos eventos conducen a la muerte neuronal a través de diferentes vías de señalización, incluyendo la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial, producción de radicales libres y alteraciones en el citoesqueleto [40, 47].

La deficiencia de PINK1 incrementa los eventos sinápticos espontáneos mediados por glutamato en el hipocampo. La deficiencia de PINK1 incrementa la liberación de glutamato, aunque se desconoce qué proteínas presinápticas podrían estar involucradas [48]. Por el contrario, la deficiencia de PINK1 no altera la plasticidad sináptica en las sinapsis glutamatérgica de las neuronas de hipocampo [8, 48]. Estos autores proponen un papel novedoso para PINK1 más allá de la fisiología del circuito del estriado. Los cambios sutiles en la transmisión excitadora aquí observados podrían ser un precursor patogénico de la neurodegeneración excitotóxica y el deterioro cognitivo a menudo observado en la EP. Estos resultados sugieren que la deficiencia de PINK1 aumenta la transmisión excitatoria y la liberación de glutamato en el hipocampo [48].

2.7. Enfermedades neurológicas y modificaciones de espinas dendríticas

Ahora bien, un gran número de trastornos cerebrales también están acompañados por cambios en la forma, tamaño o número de las espinas [12]. Al principio se pensaba que una vez que la espina maduraba, ésta permanecía con el mismo tamaño y forma, en unidad sináptica con su terminal axonal por el tiempo de la vida útil de la neurona. Sin embargo, ahora se sabe que las espinas son propensas a distorsiones en su densidad y distribución a través de las dendritas, como también a cambios estructurales y a su destrucción a causa de varias enfermedades del SNC como esquizofrenia, envejecimiento, retardo mental, epilepsia o ciertas enfermedades neurodegenerativas como la EA [49]. Esto lleva a pensar que el número y morfología de las espinas puede servir como un sustrato neuroanatómico común de la patogénesis de un número de trastornos neurodegenerativos.

Se ha reportado que las neuronas de la corteza e hipocampo de cerebros de paciente con EA muestran una disminución del número de espinas y modificaciones en la morfología de las espinas. Estas modificaciones se correlacionan directamente con el deterioro cognitivo que presentan los pacientes con EA. Por un lado, estudios en modelos de ratones doble y triple transgénicos de EA también han demostrado la pérdida y alteraciones de las espinas, especialmente en neuronas cercanas a las placas amiloideas [50], presentando pérdida temprana de neuronas de la corteza a los 4 meses de edad, y posteriormente, pérdida o modificaciones morfológicas de espinas dendríticas. Por otro lado, en cultivos de neuronas de hipocampo, se han encontrado, tras la

exposición a formas tóxicas de amiloide β , reducciones de la expresión de NMDARs y EphB2, alteraciones de la densidad y morfología de las espinas y disminuciones de la expresión de proteínas del citoesqueleto.

Las lesiones traumáticas y enfermedades neurodegenerativas causan anomalías de la densidad, longitud y estabilidad de las espinas [49]. De la misma manera, la desnutrición, exposición a alcohol o toxinas, infección, trastornos del espectro del autismo y trastornos hereditarios que resultan en retraso mental (Down's and fragile-X spectrum syndrome) causan alteraciones de las espinas en los cerebros en desarrollo [12]. Si las espinas son parte fundamental de la maquinaria de la transmisión sináptica, su degeneración pueden constituir uno de los eventos clave para la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas [51].

Algunas neurotoxinas usadas para modelar la EP tienen efectos adversos sobre la dinámica de espinas dendríticas [52, 53]. La exposición a 6-OHDA resulta en una rápida y profunda pérdida de las espinas y sinapsis glutamatérgicas de las neuronas espinosas mediales del estriado [52]. Del mismo modo, la exposición a MPTP resulta en una disminución de la densidad de las espinas y arborización dendrítica de las neuronas espinosas mediales del estriado. Estos resultados sugieren que las neuronas del estriado forman estructuras para controlar motoras puede ser un punto de origen de la actividad patológica responsable de los síntomas de la EP [52].

La deficiencia de PINK1 aumenta la densidad de espinas dendríticas y la vulnerabilidad a la muerte neuronal por excitotoxicidad de las neuronas de hipocampo de rata [54]. Los autores proponen que el aumento de la densidad de espinas puede ser causado por una mayor densidad mitocondrial. PINK1 regula la dinámica de fusión y fisión mitocondrial de tal manera que la sobreexpresión de PINK1 fisiona las mitocondrias, mientras que la deficiencia de PINK1 las fusiona. PINK1 afecta el número de espinas dendríticas sugieren que PINK1 regula la morfología de la sinapsis y posiblemente la fuerza sináptica la cual juega un papel crítico en la regulación de la vulnerabilidad neuronal a la excitotoxicidad. [54].

2.8. Espinas dendríticas

La sinapsis es esencial para la transmisión de información entre las neuronas y puede definirse como el proceso por el cual el neurotransmisor se libera desde la terminal axonal de la neurona presináptica para unirse y activar los receptores de la neurona postsináptica. La sinapsis se compone de la terminal axonal de la neurona presináptica donde se localiza la zona activa y se encuentran las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisor. La sinapsis también se compone de la dendrita de la neurona postsináptica, la cual contiene la densidad postsináptica donde se ubican los receptores, proteínas de andamiaje y maquinaria de señalización. Entre la terminal axonal y la dendrita existe un espacio sináptico en donde el neurotransmisor se libera. La transmisión sináptica puede incrementar o disminuir por medio de la actividad celular. La ac-

tividad celular puede hacer que las dendritas incrementen su longitud, complejidad y superficie receptiva. La complejidad de las dendritas refleja el número de potenciales conexiones sinápticas que una neurona puede recibir. Estas conexiones sinápticas pueden formarse directamente en el soma, en la dendrita o en estructuras sinápticas especializadas llamadas espinas dendríticas [55].

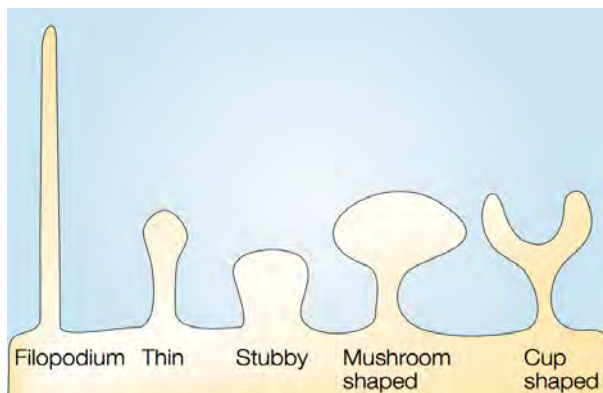


Figura 2.6: Clasificación morfológica de las espinas dendríticas. Dibujos esquemáticos de la morfología de las espinas dendríticas clasificadas forma y función desde espinas inmaduras, Filopodia y Thin hasta espinas maduras, Stubby, Mushroom y Cup shaped. [55].

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias ricas en actina que surgen del árbol dendrítico de varios tipos de neuronas del SNC de los mamíferos y forman la estructura postsináptica de la mayoría de las sinapsis excitatorias. Las espinas son estructuras dinámicas y la fuerza de la sinapsis está estrechamente relacionada con la morfología de la espina. Se piensa que cambios en el número y morfología en las espinas dendríticas acompaña la formación, mantenimiento y eliminación de las sinapsis, lo que permite el establecimiento y consolidación de la conectividad dentro de los circuitos neuronales [50]. Ramón y Cajal define a las espinas como “los receptores principales de entradas sinápticas en las neuronas” [56] (figura 2.6).

Aunque el tamaño y la forma de las espinas son heterogéneos, todas las espinas se componen de una pequeña cabeza que se une a la dendrita por medio de un estrecho cuello. Si la cabeza hace contacto con la terminal axonal, las dos neuronas hacen sinapsis: terminal axonal y densidad postsináptica. Las espinas pueden ser tan largas como $3\mu\text{m}$ desde la dendrita hasta la parte superior de la cabeza. La cabeza es redonda y puede llegar a medir entre 0.2 y $1.5\mu\text{m}$ de diámetro. Y pueden tener hasta 1 femtolitro de volumen. La heterogeneidad de las espinas en tamaño y forma sugiere un alto grado de diversidad funcional [57].

La densidad de las espinas de las neuronas de hipocampo varía entre 1 a 10 protuberancias por micrómetro (μm) a lo largo de la dendrita. Las neuronas de hipocampo pueden tener miles de espinas a lo largo de su arborización [58, 59]. El volumen de la cabeza de la espina es directamente proporcional a la fuerza de la sinapsis, la cual es directamente proporcional al área de la densidad postsináptica y el número de vesículas en la terminal axonal. La morfología de la

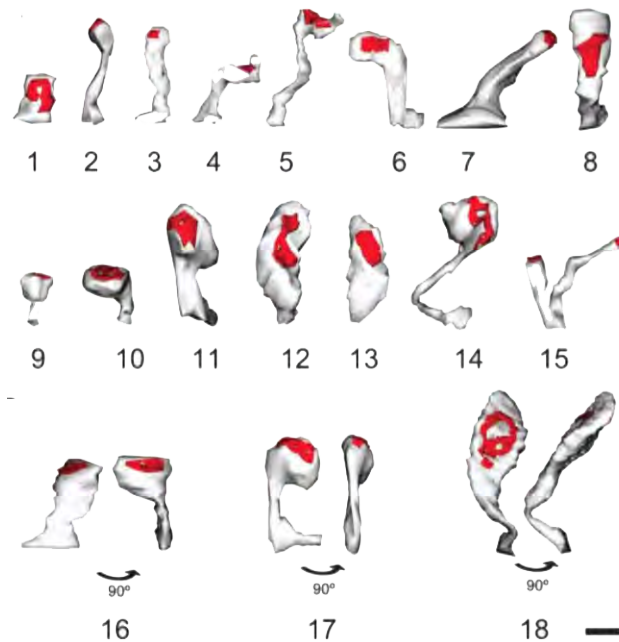


Figura 2.7: Variabilidad morfológica de las espinas. Recontrucción 3D de las espinas ilustrando su variabilidad morfológica: Stubby (1), Thin (2), Mushroom (9 – 11) y Cup-shaped (15) y atípicas (3 – 8), (12 – 14). Algunas espinas parecen tener una morfología diferente dependiendo del ángulo de observación (16 – 18). La escala de barra es $0.5\mu m$ [57].

cabeza y el cuello no se relacionan, como tampoco se relacionan la longitud y diámetro del cuello de la espina. No obstante, el tamaño de la cabeza de la espina varía en función de la distancia interespina [56].

Las espinas muestran una gran diversidad de morfologías. Aunque esta diversidad es parte de un continuum, las espinas pueden clasificarse morfológicamente en tres tipos esenciales: espinas delgadas (Thin), espinas con forma de hongo (Mushroom) y espinas cortas sin cuello (Stubby) [60]. Cuando una misma espina hace contacto sináptico con dos terminales axonales, la espina se divide y tiene forma de copa (Cup shaped). Las espinas Thin son las más comunes y tienen un cuello largo delgado y una pequeña cabeza hinchada. Las espinas Mushroom son aquellas con una cabeza grande y típicamente se encuentran en los cerebros adultos. Las espinas Stubby no tienen cuello y particularmente sobresalen durante el desarrollo postnatal, aunque también se encuentran en los adultos. El Filopodio es el estado inmaduro de la espina en las neuronas piramidales [55] (figura 2.7).

2.9. Dinámica de espinas dendríticas

Los filamentos de actina de las espinas dendríticas interactúan con los receptores de la densidad postsináptica y otras proteínas transmembranales regulando la densidad y morfología de las espinas dendríticas [61]. La principal base estructural de la morfología de las espinas la pro-

porciona los filamentos de actina. La actina es una proteína monomérica (G-actina) que regula la estructura, motilidad y estabilidad celular. Una variedad de proteínas de unión y regulación de la actina ayudan a determinar el grado de polimerización de los monómeros de actina (G-actina) y despolimerización de los filamentos de actina (F-actina) en las espinas. La densidad postsináptica contiene varias proteínas reguladoras de la actina como RhoGTPases, ROCK2, profilina y cofilina que controlan el grado y velocidad de la polimerización de la actina y están involucradas en los procesos de plasticidad sináptica [62].

Las espinas se desarrollan y maduran antes de formar contactos sinápticos funcionales [63]. Durante la espinogénesis, las dendritas espinosas brotan y retraen rápidamente los Filopodios, protuberancias membranosas alargadas que carecen de densidad postsináptica. Los Filopodios son espinas inmaduras que eventualmente desarrollan sinapsis. A medida que los Filopodios maduran se transforman en espinas Thin, la cual tiene densidad postsináptica. Las espinas maduras son las espinas Stubby y Mushroom. Las espinas requieren maduración después de su formación para desarrollar sinapsis. Los Filopodios son espinas inmaduras sin cabeza, sólo cuello que tienen una capacidad de señalización deteriorada, mientras que las espinas maduras tienen cabezas y cuellos estables [64]. La polimerización de actina causada por la actividad sináptica, resulta en el agrandamiento de la cabeza de la espina [59, 61]. En el cuello de las espinas maduras, los filamentos de actina forman paquetes largos alargando la espina [55, 56, 65]. Esta geometría de cabeza y cuello de la espina permite la compartimentalización de Ca^{2+} dependiente del NMDARs, el cual es un determinante importante de la transmisión sináptica. De esta manera, la dinámica de los filamentos de actina está estrechamente relacionada con la plasticidad sináptica morfológica y la eficacia sináptica de las neuronas de hipocampo [66].

El equilibrio entre G-actina y F-actina tiene efectos sobre la formación y pérdida de espinas dendríticas, así como sobre los cambios en la morfología y densidad. Las dos formas de actina se encuentran en las espinas regulando su estructura y motilidad [55]. Las espinas también cambian de forma en respuesta a la actividad sináptica. La potenciación a largo plazo (LTP) cambia el equilibrio de la actina formando F-actina, lo que incrementa el volumen de la cabeza de las espinas. Mientras que la depresión a largo plazo (LTD) cambia el equilibrio hacia la G-actina, disminuyendo el volumen y provocando que se retraiga [56, 67]. De este modo, los cambios en la morfología y motilidad debido a la actividad sináptica están relacionados con reacciones bioquímicas dentro de las espinas dendríticas que incrementan o disminuyen su volumen.

Comúnmente la cabeza de la espina dendrítica forma sinapsis con una terminal axonal [56]. Por un lado, una sinapsis contiene una densidad postsináptica en la cabeza de la espina que contiene y organiza los receptores postsinápticos. Por otro lado, una sinapsis también contiene una zona activa que contiene las vesículas sinápticas [68]. Entre más potente la sinapsis, más grande el volumen de la cabeza y del área de la densidad postsináptica en las espinas y mayor el número de vesículas en la terminal axonal de neuronas de hipocampo [59]. La espina Mushroom contiene una densidad postsináptica más grande que la que tienen las espinas Thin sugiriendo

una mayor cantidad de proteínas sinápticas [65].

Los NMDARs y AMPARs se agrupan en la densidad postsináptica. La densidad postsináptica está compuesta por miembros de la familia de proteínas MAGUK (membrane-associated guanylate kinase), tal como PSD-95, PSD-93, SAP97 y SAP102. Se caracterizadas por tener 3 dominios PDZ, 1 dominio de unión a GK (Guanilate Kinase) y un SH3 (SRC Homology 3), que interactúa con varias proteínas de señalización [69]. Las proteínas MAGUK se localizan casi exclusivamente en la densidad postsináptica de la espina y están involucradas en anclar las proteínas sinápticas. Dentro de las proteínas que se encuentran en la densidad postsináptica están neurologina, NMDARs, AMPARs y canales de K^+ . Las proteínas MAGUK regulan la plasticidad sináptica y estabiliza los cambios sinápticos durante la LTP.

Los NMDARs interactúan con otras proteínas de señalización a través de PSD95 incluyendo GKAP, Shank, Homer, SynGap, SPAR y Cortactin. El complejo NMDAR/PSD95/GKAP/Shank/Cortactin activa la maquinaria de nucleación de actina Arp2/3 resultando en el alargamiento de las espinas dendríticas [67]. Mediante el complejo PSD95/GKAP/Shank/Homer, el NMDAR se enlaza funcionalmente con mGluR5. mGluR5 es un receptor acoplado a proteína G que activa fosfolipasa C y media efectos excitatorios postsinápticos. La activación de fosfolipasa C conduce a la formación de IP3 y diacilglicerol. IP3 puede viajar al retículo endoplásmico, donde induce, a través de la unión a su receptor, la apertura de los canales de calcio, aumentando así las concentraciones de Ca^{2+} citosólico. El diacilglicerol lipófilo permanece en la membrana, actuando como un cofactor para la activación de la PKC. mGluR5 se encuentra en la periferia de la densidad postsináptica lo que indica que pueden haber subcompartimentos dentro de la misma espina [70].

Los NMDARs interactúan funcionalmente con las pequeñas GTPasas RhoA y Rac regulando la dinámica del citoesqueleto de actina y jugando un importante rol en la morfología y motilidad de las espinas dendríticas [62, 67]. La activación de RhoA disminuye la densidad de espinas y la longitud de las espinas, mientras que su inactivación las incrementa. RhoA puede regular el citoesqueleto de actina a través de su principal proteína efectora ROCK (Rho kinase). La vía de señalización que activa RhoA termina regulando los niveles de Cofilin a través de ROCK2 y LIMK, la cual inhibe la polimerización de actina [71]. Por el contrario, la activación de Rac1 produce gran número de espinas, mientras que su inactivación reduce la densidad de espinas y transforma las espinas restantes en Filopodios. Rac1 tiene varios efectores como la quinasa Pak y RacGEF [65] (figura 2.8).

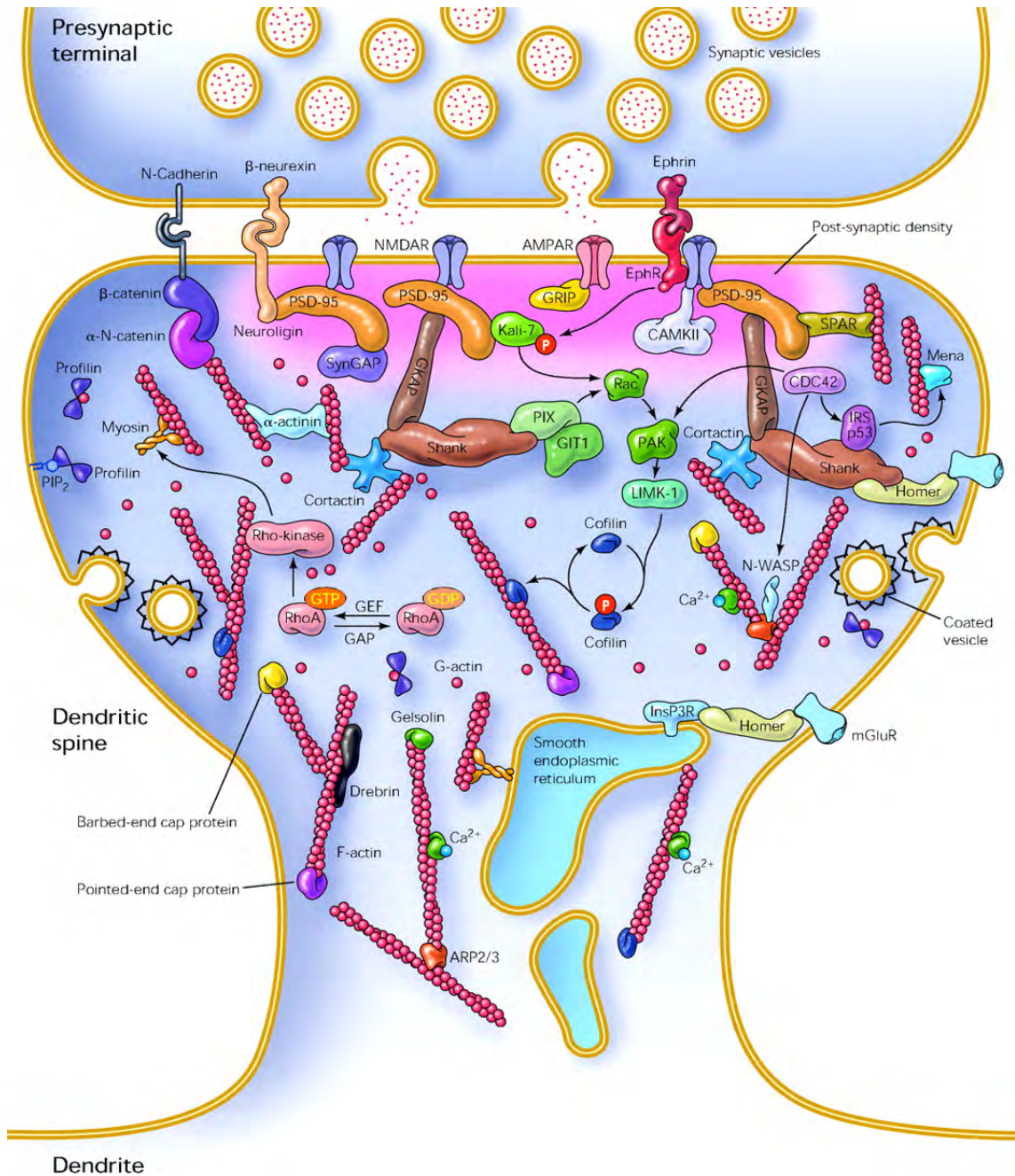


Figura 2.8: Algunos componentes importantes de las espinas dendríticas. Las espinas usan glutamato, el cual se libera desde las vesículas en la terminal axonal. Los NMDARs y AMPARs se agrupan en la densidad postsináptica. Fuera de la densidad postsináptica, en la misma espina, se agrupan los mGluRs y las zonas donde se reciclan las membranas. Los receptores se conectan a proteínas de andamiaje (PSD95) que reclutan complejos de señalización (RhoGTPasas). Los filamentos de actina proporcionan la base estructural de la forma de las espinas. A través de la interacción de proteínas, los filamentos de actina se conectan indirectamente con los receptores y otras proteínas transmembranales que regulan la forma y desarrollo de las espinas (EphRs, cadherinas y neuroliginas). Las proteínas reguladoras de la actina (profilina, drebrina, cofilina y gelsolina) controlan la dinámica de polimerización de actina [62].

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mutaciones en el gen PINK1 se han asociado con la EP [72]. Los síntomas no motores de la EP como la depresión, demencia y anomalías del sueño probablemente son la consecuencia de la degeneración de los sistemas sinápticos dopaminérgicos y no dopaminérgicos [73]. Funciones de PINK1 regulando la transmisión sináptica se han vinculado con deficiencias presinápticas [8–10]. PINK1 debilita la transmisión sináptica debido a anomalías presinápticas mediadas por ATP [11]. PINK1 afecta la transmisión excitatoria debilitando la liberación de glutamato en el hipocampo [48]. PINK1 aumenta el número de espinas dendríticas y aumenta la vulnerabilidad neuronal a estímulos excitotóxicos [54].

Anormalidades postsinápticas de distintas enfermedades neurológicas se deben a deficiencias en el tamaño, forma y número de las espinas dendríticas como autismo, esquizofrenia y Alzheimer [12]. Algunas neurotoxinas usadas para modelar la EP tienen efectos adversos sobre la dinámica de espinas dendríticas [52, 53]. La deficiencia de PINK1 aumenta la densidad de espinas dendríticas de las neuronas de hipocampo de rata [54]. Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias ricas en actina que surgen del árbol dendrítico de varios tipos de neuronas del SNC de los mamíferos y forman la estructura postsináptica de la mayoría de las sinapsis excitatorias [56]. Las espinas son estructuras dinámicas y la fuerza de la sinapsis está estrechamente relacionada con la morfología de la espina [74]. Las espinas requieren maduración después de su formación para desarrollar sinapsis [63]. Se desconoce cómo mutaciones de PINK1 pueden afectar las espinas dendríticas de las neuronas.

Para evaluar si el silenciamiento de PINK1 tiene algún efecto sobre la dinámica de espinas dendríticas de neuronas de hipocampo, cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón se transfectaron con plásmidos para silenciar PINK1 y expresar GFP y así analizar la densidad y morfología de las espinas dendríticas. Para analizar cómo la deficiencia de PINK1 podría afectar las espinas dendríticas, se analizó la expresión de proteínas sinápticas por Western blot. Para calcular la densidad y clasificar la morfología de las espinas dendríticas, se analizaron las

imágenes de las neuronas obtenidas por microscopía confocal.

Los objetivos propuestos para esta investigación son los siguientes:

4.1. Objetivo General

Analizar el efecto de la disminución de la expresión de PINK1 sobre la dinámica de espinas dendríticas en neuronas de hipocampo de ratón de la cepa C57BL/6.

4.2. Objetivos Específicos

- Estandarizar el cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón de la cepa C57BL/6.
- Estandarizar el silencimiento de PINK1 realizado por transfección de plásmidos lentivirales y evaluar la disminución de la expresión de la proteína PINK1 por Western Blot.
- Evaluar la expresión de las siguientes proteínas sinápticas por Western Blot de las neuronas control y las neuronas silenciadas para PINK1: PINK1, Synapsina, VGlut1, PSD95, NR2B y ROCK2.
- Calcular la densidad y clasificar la morfología de las espinas dendríticas de las neuronas control y las neuronas silenciadas para el gen PINK1 por medio del análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal.

5.1. Materiales

5.1.1. Reactivos

Para el cultivo

- Ácido clorhídrico (37 % p/p)
- Cubreobjetos (18 mm; Iimglas)
- Agua estéril destilada
- Hidrobromuro de poli-L-lisina (0.5 mg/mL en agua estéril destilada, esterilizada con filtro, Sigma, P1274)
- Placas de cultivo celular (6 y 24 pozos)
- Crías de ratón día postnatal 0 (P0) (5 a 8 crías, cualquier sexo; ratones de la cepa C57BL/6)
Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices y reglamentos institucionales y gubernamentales pertinentes: Ley 1774 de Enero de 2016, el Título V de la resolución N. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de Diciembre de 1989.
- Componentes del medio, como se describe en la tabla **5-1**
- Tripsina (0.5x, Lonza, CC-5012)
- Colador de células (Cell strainer, 70µm, nylon, BD Falcon, 352350)

Tabla 5-1: Composición del medio

	Componentes	Concentración final	Fabricante
Medio de disección	Hanks' Balanced Salt Solution, sin Ca^{2+} , ni Mg^{2+}	98.5 %	Lonza, 10-547F
	Glucosa	0.1 %	Sigma, G-6152
	HEPES (pH 7.3)	10 mM	Sigma, H-4034
Medio de siembra	Medio de crecimiento de neuronas primarias (PNGM)	88 %	Lonza, CC4461
	Suero Fetal Bovino certificado	10 %	Gibco, 16000-044
	Neural Survival Factor-1 (NSF-1)	2 %	Lonza, CC4461
	L-Glutamina	2 mM	Lonza, CC4461
	GentamicinAmphotericin	0.1 %	Lonza, CC4461
Medio de mantenimiento	PNGM	98 %	Lonza, CC4461
	NSF-1	2 %	Lonza, CC4461
	L-Glutamina	2 mM	Lonza, CC4461
	Gentamicina/Anfotericina	0.1 %	Lonza, CC4461

Para la transfección

- Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668030)
- Medio de mantenimiento (Tabla 5-1)
- Plásmidos lentivirales con los insertos de shRNA para PINK1 y shControl, los cuales fueron amablemente donados por el Dr. Mark Cookson (Laboratory of Neurogenetics, National Institutes of Health, USA), y el plásmido con el inserto de proteína fluorescente verde (GFP) para su sobreexpresión. Las secuencias de los constructos se encuentran en la tabla 5-2

Tabla 5-2: Secuencias de los constructos de shRNA para Pink1, el control de silenciamiento y GFP

Constructo	Secuencia
shPINK1A (pLenti6)	5' - GCTGGAGGAGTATCTGATAGG - 3'
shPINK1C (pLenti6)	5' - GGGAGCCATCGCCTATGAAAT - 3'
shControl (pLenti6)	5' - GCCTAGACGCGATAGTATGGA - 3'
GFP (pGFP-N1)	β actina - GFP

Para la fluorescencia

- Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x
- Solución de fijación (4 % paraformaldehído + 4 % sacarosa en PBS 1x)
- Portaobjetos (Sigma, 7101)
- Solución de montaje (Sigma, F4680)

Para el western blot

- Ácido bicinchonínico (Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Fisher Scientific, 23225))
- Solución de lisis celular (Buffer Ripa (Sigma-Aldrich, R0278) + inhibidor de proteasas (Roche, 04693159002) + inhibidor de fosfatasa (Roche, 04906837001))
- Buffer Laemmli 4x (Bio Rad, 1610747)
- Solución 30 % Acrilamida-Bisacrilamida (Bio Rad, 1610158)
- PageRule Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250kDa (Fisher Scientific, 26619)
- Membranas de PDVF (GE Healthcare Life Sciences Hybond ECL)
- Anticuerpos primarios, como se describe en la tabla 5-3

Tabla 5-3: Anticuerpos primarios para Western Blot

Anticuerpo primario	Fabricante	Factor de dilución
ms PINK1	Abcam, ab75487	1 : 500
ms ROCK2	Abcam, ab71598	1 : 1000
ms mGluR5	Abcam, ab76316	1 : 1000
rb RhoGAP29	Abcam, ab85853	1 : 1000
ms PSD95	Abcam, ab2723	1 : 500
rb Syn1	Abcam, ab64581	1 : 500
ms NR2B	Biosciences, 610416	1 : 1000
rb vGluT	SantaCruz, ab75487	1 : 1000
rb AKT	Cell Signaling, C67E7	1 : 1000
rb pAKT (Thr308)	Cell Signaling, D25E6	1 : 1000
ms Shank	Abcam, ab75487	1 : 500
ms β actin-peroxidase	Abcam, ab75487	1 : 25000

- Anticuerpos secundarios, como se describe en la Tabla 5-4

Tabla 5-4: Anticuerpos secundarios para Western Blot

Anticuerpo secundario	Fabricante	Factor de dilución
Anti mouse	Cell Signaling Technology, 7076S	1 : 1000
Anti rabbit	Cell Signaling Technology, 7074S	1 : 1000

- Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen, WP20005)

5.1.2. Equipos

- Cabina de cultivo celular de flujo laminar
- Incubadora de cultivo celular (5 % CO₂, 95 % humedad)
- Microscopio de luz
- Estereoscopio de disección con iluminación
- Pinzas estilo Dumon (no. 5)
- Microscopio Confocal (Nikon C1 plus Eclipse TI. Nikon EZ-C1 Software)
- Espectrofotómetro (Fisher Scientific, NanoDrop ND-2000. NanoDrop 2000 / 2000c Software)
- Cámara de electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Mini-Protean-III Cell)
- Sistema de documentación de imágenes (ChemiDocMP System Bio-Rad Laboratories. ImageLab Software)
- Electroporador (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad, 1652100)

5.2. Diseño del estudio

Para determinar si el silenciamiento de PINK1 tiene algún efecto sobre la dinámica de las espinas dendríticas de neuronas de hipocampo, se estudiaron las neuronas de hipocampo de ratón P0 silenciadas para PINK1 cultivadas por 13 días *in vitro* (DIV) de 3 cultivos diferentes. Para el silenciamiento, las neuronas se transfectaron a los 10 DIV con el vector plasmídico lentiviral shRNA específico para PINK1, el cual silencia la expresión de este gen via RNAi, y el vector plasmídico GFP, el cual expresa proteína fluorescente verde unida a una secuencia de reconocimiento de unión a actina. Para el análisis de la densidad y morfología de espinas, tres días después de la transfección, las neuronas se fijaron y montaron en portaobjetos para su análisis por microscopía confocal. Como control, transfectamos shRNA inespecífico, el cual tiene una secuencia de reconocimiento aleatoria y GFP. Para el análisis de la expresión de proteínas por Western blot, las neuronas se transfectaron a los 10 DIV con el vector plasmídico lentiviral shRNA específico para PINK1. A los 13 DIV, las neuronas se lisaron y almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis de la expresión de proteínas por Western Blot. Como control, transfectamos shRNA inespecífico.

5.3. Procedimiento

5.3.1. Cultivo primario de neuronas de hipocampo

Para los estudios de la densidad y morfología de las espinas y para los estudios de análisis de expresión de proteínas se sembraron 90000 células por cubreobjeto de 18mm de diámetro en placas de cultivo celular de 6 pozos. Los cubreobjetos se pretrataron con poli-L-lisina como se describe a continuación.

Preparación de los cubreobjetos con poli-L-lisina

Dos días antes del cultivo, los cubreobjetos se sumergieron en ácido clorhídrico por 12 h. Se retiró el ácido y se lavaron varias veces con agua estéril destilada con ayuda del sonicador y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, los cubreobjetos se colocaron en las placas de cultivo celular y se expusieron a luz ultravioleta por 2 h. Las placas se sellaron con parafilm y se almacenaron a 4°C. El día anterior al cultivo, en cabina de flujo vertical, la placa se expuso a luz ultravioleta por 30 min y se adicionó suficiente solución de poli-L-lisina para que sumergiera el cubreobjeto y se incubó a 37°C durante la noche. El día del cultivo, se retiró la poli-L-Lisina, se lavaron 3 veces con agua estéril y se dejaron secando a temperatura ambiente hasta el momento en que se sembraron las neuronas.

Disección y siembra de las neuronas

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo se obtuvieron de los cerebros de neonatos de ratón de P0 de la cepa C57BL/6. Los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio se realizó de acuerdo a las normativas institucionales, nacionales e internacionales para el manejo y cuidado de animales de laboratorio. El procedimiento que seguimos es un procedimiento modificado de los protocolos descritos por Beaudoin y col. [75] y Goslin y col. [76]. Las crías se decapitaron y se extrajo el cerebro que se sumergió en medio de disección precalentado a 37°C (Tabla 5-1). Bajo estereoscopio, utilizando micropinzas, se retiraron las meninges y se aisló el hipocampo. Los hipocampos de 4 a 6 cerebros se fueron recolectando en un tubo Falcon de 15mL que contenía 1mL de medio de disección precalentado a 37°C. Se eliminó el medio y se adicionó 5mL de medio de disección a 37°C; este paso se repitió 1 vez. El tejido se disoció mediante tratamiento con Tripsina en medio de disección durante 25 min a 37°C. Pasado este tiempo, la Tripsina se removió y se lavó el tejido 2 veces con 5mL de medio de disección. Después de 10 min, se eliminó el medio y se adicionó 5 mL de medio de siembra a 37°C por 10 min; este paso se repitió 1 vez. El tejido se resuspendió en 2mL de medio de siembra y se disgregó con una pipeta de plástico de 1000 μ L. La solución se pasó a un tubo Falcon de 50mL a través de un cell strainer y se adicionaron 2 mL más de medio de siembra. Las células se contaron, se sembraron sobre los cubreobjetos y se incubaron a 37°C por 3 h. Entonces, se adicionó 1mL del medio de mantenimiento suplementado con 25 μ M de glutamato por pozo y se incubaron por 3 días cuando se adicionó más medio de mantenimiento. Al segundo DIV, se

adicionó 0.5 μ M de arabinósido de citosina por 24h para inhibir el crecimiento de glia. Dos veces por semana, se adicionó 500 μ L de medio de mantenimiento. Las células se cultivaron por 13 DIV.

5.3.2. Transformación de bacterias y purificación de los plásmidos

Para la obtención del plásmido GFP, se transformaron bacterias E. coli 10HSB con el plásmido GFP. Las bacterias se lavaron con glicerol y se centrifugaron. Luego, se diluyó 30 ng de ADN plásmido de GFP en 50 μ L de bacterias, los cuales se colocaron en la cámara de electroporación. La electroporación se hizo con 1 pulso pre-programado Ec1 ($V = 1.8$ kV). Las bacterias se resuspendieron en 800 μ L de medio Luria-Bertani (LB) y se incubaron por 1 hora a 37°C. Una vez transformadas las bacterias, se seleccionaron en platos Petri con agar LB que contenían 50 μ g/mL de antibiótico kanamicina. Se seleccionó una colonia y se incubó en 2mL medio LB con kanamicina por 12 h. Entonces, las bacterias se diluyeron en medio LB con 30% de glicerol y se conservaron a -70°C. Para la amplificación de los plásmidos, se pusieron a crecer las bacterias transformadas con los DNAs plásmidicos GFP, shPINK1 y shControl, para lo cual se adicionó 20 μ L del stock de las bacterias transformadas en 150mL de medio LB con antibiótico y se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación. Luego, los plásmidos se purificaron con el kit de purificación (Zyppy Plasmid Midiprep, Zymo Research, D4026), se cuantificaron en el espectrofotómetro y se conservaron a -20°C para ser utilizados en la transfección de las neuronas hipocampales.

5.3.3. Transfección de las células

Para el silenciamiento del gen PINK1, las neuronas se cotransfectaron a los 10 DIV con los plásmidos shPINK1 o shControl y GFP (tabla 5-2). La transfección se hizo usando Lipofectamina 2000 siguiendo las indicaciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente. Por un lado, los plásmidos (A) y la lipofectamina (B) se diluyeron por separado en medio de mantenimiento con las concentraciones que se indican en la tabla 5-5 y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se mezcló (B) en (A) y se incubó por 25 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, se recicló el medio que tenían las células y se conservó a 37°C. Se adicionó 500 μ L de medio de mantenimiento precalentado a 37 °C. Después de la incubación de la mezcla, se adicionó a los pozos para un volumen final de 750 μ L por pozo. El tiempo de transfección fue de 2 : 30 h a 37°C. Después de este tiempo, se retiró la mezcla, se lavó con HBSS 37°C y se adicionó el medio reciclado. Las células se incubaron por 3 días más a 37°C, para un total de 13 DIV, al cabo del cual se evaluó la eficiencia de la transfección y se hicieron los experimentos de fijación y lisado de las neuronas (figura 5.1).

5.3.4. Fijación de las neuronas

Para la obtención de las imágenes por microscopía confocal, las neuronas de hipocampo de 13 DIV se fijaron y se montaron en portaobjetos. Primero, se les retiró el medio, se lavaron

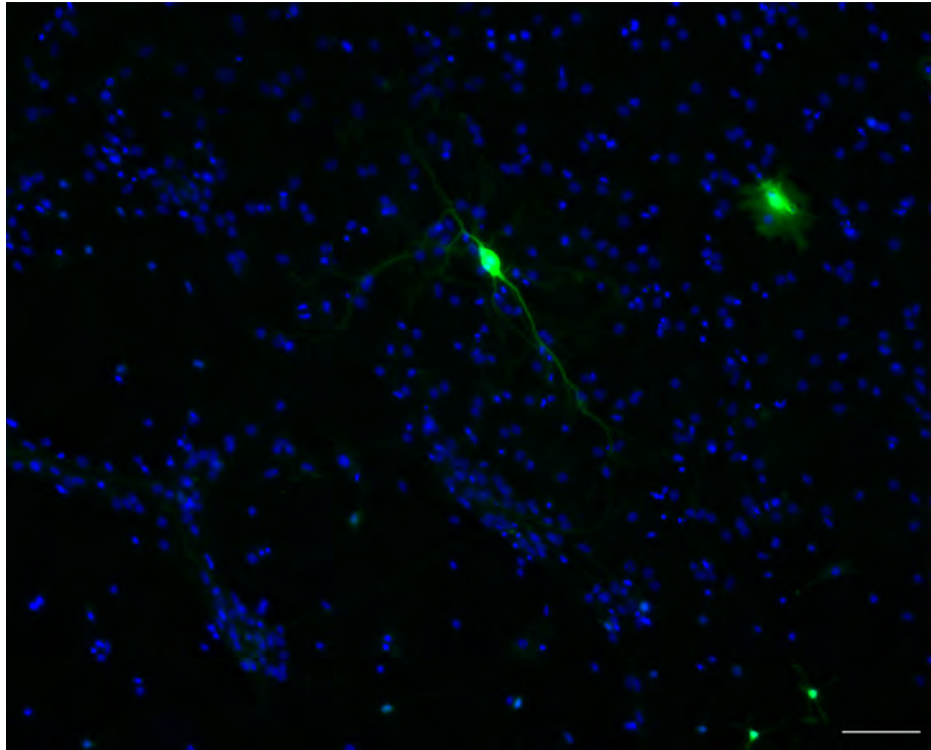


Figura 5.1: Transfección de cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Imagen de fluorescencia de un cultivo primario de neuronas hipocámpales de 13 DIV, cotransfectadas con los plásmidos pEGFP-N1 (GFP) y pLenti6 (shPINK1) y su núcleo marcado con DAPI. Se puede observar que los plásmidos no sólo se incorporaron en las neuronas de hipocampo, sino también en otras clases de células como astrocitos y glia, a pesar de que se usó arabinósido de citosina [0.5 μ M] para impedir su proliferación. Escala de la barra = 200 μ m

con PBS precalentado a 37°C y se fijaron por 8 min a temperatura ambiente con la solución de fijación precalentada a 37°C. Luego, se les retiró el fijador, se lavaron 3 veces con PBS, 3 veces con solución BAJA en sales y 3 veces con solución ALTA en sales por 5 min cada lavado. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con la solución de montaje, se dejaron secar, se sellaron con esmalte y se almacenaron a -20°C protegidos de la luz hasta la toma de imágenes por microscopía confocal.

5.3.5. Análisis de las espinas dendríticas

Para la cuantificación de las espinas, se analizaron las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las neuronas de hipocampo de 13 DIV cotransfectadas con los plásmidos shCTL o shPINK1 y GFP. El análisis de la densidad y clasificación de espinas se realizó usando el software *NeuronStudio* (Computational Neurobiology and Imaging Center Mount Sinai, School of Medicine, New York, USA [77]). El software por defecto clasifica las espinas en Thin, Stubby o Mushroom. Este esquema de clasificación hace uso de la *Proporción del cuello*, *Proporción de espinas Thin* y *Tamaño de espinas Mushroom* para determinar el tipo de espina.

Tabla 5-5: **Composición de la mezcla de la transfección:** Concentraciones usadas para 3 cubreobjetos por pozo en placas de cultivo celular de 6 pozos

Componentes	Control		Silenciamiento	
	GFP+shControl		GFP+shPINK1	
	A	B	A	B
Medio de mantenimiento	250 μ L	250 μ L	250 μ L	250 μ L
DNA	GFP: 2.5 μ g shControl: 3 μ g		GFP: 2.5 μ g shPINK1: 3 μ g	
Lipofectamina 2000		5 μ L		5 μ L

Proporción del cuello: las espinas con una proporción entre diámetro de la cabeza y diámetro del cuello mayor a $1.1\mu\text{m}$ se consideran Thin o Mushroom. *Proporción de espinas Thin:* las espinas que no cumplen con la *proporción del cuello* y tienen una proporción entre la longitud de la espina y el diámetro de la cabeza mayor a este valor se clasifican como Thin, de lo contrario como Stubby. *Tamaño de espinas Mushroom:* las espinas que cumplen con el valor de *proporción del cuello* y tienen un diámetro de cabeza igual o mayor a este valor, se clasifican como Mushroom, de lo contrario, son Stubby.

Se calcularon las espinas de 21 neuronas control y 18 neuronas silenciadas de dos experimentos independientes. Se examinaron de tres a cinco segmentos dendríticos de una longitud total de $50\text{--}100\mu\text{m}$ de dendritas basales por neurona. Las formas de las espinas se clasificaron como Filopodia, Thin, Stubby y Mushroom (figura 2.7) siguiendo el método de clasificación de Peters y Kaiserman-Abramof [60]. Sólo las protuberancias dendríticas que tenían un cuello claramente unido al eje de la dendrita se contaron como espinas.

Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron empleando un objetivo de inmersión en aceite de $60\times$ (PLAN APO VC $60\times$ OIL DIC N2) y un pinhole de $30\mu\text{m}$ de diámetro. Cada imagen fue el resultado de la proyección a través del plano Z de entre 15 y 20 planos focales. Cada plano focal se promedió 3 veces y se separaba uno del otro por una distancia de $0.38\mu\text{m}$. La resolución de las imágenes fue de 1024×1024 pixeles con un tiempo de exposición de los láseres por pixel de $1.68\mu\text{s}$. La potencia de los láseres fue: láser 408 : 6.2%; láser 488: 16.3%; láser 568 : 17.3%. La ganancia de los fotomultiplicadores fue: 515/30 : 6; 590/50 : 8.10; 650LP : 6. Los parámetros de adquisición se mantuvieron iguales para todas las imágenes dentro del mismo experimento.

5.3.6. Lisado de las células y cuantificación de proteína

Para la extracción de proteínas, las células de 13 DIV se lisaron con la solución de lisis celular en frío. Primero, se retiró el medio, se adicionó $50\mu\text{L}$ de la solución de lisis celular por pozo (placas de cultivo celular de 6 pozos) y se dejó actuar durante 5 min. Los lisados se removieron con

espátula, se pasaron a tubos Eppendorf de 1 mL y se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación.

Para la cuantificación de proteína, medimos la concentración de proteína usando un kit de cuantificación de BCA. Se utilizó la relación de $1\mu\text{L}$ de muestra por cada $8\mu\text{L}$ de reactivo. Estas muestras se compararon con una curva de calibración de 5 patrones de trabajo que va desde 5 hasta 25 mg de BCA. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C y entonces se midió la absorbancia utilizando el espectrofotómetro. Las muestras se conservaron a -70°C hasta el análisis por Western Blot.

5.3.7. Western blot

Para el análisis de expresión de proteínas, una fracción de $30\mu\text{g}$ de proteína de cada muestra se separó en un gel de SDS-PAGE al 10 % bajo condiciones reductoras: las muestras se disolvieron en buffer Laemmli y se desnaturalizaron a 95°C durante 10 min. La electroforesis en gel de poli-acrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se llevó a cabo en una cámara de electroforesis con buffer de corrido (buffer Towin 1x) a 100 mV durante 2 h. Luego del corrido, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 250 mA por 2 h utilizando una cámara de transferencia, donde el gel estaba unido a la membrana, ambos cubiertos con papel absorbente y esponjas sumergidos en buffer de transferencia (buffer Towin 1x + 20 % metanol). Después de la transferencia, la membrana se bloqueó en buffer de bloqueo (5 % leche en buffer TTBS (0.1 % Tween + Tris-buffered saline (TBS))) por 1 h. A continuación, la membrana se incubó con los anticuerpo primarios (tabla 5-3) diluídos en buffer de bloqueo, durante la noche a 4°C . Al siguiente día, la membrana se lavó con TTBS 3 veces por 5 min cada uno y se incubó con los anticuerpos secundarios (tabla 5-4) diluídos en buffer de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se lavó con TTBS 3 veces por 5 min cada uno y se detectó la presencia de las proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema de documentación de imágenes. El análisis densitométrico de las imágenes se llevó a cabo con el software *ImageLab* (Bio-rad, 170-8265).

5.3.8. Análisis de los datos

El análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se realizó utilizando los softwares *Prism6* (GraphPad, 92037, La Jolla, California, USA) y *R* (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Los datos obtenidos corresponden a tres experimentos independientes. Para las comparaciones entre más de dos grupos experimentales se usó un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba Tukey Honest Significant Differences (TurkeyHSD). Para las comparaciones entre dos grupos se usó una prueba t de Student. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos y se representaron de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Todos los datos se expresan como medias \pm el error estándar de la media (SEM).

6.0.1. Silenciamiento de PINK1 en neuronas de hipocampo de ratón

Queríamos conocer si el silenciamiento de PINK1 tiene algún efecto sobre la dinámica de espinas dendríticas de las neuronas de hipocampo de ratón. Lo primero que hicimos fue estandarizar el silenciamiento. Para esto, transfectamos las neuronas con los plásmidos A, C o su combinación A+C (tabla 5-2) por 30, 60 o 120m para seleccionar el plásmido con mayor eficiencia. La transfección de las neuronas usando el plásmido A incubado por 60' redujo significativamente cerca del 50 % la expresión de PINK1 en comparación con la expresión de las neuronas control [CTL = 1.00 ± 0.00 vs. shPINK1 = 0.49 ± 0.03] (figura 6.1a). A partir de este momento, el silenciamiento de las neuronas lo hicimos transfectando el plásmido A (shPINK1). Luego, las células SH-SY5Y y HEK de línea celular se usaron como controles positivos de la expresión de PINK1 y se comparó su nivel de expresión con el nivel de expresión de las neuronas de hipocampo. Encontramos que el nivel de expresión de PINK1 en las células de las líneas celulares fue 90 % mayor relativo al nivel de expresión de las neuronas de hipocampo. Esta diferencia posiblemente se debió a que las células de línea celular estaban en proliferación. En las neuronas de hipocampo, el plásmido shPINK1 disminuyó significativamente cerca del 50 % la expresión de PINK1 en comparación con la expresión de las neuronas control [CTL = 0.96 ± 0.02 vs. shPINK1 = 0.48 ± 0.06] (figura 6.1b). Después transfectamos un plásmido control (shCTL) y comparamos el nivel de expresión de PINK1 entre las células del cultivo primario sin transfectar, transfectadas con shCTL o transfectadas con shPINK1. La expresión de PINK1 disminuyó significativamente cerca del 50 % en las neuronas transfectadas con shPINK1 en comparación con las células sin transfectar y transfectadas con shCTL, mientras que la expresión de PINK1 se mantuvo estable en las células sin transfectar y transfectadas con shCTL [NoTrans = 0.96 ± 0.05 vs. shCTL = 0.91 ± 0.09 vs. shPINK1 = 0.53 ± 0.37] (figura 6.1c). Además, verificamos la morfología de las neuronas por microscopía de contraste de fases y encontramos que el silenciamiento de PINK1 no provocó diferencias en la estructura general de las neuronas detectables por medio de un microscopio de luz (figura 6.1d). Tampoco encontramos que el silenciamiento incrementara la

muerte celular de las neuronas transfectadas en comparación con las neuronas no transfectadas o las neuronas control [LysisCTL = 97.3 ± 6.45 vs. NoTrans = 14.8 ± 1.24 vs. shCTL = 21.1 ± 2.11 vs. shPINK1 = 17.5 ± 3.76] (figura 6.1e). Estos resultados sugieren que las neuronas de hipocampo de ratón cultivadas usando nuestro protocolo sobrevivieron bien los 13 DIV desarrollando árboles dendríticos saludables. Además, las neuronas de hipocampo de ratón transfectadas con shPINK1 disminuyeron la mitad de la expresión de PINK1.

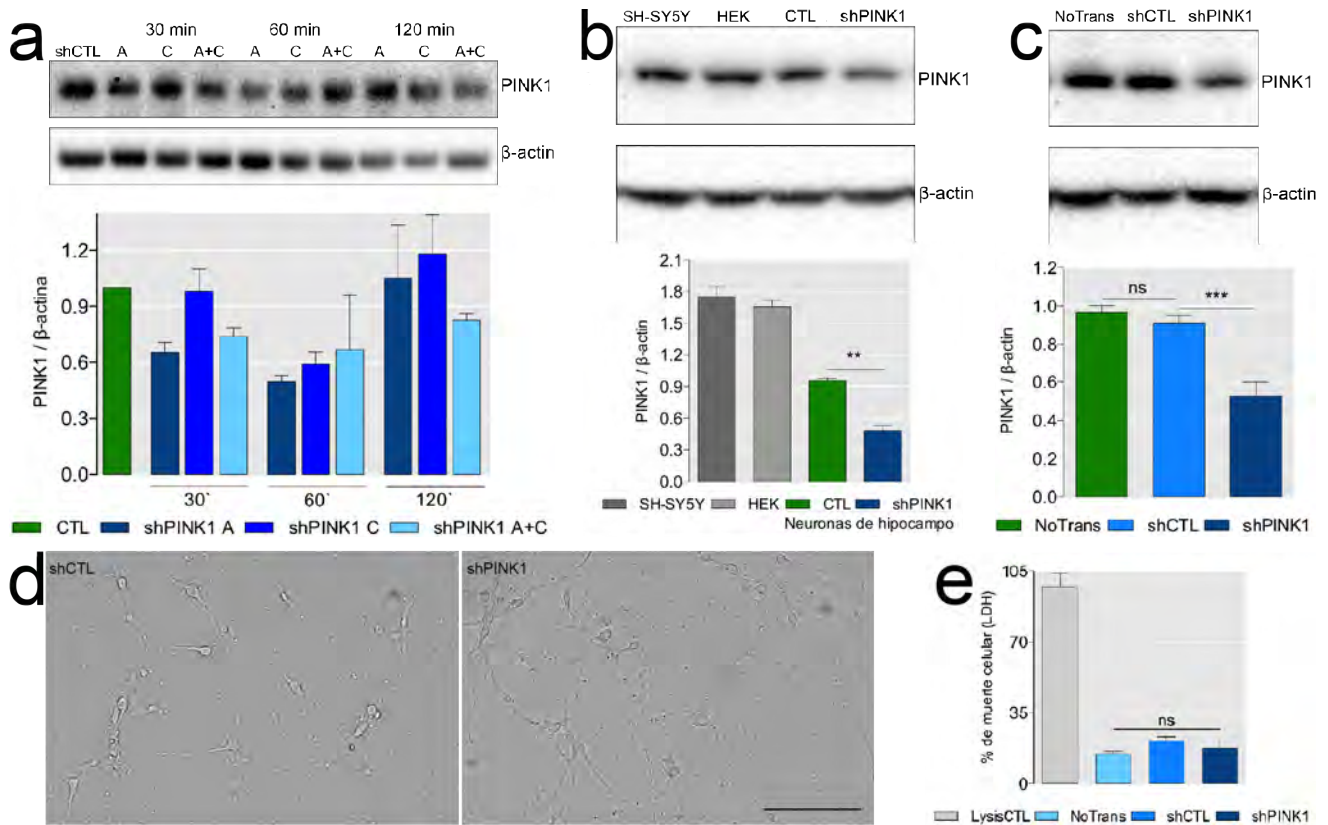


Figura 6.1: Estandarización del silenciamiento de PINK1 en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón. (a-c) Western blots representativos de la expresión de PINK1. Para todos los western blots, la expresión de PINK1 se normalizó con respecto a β actina y el nivel de expresión de las neuronas de hipocampo control representó el 100 %. Los diagramas de barras resumen los datos del western blot. Las variables y las condiciones se identifican debajo de las barras. (a) Efecto de los plásmidos sobre la expresión de la proteína PINK1 en neuronas de hipocampo de ratón relativos a la expresión de las células sin transfectar (CTL). (b) Efecto del plásmido shPINK1A sobre la expresión de la proteína PINK1 en las células SH-SY5Y, HEK y neuronas de hipocampo de ratón. (c) Efecto del vehículo y los plásmidos shCTL y shPINK1 sobre la expresión de la proteína PINK1 en las neuronas de hipocampo de ratón. (d) Imágen de microscopía de contraste de fases de las neuronas de hipocampo de ratón de 13 DIV. Escala de la barra=200 %m. (e) Ensayo de LDH. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan la media + SEM. **P < 0.01, ***P < 0.001, nsP > 0.05 vs. control para TukeyHSD.

6.0.2. El silenciamiento de PINK1 aumenta la densidad y regula la morfología de las espinas de las neuronas de hipocampo de ratón

Para probar si el silenciamiento de PINK1 tiene algún efecto sobre la dinámica de espinas dendríticas en las neuronas de hipocampo de ratón, calculamos la densidad de espinas total y la densidad por tipo de espina. Se conoce que la deficiencia de PINK1 reduce la liberación del neurotransmisor debilitando las sinapsis [8, 10, 48]. Entonces, el deterioro de las sinapsis causada por el silenciamiento de PINK1 debe afectar la dinámica de espinas dendríticas. Para probar si el silenciamiento de PINK1 tiene algún efecto sobre el número de espinas, calculamos su densidad. Encontramos que el silenciamiento de PINK1 aumentó significativamente la densidad de espinas cerca del 40 % en comparación con la densidad de las neuronas control [shCTL=3.28 ± 0.27 vs. shPINK1=4.62 ± 0.21 espinas/10 μm] (figura 6.2a-b). Este resultado sugiere que el silenciamiento de PINK1 afecta la morfogénesis sináptica en neuronas de hipocampo de ratón. Luego, debido a que las espinas tienen un proceso de maduración que las hace morfológicamente y funcionalmente diferentes, examinamos la densidad de las espinas por tipo de espina. Encontramos que el silenciamiento de PINK1 aumentó significativamente 100 % el número de espinas Thin en comparación con las espinas Thin de las neuronas control [shCTL=1.70 ± 0.13 vs. shPINK1=0.88 ± 0.11 espinas/10 μm] (figura 6.2c-d). Los otros tipos de espinas se mantuvieron sin cambios, aunque hubo una tendencia a aumentar [Filopodia(shCTL=0.14 ± 0.04 vs. shPINK1=0.21 ± 0.04; Stubby(shCTL=1.29 ± 0.15 vs. shPINK1=1.75 ± 0.11; Mushroom(shCTL=0.96 ± 0.09 vs. shPINK1=1.00 ± 0.07 espinas/10 μm)]. El aumento del número de espinas debido al silenciamiento de PINK1 sugiere que PINK1 regula la densidad de espinas, mientras que el aumento de las espinas Thin indica que PINK1 regula la morfología de las espinas.

6.0.3. El silenciamiento de PINK1 disminuye el tamaño de la cabeza de las espinas de las neuronas de hipocampo de ratón

Para probar si el silenciamiento de PINK1 afecta la maduración de las espinas, investigamos qué efecto tiene el silenciamiento sobre el diámetro de la cabeza de la espina. El tamaño de cabeza de la espina está estrechamente relacionado con la maduración de la espina. Las espinas maduras tienen cabezas grandes, mientras las espinas inmaduras tienen cabezas pequeñas [56]. Encontramos que el silenciamiento de PINK1 no afectó el diámetro medio de la cabeza de las espinas comparado con las neuronas control [shCTL=0.37 ± 0.01 vs shPINK1=0.35 ± 0.01 μm] (figura 6.3a). El gráfico de la distribución de densidad nos permitió conocer que en las neuronas silenciadas hay más espinas con cabeza pequeña (0.2-0.45 μm de diámetro) en comparación con las espinas de las neuronas control. Por el contrario, en las neuronas control, hay más espinas con cabeza grande (0.5-1.0 μm de diámetro) en comparación con las neuronas silenciadas (figura 6.3b). Entonces comparamos el tamaño de la cabeza de las espinas por tipo de espina y encontramos que el silenciamiento de PINK1 disminuyó significativamente 13 % el diámetro de la cabeza de las espinas tipo Stubby comparado con las neuronas control [shCTL=0.39 ± 0.01 vs. shPINK1=0.34 ± 0.01 μm], mientras la cabeza de los otros tipos de espinas no cambió (figura

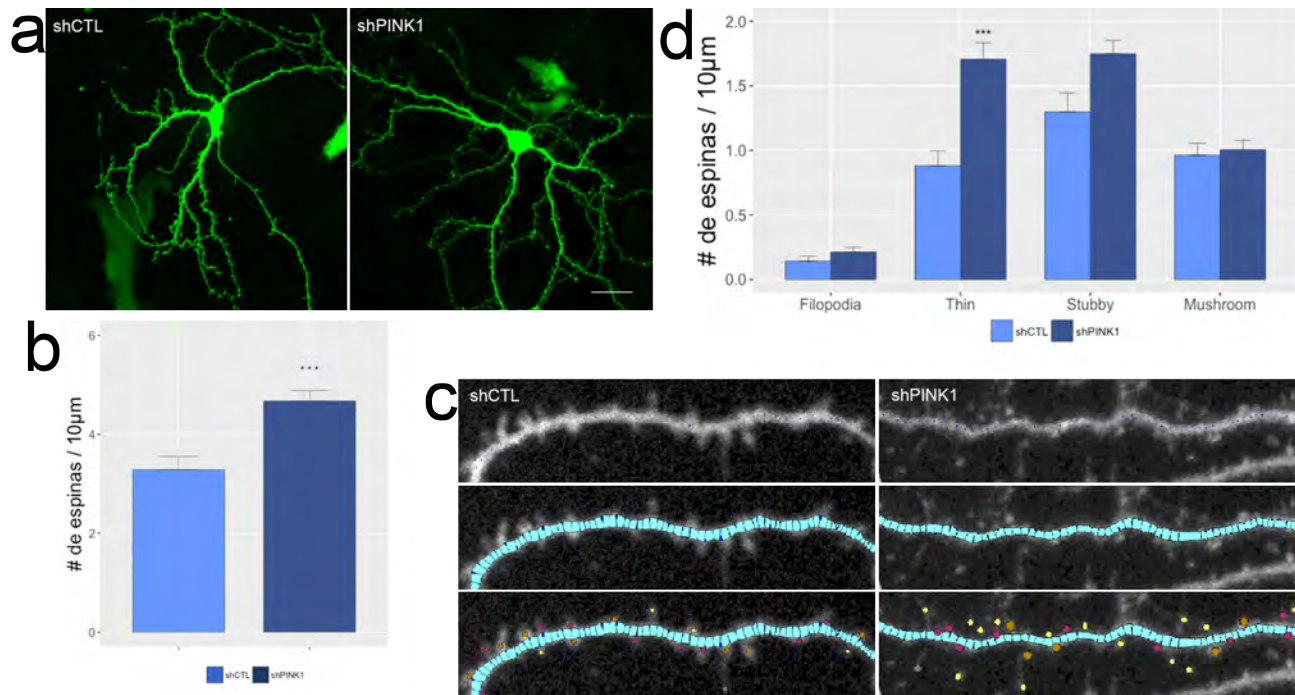


Figura 6.2: Efectos del silenciamiento de PINK1 sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas.(a-c) Las neuronas de hipocampo se transfectaron con los plásmidos lentivirales shCTL o shPINK1, junto con un plásmido reportero GFP. (a) Imágenes superpuestas de los planos focales en el eje Z de las neuronas. Escala de la barra=50 μm. (b) Densidad media de espinas + SEM por 10 μm de dendrita. **P < 0.01 para Student's t-test. (c) Magnificaciones de las proyecciones de segmentos de dendritas analizadas usando el software *NeuronStudio*. Clasificación de espinas por morfología: Filopodio (gris), Thin (amarillo), Stubby (magenta) y Mushroom (naranja). (d) Densidades medias de las espinas + SEM por 10μm de dendrita agrupadas por tipo de espina para las neuronas silenciadas y control. **P < 0.01 vs. control para TukeyHSD.

6.3c). La reducción del tamaño de la cabeza de las espinas Stubby debido al silenciamiento de PINK1 sugiere que PINK1 regula la maduración de espinas.

6.0.4. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de proteínas de la densidad postsináptica de las neuronas de hipocampo de ratón

Para probar si la disminución del tamaño de la cabeza de la espina debido al silenciamiento de PINK1 disminuye la densidad postsináptica, analizamos los niveles de expresión de PSD95 y Shank, dos proteínas de la densidad postsináptica asociadas con el agrupamiento y anclaje de receptores, canales y proteínas de señalización asociadas. Encontramos que el silenciamiento disminuyó significativamente 30% la expresión de PSD95 en comparación con las neuronas control [shCTL = 0.89 ± 0.11 vs. shPINK1 = 0.59 ± 0.08] (figura 6.4a). El silenciamiento también disminuyó significativamente 30% la expresión de Shank en comparación con las neuronas control [shCTL = 0.957 ± 0.043 vs. shPINK1 = 0.662 ± 0.05] (figura 6.4b). Ya que entre menos proteínas

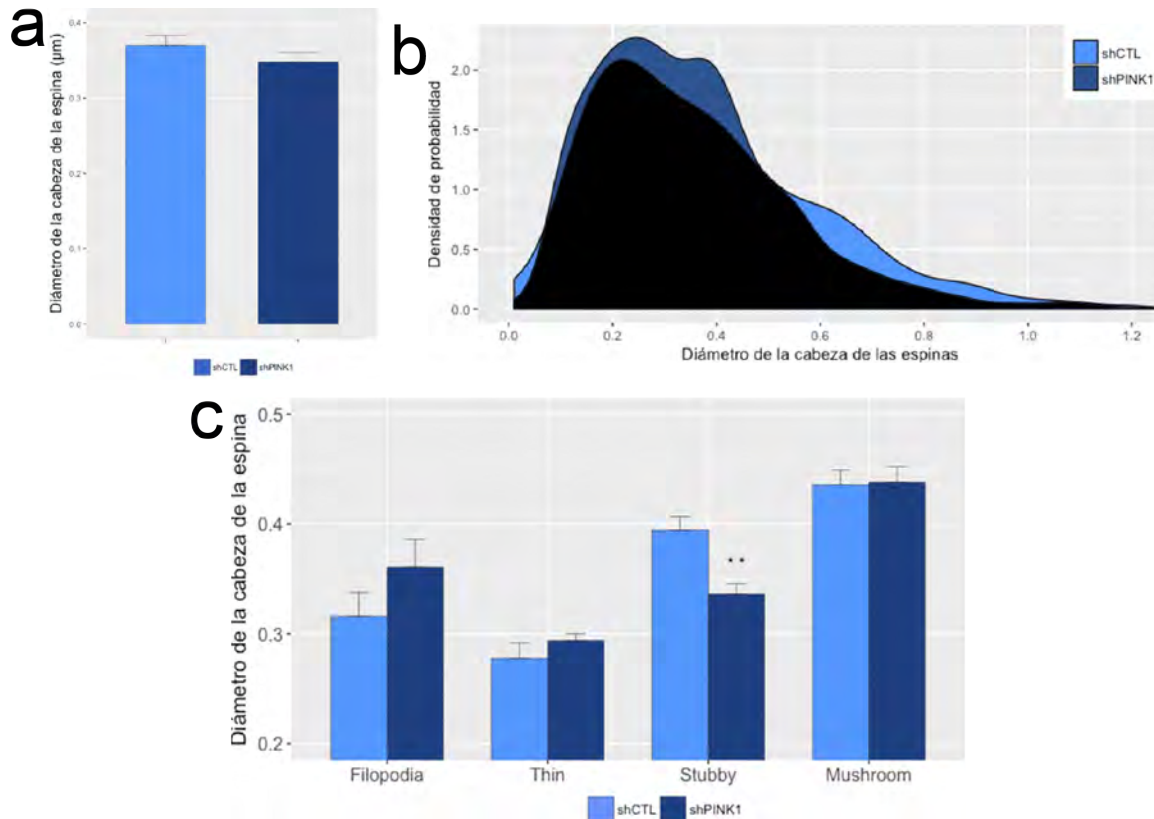


Figura 6.3: El silenciamiento de PINK1 disminuye el tamaño de cabeza de las espinas de las neuronas de hipocampo. (a) Diámetro medio de la cabeza de la espina + SEM para las neuronas control y silenciadas. $P > 0.05$ vs control para Student's t-test. (b) Dos distribuciones de densidad superpuestas del diámetro de la cabeza de las espinas. El área bajo la curva representa el 100% de la población de espinas para las neuronas control (claro), silenciadas (oscuro) y superposición (negro). (c) Diámetro medio de la cabeza de las espinas + SEM por tipo de espina (filopodia, thin, stubby y mushroom) para las neuronas control y silenciadas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. ** $P < 0.01$ vs control para TukeyHSD.

de la PSD, menor el área de la cabeza de la espina, este resultado sugiere que el silenciamiento de PINK1 produce espinas que tienen densidades postisnápticas más pequeñas y probablemente contactos sinápticos más pequeños.

6.0.5. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de receptores de glutamato de las neuronas de hipocampo de ratón

Para determinar si la disminución del nivel de expresión de las proteínas postsinápticas debido al silenciamiento de PINK1 afecta la expresión de los receptores de glutamato, investigamos qué efecto tiene el silenciamiento sobre NR2B y mGluR5. La mayoría de estos receptores se ubican en la cabeza de las espinas y su actividad se ha asociado con varias clases de plasticidad sináptica. Encontramos que el silenciamiento disminuyó significativamente 25% la expresión de NR2B comparado con las neuronas control [shCTL = 0.96 ± 0.04 vs. shPINK1 = $0.71 \pm$

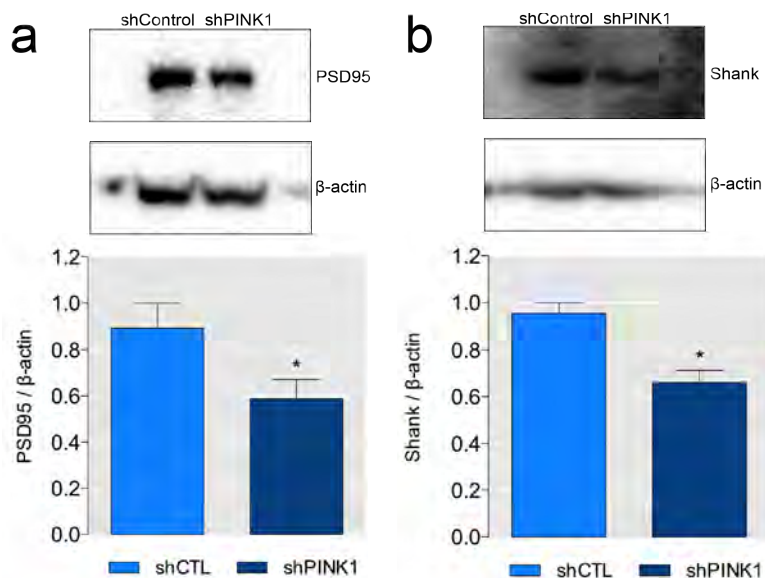


Figura 6.4: El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de PSD95 y Shank. (a-b) Western Blots representativos de la expresión de (a) PSD95 y (b) Shank. Los diagramas de barras resumen los datos del western blot. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan la proporción media + SEM. * $P < 0.05$ vs. control para Student's t-test.

0.08] (figura 6.5b). El silenciamiento también disminuyó significativamente 27% la expresión de mgluR5 comparado con las neuronas control [shCTL = 0.97 ± 0.02 vs. shPINK1 = 0.70 ± 0.05] (figura 6.5b). Puesto que entre menos receptores de glutamato, menos actividad excitatoria, la disminución de expresión de estos receptores debe disminuir el input excitatorio.

6.0.6. El silenciamiento de PINK1 aumenta la expresión de proteínas reguladoras de la organización de actina de las neuronas de hipocampo de ratón

Para determinar si el aumento de la densidad de espinas y el cambio de la morfología de las espinas debido al silenciamiento de PINK1 está mediada por la actividad de proteínas reguladoras de la polimerización de actina, examinamos los niveles de expresión de RhoGAP29, un inhibidor de la GTPasa RhoA, y ROCK2. La inhibición de RhoA mediada por RhoGAP29 regula la densidad y morfología de las espinas a través de la reorganización del citoesqueleto, la cual es importante para la fuerza sináptica. Una de las principales proteínas efectoras de RhoA es la quinasa ROCK2. Estas proteínas forman el complejo RhoA/ROCK2 localizado en la espina que inhibe el crecimiento de la cabeza de la espina que resulta de la reorganización del citoesqueleto de la espina. Encontramos que el silenciamiento de PINK1 aumentó significativamente 24% la expresión de RhoGAP29 comparado con las neuronas control [shCTL = 0.93 ± 0.05 vs. shPINK1 = 1.17 ± 0.09] (figura 6.6a). Contrario a lo esperado, el silenciamiento también aumentó significativamente 33% la expresión de ROCK comparado con las neuronas control [shCTL

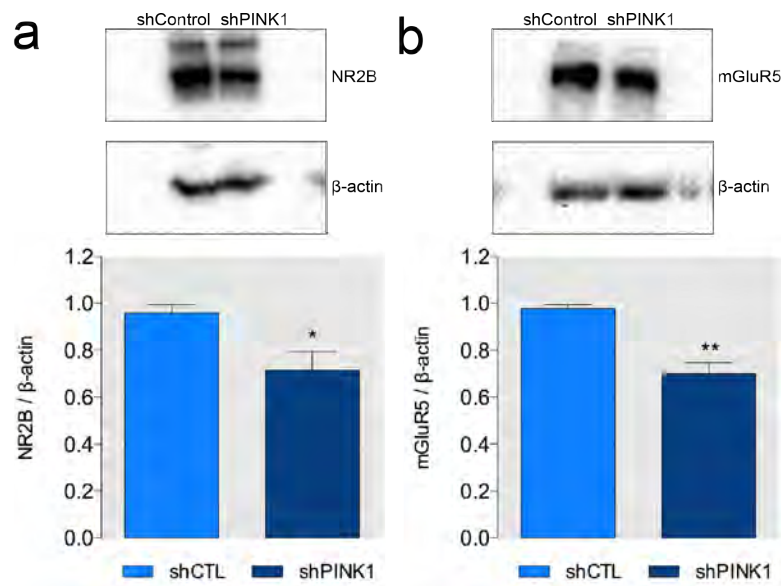


Figura 6.5: El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de NR2B y mGluR5. (a-b) Western Blots representativos de la expresión de (a) NR2B y (b) mGluR5. Los diagramas de barras resumen los datos del western blot. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan la proporción media + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control para Student's t-test.

= 0.98 ± 0.01 vs. shPINK1 = 1.32 ± 0.06] (figura 6.6b). Debido a que la inhibición de RhoA mediada por RhoGAP29 puede regular la morfología de la espina y la activación de ROCK2 puede también regular la morfología de la espina, estos resultados sugieren que la morfología de las espinas podría estar mediada por RhoA y ROCK2.

6.0.7. El silenciamiento de PINK1 regula la expresión de proteínas presinápticas de las neuronas de hipocampo de ratón

Para determinar si el silenciamiento de PINK1 tiene efectos sobre el nivel de expresión de proteínas presinápticas, examinamos los niveles de expresión de Syn1, una proteína asociada con la agrupación de vesículas sinápticas y vGluT1, encargada de transportar glutamato dentro de las vesículas sinápticas. La morfología y maduración de las espinas podrían estar siendo reguladas por señales que provienen de la neurona presináptica [56]. Aunque no se ha reportado deficiencias en proteínas del complejo SNARE, se ha demostrado que el deterioro de la neurotransmisión se debe a defectos en la liberación del neurotransmisor [8]. Además, se ha reportado que el nivel de expresión de la proteína vGluT1 puede estar alterado en las neuronas del circuito negro estriado de los pacientes con EP [43]. Encontramos que el silenciamiento disminuyó significativamente cerca del 55 % la expresión de Syn1 comparado con las neuronas control [shCTL = 0.85 ± 0.12 vs. shPINK1 = 0.31 ± 0.15] (figura 6.7a). Por el contrario, el silenciamiento de PINK1 aumentó significativamente 23 % la expresión de vGluT1 comparado con las neuronas control [shCTL = 0.98 ± 0.01 vs. shPINK1 = 1.22 ± 0.09] (figura 6.7b). Como la dinámica de las espinas puede ser

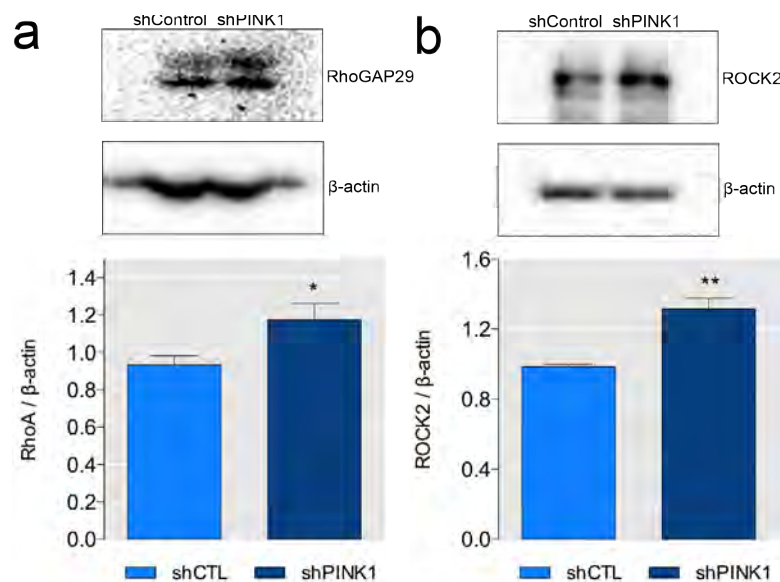


Figura 6.6: PINK1 regula la expresión de RhoGAP29 y ROCK2, proteínas reguladoras de la organización de actina. (a-b) Western Blots representativos de la expresión de (a) RhoA y (b) ROCK2. Los diagramas de barras resumen los datos del western blot. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan la proporción media + SEM. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control para Student's t-test.

regulada por estimulación proveniente de los botones axonales, estos resultados sugieren que la maduración de las espinas dependiente de la estimulación desde la terminal presináptica podría estar jugando un rol importante en la dinámica de las espinas.

6.0.8. El silenciamiento de PINK1 no afecta la expresión de Akt, aunque disminuye su fosforilación, de las neuronas de hipocampo de ratón

Para determinar si el silenciamiento de PINK1 regula la expresión o activación de Akt, una de las principales proteínas de supervivencia, analizamos su nivel de expresión. En nuestro grupo de investigación hemos encontrado que la disminución de PINK1 causa muerte neuronal en varias células de línea celular y que esta muerte está medida por la reducción de activación de Akt [23]. Encontramos que el silenciamiento de PINK1 no tuvo efecto sobre la expresión de proteína quinasa B (Akt) comparado con las neuronas control [shCTL = 1.01 ± 0.09 vs. shPINK1 = 1.04 ± 0.07] (Figura 6.8b). Sin embargo, el silenciamiento disminuyó significativamente un 13 % la fosforilación de Akt comparado con las neuronas control [shCTL = 0.97 ± 0.03 vs. shPINK1 = 0.84 ± 0.04] (Figura 6.8). Estos resultados, junto con el hecho que el silenciamiento no causó muerte neuronal (Figura 6.1e) sugiere que las neuronas podrían ser más vulnerables a la neurodegeneración debido a un desequilibrio sináptico.

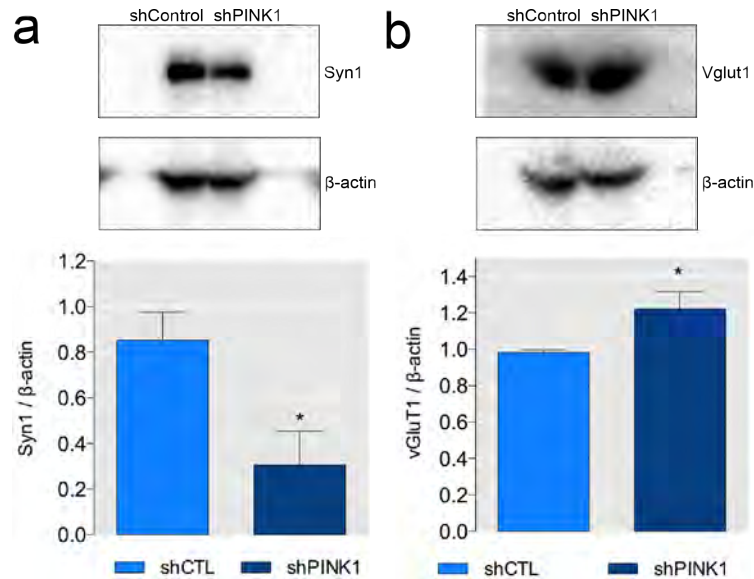


Figura 6.7: El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de Syn1 y aumenta la expresión de vGluT1. (a-b) Western Blots representativos de la expresión de (a) Syn1 y (b) vGluT1. Los diagramas de barras resumen los datos del western blot. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan la proporción media + SEM. *P < 0.05 vs. control para Student's t-test.

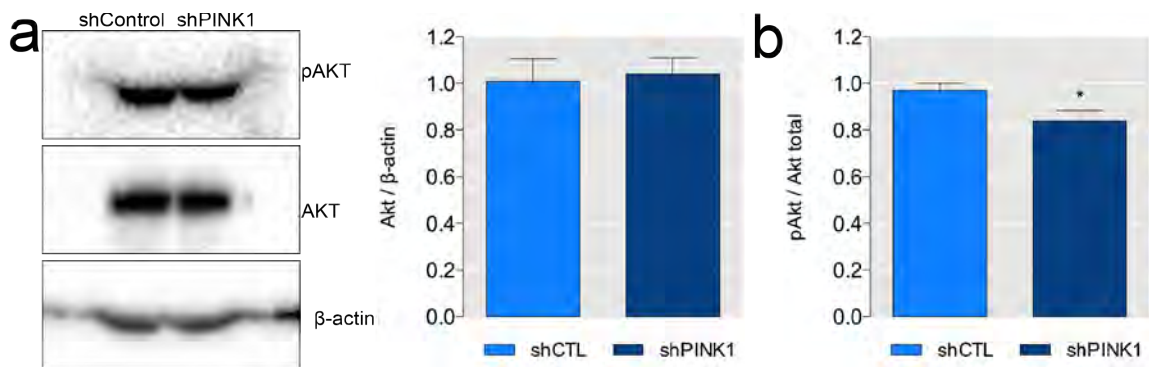


Figura 6.8: El silenciamiento de PINK1 no afecta la expresión, pero sí la fosforilación de Akt. (a-b) Western Blots representativos de la expresión de (a) Akt y (b) pAkt (Thr308). Los diagramas de barras resumen los datos del western blot. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan la proporción media + SEM. *P < 0.05 vs. control para Student's t-test.

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que en neuronas de hipocampo de ratón, el silenciamiento de PINK1 puede cambiar la dinámica de espinas dendríticas. En nuestros experimentos, el silenciamiento de PINK1 aumentó la densidad de espinas generando un mayor número de espinas Thin, mientras que disminuyó el tamaño de la cabeza de las espinas Stubby. Encontramos que el silenciamiento de PINK1 disminuyó la expresión de las proteínas postsinápticas PDS95 y Shank y la expresión de los receptores de glutamato NR2B y mGluR5, mientras que aumentó la expresión de las proteínas reguladoras del citoesqueleto RhoGAP29 y ROCK2. Además, detectamos que el silenciamiento reguló proteínas presinápticas disminuyendo la expresión de Syn1 y aumentando la expresión de vGluT1. Y encontramos que el silenciamiento disminuyó la fosforilación de Akt.

A nuestro entender, el estudio de Yu y col. [54] es el único que reporta que el silenciamiento de PINK1 aumenta la densidad de espinas de hipocampo. En nuestra investigación, el principal hallazgo es que en neuronas de hipocampo de ratón, el aumento de la densidad de espinas debido al silenciamiento de PINK1 genera un mayor número de espinas Thin, mientras que disminuye el tamaño de la cabeza de las espinas Stubby (figura 6.2). Estos resultados, junto con los resultados de otros autores sobre anomalías presinápticas debido a la deficiencia de PINK1 [8, 10, 48] respaldan la hipótesis que la vía de señalización de PINK1 regula la morfología sináptica de las neuronas de hipocampo. En nuestros experimentos, el silenciamiento de PINK1 causó dos principales alteraciones en las espinas. Una alteración fue el aumento del número de espinas y se ha reportado que un aumento en la densidad de espinas puede aumentar la excitabilidad y vulnerabilidad a la muerte celular por excitotoxicidad [54]. La otra alteración fue la reducción del tamaño de las espinas Stubby calculado por la disminución del diámetro de la cabeza. Si el tamaño de la espina está estrechamente relacionado con el tamaño de su sinapsis [56], estas espinas Stubby pueden tener una sinapsis más pequeña que la sinapsis de las espinas Stubby de las neuronas control. De este modo, el silenciamiento de PINK1 puede cambiar la dinámica de

las espinas al aumentar la densidad de espinas y reducir su tamaño.

En nuestros experimentos, el silenciamiento de PINK1 aumentó 40 % la densidad de espinas. En el estudio de Yu y col. [54], el silenciamiento de PINK1 incrementó 30 % la densidad de espinas. Esta diferencia pudo deberse a que en nuestro estudio utilizamos neuronas de ratón, no de rata. Creemos que ésta es la razón para la diferencia entre los dos estudios por dos razones. Primero, las condiciones de los cultivos de los dos estudios fueron similares: Ellos cultivaron neuronas E18 de ratas Sprague-Dawley sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, añadieron arabinósido de citosina por 24h, transfectaron a los 9 DIV y realizaron inmunofluorescencia 3 días después de la transfección. Nuestros experimentos se describen en la sección 5.3.1. Y más importante, que hay diferencias establecidas entre los cultivos de neuronas de hipocampo de ratón y rata. Las neuronas de hipocampo de ratón se desarrollan más lento, son más pequeñas y menos resistentes a la muerte celular [78]. Por otro lado, la densidad de espinas de las neuronas control de nuestro estudio se encuentra dentro del rango de espinas de neuronas de hipocampo de ratón en vitro [58,59].

El aumento de la densidad de espinas debido al silenciamiento de PINK1 contrasta con la disminución de la densidad de espinas en otros modelos de la EP [51,53,79]. Estudios anteriores de modelos animales de la EP han investigado cambios en la densidad y morfología de las espinas de neuronas espinosas medianas del estriado causados por las neurotoxinas 6-OHDA y MPTP y han demostrado una reducción del 30-50 % en la densidad de las espinas [51, 53]. Una diferencia importante entre nuestro estudio y los estudios con neurotoxinas es que mientras con el silenciamiento de PINK1 las neuronas están saludables (figura 6.1d-e), en los estudios con estas neurotoxinas, las neuronas tienen, de entrada, un daño mitocondrial. Los daños mitocondriales causados por estas neurotoxinas reducen el tráfico mitocondrial dendrítico disminuyendo el tamaño y complejidad de las dendritas [6], y el número de espinas [52, 53].

El aumento del número de espinas puede aumentar el input excitatorio que recibe la neurona y, por lo tanto, hiperexcitarla [80]. Con este esquema, el aumento en la excitabilidad de la neurona puede incrementar la vulnerabilidad a la muerte celular por excitotoxicidad [40]. En nuestro estudio, el aumento del número de espinas puede desencadenar una respuesta hiperexcitatoria. Esta excitotoxicidad puede ser mediada por la hiperactivación de los NMDARs resultando en una entrada masiva de Ca^{2+} . El incremento de Ca^{2+} en el citosol activa un número de enzimas dependientes de Ca^{2+} , incluyendo PKC, fosfolipasa C, proteína quinasa 2 dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina y diversas proteasas y nucleasas. La activación inducida por Ca^{2+} de enzimas implicadas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácido nucleico puede conducir a la muerte celular a través de diferentes vías [47]. Por ejemplo, la activación de Calmodulina en la cabeza de las espinas puede cambiar la organización del citoesqueleto de las espinas y conducir a las alteraciones características de las espinas de las neuronas del estriado de modelos neurotóxicos de la EP, o cambiarlo semejantes a las alteraciones de las neuronas del estriado de cerebros de pacientes con EP [79].

Sin embargo, que la cabeza de las espinas Stubby sea más pequeña, puede considerarse como una clase de respuesta compensatoria para disminuir la hiperexcitabilidad causada por el incremento del número de espinas. Las neuronas de la corteza e hipocampo regulan su propia actividad aumentando o disminuyendo la fuerza de su input excitatorio [81]. Cuando su activación aumenta, la fuerza sináptica excitatoria se reduce, y cuando su activación disminuye, a fuerza sináptica excitatoria se amplía. Esto ocurre a través del aumento o disminución del número de receptores de glutamato postsinápticos. Este cambio en el número de receptores parece ocurrir en todas las sinapsis de una neurona, probablemente como resultado de cambios en el tamaño de la sinapsis [81]. En nuestro estudio, creemos que el silenciamiento de PINK1 puede ajustar la morfología de las espinas y, así, compensar cualquier desbalance en el input excitatorio. La disminución del tamaño de la sinapsis podría ajustar el input excitatorio dentro del rango funcional de las neuronas de hipocampo. Por otro lado, el hecho que la mayoría de las nuevas espinas sean espinas Thin puede reflejar que el incremento de la espinogénesis es reciente o que el silenciamiento de PINK1 de alguna forma regula la maduración de las espinas. Para probar esto, planteríamos un diseño experimental en donde después de la transfección, analizaríamos la dinámica de espinas en diferentes tiempos.

Una imprecisión de nuestros datos estuvo relacionada con el diámetro medio de la cabeza de las espinas Filopodia en el sentido que fue mayor al diámetro medio de la cabeza de las espinas Thin. Creemos que esto pudo deberse a una limitación del software que usamos para calcular la densidad de las espinas. Para calcular y clasificar las espinas, hicimos uso del software *NeuronStudio* [77] que por defecto, clasifica las espinas en Thin, Stubby o Mushroom siguiendo unos parámetros de comparación entre diferentes proporciones de la espina (sección 5.3.5). Usamos estos parámetros preestablecidos para nuestros cálculos de las espinas Thin, Stubby y Mushroom. Debido a que en esta configuración, el software no tiene un parámetro para seleccionar las espinas Filopodio, clasificamos manualmente todos los Filopodios. Encontramos que en nuestras neuronas, algunos Filopodios tenían un cuello largo y ancho. De esta manera, espinas alargadas sin una cabeza claramente definida se clasificaron como Filopodia obviando la proporción entre largo y diámetro del cuello. A pesar de esta limitación, el software para análisis de las espinas *NeuronStudio* tiene ventajas sobre el software previamente usado en nuestro grupo. Al igual que el software *ImageJ* usado en la investigación de Baez y col. [82], *NeuronStudio* también utiliza las proyecciones a través del plano Z de las imágenes para reconstruir un modelo de los segmentos dendríticos seleccionados brindando una precisión comparable al otro software. A diferencia de *ImageJ*, este software no sólo clasifica las espinas, sino que además mide el diámetro de la cabeza de las espinas que aquí, se utilizó para explorar otro aspecto de la morfología de espinas.

Al enfocarnos en los cambios morfológicos de las espinas, encontramos que en las neuronas de hipocampo de ratón, el silenciamiento de PINK1 disminuyó la expresión de las proteínas de la densidad postsináptica PDS95 y Shank (figura 6.4). Este resultado concuerda con el estudio de Dagda y col. en el que la sobreexpresión de PINK1 promueve la expresión de las proteínas

MAP2B, asociada con el ensamble de los microtúbulos en las dendritas, y PSD95 de las células SH-SY5Y en ausencia de factores de diferenciación [6]. Si la sobreexpresión de PINK1 aumenta la expresión de PSD95, el silenciamiento de PINK1 puede disminuir su expresión tal y como encontramos en nuestro estudio. Por otro lado, la deficiencia de Shank se ha asociado principalmente con desórdenes del espectro autista y más recientemente con la EA [83]. Por ejemplo, se ha reportado disminución de Shank1 y Shank3 en ratones transgénicos para APP. En neuronas de corteza tadas con amiloide β , la expresión de Homer, mGluR1 y Shank1 disminuye de manera similar [83]. Creemos que la disminución del 30% en la expresión de PSD95 y Shank en nuestros experimentos, junto con la tendencia de la expresión de estas proteínas a disminuir reportadas por otros autores respaldan la hipótesis que la deficiencia de PINK1 puede reducir la densidad postsináptica de las espinas de las neuronas de hipocampo.

Se ha reportado que Parkin se asocia con proteínas con dominios de unión PDZ de la densidad postsináptica de tal forma que la sobreexpresión de mutaciones de Parkin vinculadas con la EP incrementan la expresión de PSD95 en neuronas de hipocampo [44]. Parkin es una E3 ubiquitina ligasa asociada con la degradación de proteínas vía proteosoma. Se ha reportado que la activación de Parkin requiere la fosforilación de PINK1 para la degradación de mitocondrias por mitofagia [27]. Si la degradación de proteínas postsinápticas por medio de Parkin fuera mediada por PINK1, la deficiencia de PINK1 disminuiría la actividad de Parkin e inhibiría la degradación de proteínas postsinápticas. Nuestros resultados se oponen a esta hipótesis ya que la expresión de PSD95 y Shank disminuyó debido al silenciamiento de PINK1 (figura 6.4). Sin embargo, la deficiencia de PINK1 disminuiría la actividad de Parkin, siempre que la degradación de proteínas de la densidad postsináptica fuera mediada por PINK1 fosforilando y activando Parkin. A nuestro entender, no se ha reportado que la activación de Parkin por PINK1 sea suficiente o necesaria para la degradación de proteínas postsinápticas. De este modo, creemos que la vía de señalización de PINK1 que regula la expresión de proteínas postsinápticas es diferente a la vía de señalización de Parkin regulando estas mismas proteínas. Para probar esto, planteríamos un diseño experimental en donde compararíamos la expresión de proteínas postsinápticas debido al silenciamiento de PINK1, al silenciamiento de Parkin y al cosilenciamiento de PINK1 y Parkin.

Los NMDARs y mGluRs se han asociado con la vulnerabilidad a la muerte neuronal por excitotoxicidad [47]. Se ha reportado que la deficiencia de PINK1 disminuye la actividad protectora de NR2As promoviendo mayor vulnerabilidad a la muerte neuronal [84]. También se ha reportado que el aumento de la actividad de NR2Bs debida a una limitación de oxígeno y glucosa reduce la expresión de PINK1 y contribuye a la muerte neuronal en neuronas corticales [85]. Por otro lado, el NMDAR se enlaza funcionalmente con mGluR5 por medio del complejo PSD95/GKAP/Shank/Homer lo que les permite interactuarse incrementando el Ca^{2+} en las espinas a través de la activación del IP3R del retículo endoplasmático y aumentando la vulnerabilidad a la muerte neuronal por excitotoxicidad [47]. En nuestros experimentos, la disminución de la expresión de NR2B y mGluR5 debido al silenciamiento (figura 6.5) sugiere que la deficiencia de PINK1 no aumenta la susceptibilidad a la muerte neuronal por excitotoxicidad

mediada por la activación de NR2B o mGluR5.

Por el contrario, se ha reportado que el uso de antagonistas de mGluR5 activa vías de señalización con propiedades modificadoras de la enfermedad que modulan la viabilidad celular y las repuestas al estrés como la vía de señalización de las MAPK/ERK en modelos de la EP [47]. La disminución de la expresión de mGluR5 debido al silenciamiento de PINK1 puede inhibir la protección conferida por la activación de vías de señalización mediadas por la activación de este receptor. La función de los NMDARs depende de su localización: activación de NMDAs extrasinápticos puede activar vías de señalización que contribuyen a la neurodegeneración y muerte neuronal, mientras que la activación de NMDARs sinápticos puede promover la supervivencia neuronal [84]. Cuando la activación de NR2B, una clase de NMDAR, se localiza en la densidad postsináptica, la entrada de Ca^{2+} activa vías de señalización relacionadas con el desarrollo o la plasticidad sináptica [84]. Por ejemplo, por medio del complejo PSD95/GKAP/Shank/Homer, los NMDARs se enlazan con mGluRs lo que les permite incrementar el Ca^{2+} a través de NMDAR e IP3R. Este aumento de Ca^{2+} puede generar cambios en la morfología de las espinas que se asocian con eventos de plasticidad sináptica mediados por Ca^{2+} [56]. De este modo, la disminución de la expresión de NR2B y mGluR5 debida al silenciamiento de PINK1 puede reflejar una respuesta compensatoria disminuyendo el input glutamatérgico, encogiando las espinas y, así, debilitando la fuerza sináptica. La disminución de los receptos de glutamato conduce a la reducción de la activación sináptica lo que inhibe la maduración de las espinas [56].

Pearlstein y col. [41] han propuesto que mutaciones en PINK1 desvían la secuencia del desarrollo neuronal dependientes de la activación de NMDARs en etapas tempranas de la EP, lo que puede culminar en manifestaciones clínicas en el envejecimiento. La deficiencia de PINK1 altera las actividades de la maduración normal de las sinapsis mediadas por la actividad de los NMDARs en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. En nuestros experimentos, el silenciamiento de PINK1 disminuyó la expresión de receptores de glutamato (figura 6.5) que junto con el estudio de Pearlstein y col. [41] apoyan la hipótesis que la deficiencia de PINK1 altera la transmisión sináptica glutamatérgica.

Se ha reportado que en un modelo transgénico de EP, la sobreexpresión de α sinucleína incrementa la expresión de mGluR5 y aumenta su acción excitotóxica en neuronas del estriado. Este incremento en la expresión de mGluR5 se ha demostrado en pacientes con EP [47]. En nuestros experimentos, la disminución de la expresión de mGluR5 debido al silenciamiento de PINK1 no contribuiría a la excitotoxicidad mediada por este receptor. Debido a la disminución en la expresión de mGluR5, la activación de vías de señalización de muerte neuronal dependientes de la activación de mGluR5 tendrán menos efecto y no incrementará la vulnerabilidad a la muerte neuronal por excitotoxicidad de las neuronas de hipocampo. Creemos que la disminución de la expresión de mGluR5 debido al silenciamiento de PINK1 no afecta la supervivencia de las neuronas de hipocampo de nuestros experimentos porque las neuronas no están bajo ningún estrés excitotóxico y de hecho, el silenciamiento de PINK1 no incrementó la muerte celular (fi-

gura 6.1e). Para probar si el silenciamiento de PINK1 incrementa la vulnerabilidad a la muerte neuronal por excitotoxicidad, diseñamos un experimento en el que las neuronas de hipocampo silenciadas se exponen a un contexto excitotóxico como por ejemplo un aumento en la concentración de glutamato.

La familia Rho GTPasas es una familia de proteínas que regulan el citoesqueleto de actina. RhoA/ROCK2 están involucradas tanto en la motilidad y estabilidad de las espinas. RhoA afecta la densidad y longitud de las espinas. Cuando RhoA se activa, la densidad de espinas disminuye y la mayoría de las espinas desarrollan cuellos cortos como las espinas Stubby. Por el contrario, la inhibición de RhoA tiene el efecto opuesto: la densidad de espinas aumenta y la mayoría de las espinas desarrollan cuellos largos como las espinas Thin [56]. En nuestros experimentos, el silenciamiento de PINK1 aumentó la expresión de las proteínas RhoGAP29 y ROCK2 (figura 6.6). RhoGAP29 suprime la señalización de RhoA y disminuye la activación de ROCK, una proteína efectora de RhoA. Nuestros resultados concuerdan parcialmente con los cambios morfológicos de las espinas debidos a la inhibición de RhoA. El aumento de la expresión de RhoGAP29 debido al silenciamiento de PINK1 pueden inhibir RhoA incrementando la densidad de espinas y aumentando las espinas con cuellos largos y cabezas pequeñas como las espinas Thin. Este resultado sugiere que PINK1 puede regular el proceso de maduración de las espinas de las neuronas de hipocampo.

En nuestros experimentos, el silenciamiento de PINK1 aumentó la expresión de ROCK2, una de las principales proteínas efectoras de RhoA (figura 6.6). Si la regulación de la morfología de las espinas fuera mediada por el complejo RhoA/ROCK2, entonces el silenciamiento de PINK1 disminuiría la expresión de ROCK2. El aumento de la expresión de RhoA y ROCK2 no concuerda con la hipótesis que la regulación de la dinámica de espinas es mediada por el complejo RhoA/ROCK2. Sin embargo, se ha reportado que ROCK no necesita ser activada por RhoA o por fosforilación porque siempre está activo y si ROCK2 fosforila sus substratos, dependería únicamente de su localización subcelular [86]. De esta forma, el aumento de la expresión de ROCK2 puede ser causado por un mecanismo autoregulatorio independiente de RhoA. Como resultado de la activación de ROCK2 puede activarse la quinasa LIM, que fosforila Cofilin, inhibiendo su actividad despolimerizadora de actina [56].

Evidencia previa que muestra deterioros en la liberación de neurotransmisor en diferentes clases de neuronas debido a la deficiencia de PINK1 apunta a una alteración presináptica [8, 48]. En nuestros experimentos, la disminución de la expresión de Syn1 debido al silenciamiento de PINK1 también apunta a una alteración presináptica (figura 6.7a). Estos resultados sugieren que las anomalías en la liberación del neurotransmisor debido a la deficiencia de PINK1 pueden deberse a modificaciones en la expresión de proteínas del tráfico de vesículas sinápticas. Sin embargo, no hay evidencia concreta sobre qué proteínas están involucradas en estas anomalías. Por ejemplo, se ha reportado que la deficiencia de PINK1 disminuye la expresión de la proteína HSP70, la cual interactúa con Syntaxina, una de las proteínas del complejo SNARE.

La disminución de HSP70 suprime la sobreexpresión de Syntaxina lo que se refleja en una disminución en la liberación de neurotransmisor [87]. Sin embargo Feligini y col. [48] no encontraron cambios en la expresión de Syntaxin1a en neuronas de hipocampo de ratón de seis meses de edad.

También encontramos un aumento en el nivel de expresión de vGluT1 (figura 6.7b). Este resultado concuerda con el incremento de vGluT1 y vGluT2 en cerebros de pacientes con EP [43]. Como también concuerda con el incremento de vGluT1 en el estriado de monos tratados con MPTP [79]. El nivel de expresión de vGluT1 regula directamente la cantidad de liberación de glutamato, proporcionando un mecanismo presináptico para controlar la fuerza sináptica [88]. Un aumento en la expresión de vGluT1 puede resultar en una mayor concentración de glutamato por vesícula reflejándose en un incremento de eventos sinápticos espontáneos glutamatérgicos que no afectan la plasticidad a largo plazo tal y como se ha reportado en neuronas de hipocampo [8]. De hecho, la deficiencia de PINK1 incrementa la frecuencia de la transmisión excitatoria espontánea de neuronas de hipocampo de ratón de seis meses de edad [48]. PINK1 podría contribuir a preservar la función sináptica y la homeostasis glutamatérgica en el hipocampo, una región cerebral subyacente a la cognición. Estos eventos sinápticos reflejan cambios presinápticos debidos a la deficiencia de PINK1 y apoyan la hipótesis que la deficiencia de PINK1 altera la transmisión sináptica de las neuronas de hipocampo.

Al enfocarnos en los cambios presinápticos de las terminales axonales, encontramos que en las neuronas de hipocampo de ratón, el silenciamiento de PINK1 disminuyó la expresión de la proteína Syn1 y aumentó la expresión de la proteína vGluT1 (figura 6.7). Syn1 se ha asociado con la agrupación de vesículas sinápticas disponibles para la liberación mediante exocitosis. Syn1 une las vesículas sinápticas a componentes del citoesqueleto lo que les impide migrar a la membrana presináptica para liberar el neurotransmisor. Durante un potencial de acción, Syn1 se fosforila mediante PKA, liberando las vesículas sinápticas y permitiendo que se muevan a la membrana y liberen su neurotransmisor [89]. Una disminución en la expresión de Syn1 resultaría en una disminución del número de vesículas sinápticas liberadas tras un potencial de acción debilitando así la fuerza sináptica.

Por otro lado, vGluT1 se encuentra en la membrana de las vesículas sinápticas y transporta glutamato desde el citoplasma de la neurona hacia el interior de las vesículas de tal forma que pueda liberarse en la sinapsis. Ya que el número de transportadores por vesícula afecta el tamaño del quanta sináptico, el incremento en el nivel de la expresión de vGluT1 podría fortalecer la sinapsis. Un incremento de la expresión de vGluT1 resultaría en una mayor concentración de glutamato por vesícula sináptica [88]. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de PINK1 puede desviar el funcionamiento sináptico de las neuronas de hipocampo a través de la regulación de la expresión de vGluT1. Este funcionamiento sináptico de las terminales glutamatérgicas debido al silenciamiento de PINK1 puede generar efectos sutiles en la neurotransmisión de las neuronas de hipocampo.

La disminución de Syn1, el aumento de vGluT1 y la movilización del grupo de vesículas sinápticas disponibles para la liberación dependiente de ATP regulados por la deficiencia de PINK1 son eventos no excluyentes. ATP se convierte en cAMP y activa PKA, la cual media la movilización y permite su posterior reclutamiento en la zona activa mediante la fosforilación de Syn1 [89]. La deficiencia de PINK1 disminuye los niveles de ATP presináptico inhibiendo también el ciclo de vesículas sinápticas [90]. De la misma forma que el retículo endoplasmático, las mitocondrias son capaces de secuestrar y liberar Ca^{2+} modulando así los eventos de señalización dependientes del Ca^{2+} y preservando la homeostasis de Ca^{2+} . De esta forma, estos resultados sugieren que es probable que la deficiencia de PINK1 afecte varios procesos presinápticos mediados por ATP.

La disminución de la activación de Akt causada por la deficiencia de PINK1 se ha demostrado en varias clases de células [20,23,85]. En nuestros experimentos, encontramos que el silenciamiento de PINK1 mantuvo estable el nivel de expresión de Akt, aunque redujo su fosforilación (figura 6.8). En nuestro grupo de investigación hemos demostrado que el silenciamiento de PINK1 incrementa la muerte celular asociada con la disminución de la fosforilación de Akt en células mesencefálicas [23]. En nuestros experimentos, el silenciamiento no incrementó la muerte neuronal (figura 6.1e). La disminución de la fosforilación de Akt debida al silenciamiento de PINK1 puede incrementar la vulnerabilidad a la muerte neuronal. Para probar esto, plantearíamos un diseño experimental en donde expondríamos a las neuronas a un contexto excitotóxico, por ejemplo, incrementando la concentración de glutamato extracelular, y determinaríamos si el silenciamiento de PINK1 tiene algún efecto sobre la supervivencia neuronal.

Se ha reportado que la activación de NR2Bs debida a una privación de oxígeno y glucosa inhibe la fosforilación de Akt, mientras que la sobreexpresión de PINK1 neutraliza la inhibición de la fosforilación de Akt en neuronas corticales, sugiriendo que Akt puede estar corriente abajo de PINK1 [85]. Por otro lado, en nuestro grupo hemos encontrado que la exposición al factor de crecimiento IGF1 de neuronas mesencefálicas estimula la fosforilación de Akt [23]. También se ha reportado que la exposición al factor de crecimiento BDNF tiene varios efectos, entre los cuales están que aumenta la supervivencia mediada por Akt [91], aumenta la longitud del cuello de la espina, disminuye la cabeza de la espina y el número de espinas [92]. Sería interesante probar si las vías de señalización activadas por BDNF o IGF1 están reguladas por PINK1 y si afectan la supervivencia o la dinámica de espinas de las neuronas de hipocampo.

En este estudio hemos reportado efectos presinápticos y postsinápticos debidos al silenciamiento de PINK1 en neuronas de hipocampo. La pregunta final sería ¿dónde está y cuál es la función de PINK1? Se ha reportado que PINK1 puede estar en las terminales axonales y en la base del cuello de las dendritas [6,8]. Se desconoce si PINK1 se encuentra en las espinas. Para probar esto, podríamos hacer un experimento de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo antiPINK1 para analizar la localización de la proteína PINK1 en las espinas. Si PINK1 se expresara en este compartimento, es muy probable que PINK1 tenga actividades fisiológicas en las espinas independiente de las actividades protectoras en las mitocondrias, pues se sabe que

es muy improbable que haya mitocondrias en las espinas [56]. Sin embargo, si PINK1 no se localizara en las espinas, es probable que PINK1 estuviera regulando la morfología de las espinas indirectamente bien sea desde el compartimento de las dendritas o desde el compartimento de las terminales axonales (figura 7.1).

Nuestros resultados corroboran los resultados de otros estudios donde reportan que PINK1 puede regular la transmisión sináptica en la terminal axonal [8]. El esquema de referencia común de las funciones sinápticas de PINK1 gira en torno a la protección del funcionamiento mitocondrial normal. La deficiencia de PINK1 aumentaría la vulnerabilidad de las neuronas a la muerte neuronal por el desbalance de las funciones sinápticas dependientes de ATP [9]. Nuestros resultados sugieren que PINK1 puede regular la movilización del grupo de vesículas sinápticas disponibles para la liberación (figura 6.7). La movilización del grupo de vesículas sinápticas disponibles para la liberación depende de la inactivación de Syn1. Syn1 puede ser fosforilada por cAMP. La fosforilación de Syn1 causa su disociación de la membrana vesicular [89]. Si Syn1 permaneciera activa, las vesículas permanecerían unidas al citoesqueleto disminuyendo la liberación de neurotransmisor.

Nuestros resultados también sugieren que PINK1 puede regular la concentración de glutamato vesicular (figura 6.7). vGluT1 llena las vesículas sinápticas con neurotransmisor en función del potencial de membrana generado por V-ATPase. V-ATPase cambia el pH de las vesículas sinápticas. Se ha reportado que la deficiencia de PINK1 disminuye la expresión de V-ATPase [93]. Si la deficiencia de PINK1 estuviera afectando el nivel de ATP en las terminales axonales, el potencial de membrana generado por V-ATPase se debilitaría disminuyendo la concentración de Glutamato vesicular. Así, la deficiencia de PINK1 puede deteriorar la transmisión sináptica deteriorando la función de V-ATPase. Esto explicaría el aumento de la expresión de vGluT: El debilitamiento del potencial de membrana vesicular debido a la disminución de ATP, aumentaría la expresión de vGluT1 como una respuesta compensatoria.

En conclusión, hemos mostrado que en neuronas de hipocampo de ratón, el silenciamiento de PINK1 cambia la dinámica de espinas dendríticas. En nuestros experimentos, el silenciamiento PINK1 aumentó la densidad de espinas y desarrolló más espinas Thin, mientras que no tuvo ningún efecto sobre la densidad de los Filopodios y espinas Stubby y Mushroom. Además, el silenciamiento PINK1 redujo la cabeza de las espinas Stubby. Encontramos que el silenciamiento de PINK1 disminuyó la expresión de las proteínas postsinápticas PDS95 y Shank y la expresión de los receptores de glutamato NR2B y mGluR5, mientras que aumentó la expresión de las proteínas reguladoras del citoesqueleto RhoGAP29 y ROCK2. Detectamos que el silenciamiento reguló proteínas presinápticas disminuyendo la expresión de Syn1 y aumentando la expresión de vGluT1. Y encontramos que el silenciamiento disminuyó la activación de Akt. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de PINK1 puede desviar el funcionamiento sináptico de las neuronas de hipocampo a través de la regulación de la morfología de las espinas. La dinámica de espinas causado por el silenciamiento de PINK1 podría generar efectos sutiles

en la neurotransmisión de las neuronas de hipocampo. Estos efectos eventualmente pueden conducir a la neurodegeneración y deterioro cognitivo que a menudo se observa en la enfermedad de Parkinson.



Figura 7.1: Modelo del efecto de PINK1 sobre la espina dendrítica. El silenciamiento PINK1 promueve un aumento de la densidad de espinas dendríticas (Arriba a la izquierda). Las flechas y T's rojas representan los efectos del silenciamiento de PINK1. Las flechas blancas representan las vías de señalización entre las proteínas sinápticas. **En la terminal axonal:** El silenciamiento de PINK1 promueve el incremento de la concentración de glutamato en las vesículas presinápticas, mientras interrumpe la movilización del grupo de vesículas sinápticas disponibles para la liberación. **En la espina dendrítica:** El silenciamiento de PINK1 interrumpe la transmisión sináptica reduciendo los receptores de glutamato e interrumpe vías de señalización mediada por proteínas de la densidad postsináptica como las vías de señalización reguladoras de la polimerización de actina y la vía de supervivencia de Akt.

CONCLUSIONES

- Los protocolos que diseñamos para cultivar neuronas de hipocampo de ratón y silenciar PINK1 nos permiten cultivar neuronas de hipocampo saludables y podemos así evaluar la dinámica de espinas dendríticas entre las dos clases de neuronas.
- En neuronas de hipocampo de ratón, el silenciamiento de PINK1 cambia la dinámica de espinas dendríticas generando un mayor número de espinas tipo Thin, mientras que disminuyó el tamaño de la cabeza de las espinas Stubby.
- En neuronas de hipocampo de ratón, el silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de las proteínas postsinápticas PSD95 y Shank y la expresión de los receptores de glutamato NR2B y mGluR5, mientras que aumenta la expresión de las proteínas reguladoras del citoesqueleto RhoGAP29 y ROCK2. Detectamos que el silenciamiento regula proteínas presinápticas disminuyendo la expresión de Syn1 y aumentando la expresión de vGluT1. Y comprobamos que el silenciamiento disminuye la activación de Akt.

ANEXO A: DIFICULTADES CON LA ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS

Uno de los objetos de esta investigación es estandarizar el protocolo de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Una de las integrantes de nuestro grupo había aprendido cómo hacer este cultivo en una pasantía en el laboratorio de la Dra. Michela Matteoli, directora del Área de Investigación Neurológica del Instituto Clínico Humanitas y docente del Departamento de Medicina Traslacional y Biotecnología Médica de la Universidad de Milán y queríamos ampliar nuestras investigaciones sobre enfermedades neurodegenerativas y muerte celular utilizando este modelo celular.

La principal dificultad que enfrentamos fue conseguir cultivos primarios saludables. Las neuronas cultivadas desarrollan prolongaciones dendríticas y axonales siempre y cuando tengan una superficie adecuada para adherirse [76]. En nuestro laboratorio, empezamos a sembrar las células en los cubreobjetos que teníamos disponibles (Citoglas). Con estos cubreobjetos, las células se adhieren bien los primeros días del cultivo. Sin embargo, a medida que las neuronas se diferenciaban, no estaban sobre una superficie adecuada para su desarrollo a pesar de que probamos diferentes concentraciones de poly-L-lysine. Debido a esto, los somas de las neuronas se agrupaban formando una clase de esféricas, pero interrumpiendo la morfología de las dendritas (figura 1 izquierda). Cuando detectamos esta variable, cambiamos los cubreobjetos por unos cubreobjetos hechos de borosilicato (Iimglas), consiguiendo así una superficie de adherencia óptima para el crecimiento neuronal en vitro (figura 1 derecha).

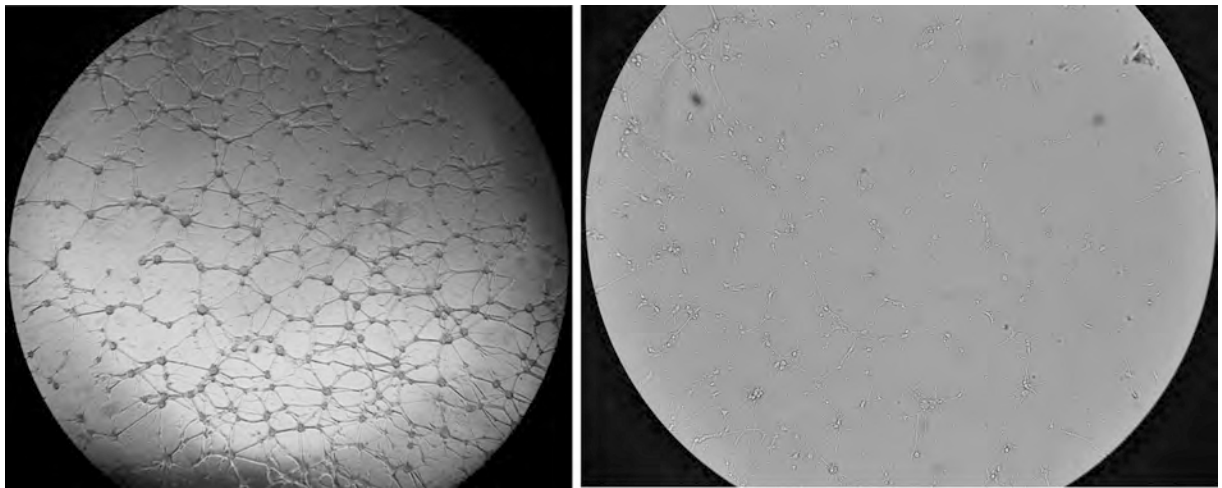


Figura 1: Transfección de cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Imagen de fluorescencia de un cultivo primario de neuronas de hipocampo de 13 DIV, cotransfectadas con los plásmidos pEGFP-N1 (GFP) y pLenti6 (shPINK1). En la imagen de la **izquierda** las neuronas se cultivaron sobre cubreobjetos corrientes, mientras que en la imagen de la **izquierda** se cultivaron sobre cubreobjetos de borosilicato.

ANEXO B: DIFICULTADES CON EXPERIMENTOS DE INMUNOFLUORESCENCIA 1

Queríamos probar si el silenciamiento de PINK1 regula el tamaño de los contactos sinápticos. Para esto, originalmente habíamos transfectado las neuronas con GFP y detectamos las proteínas PSD95 y vGluT1 con un fluoróforo azul y rojo respectivamente. Sin embargo, el anticuerpo secundario con el fluoróforo azul no detectó ninguna proteína. Utilizamos diferentes clases de protocolos de inmunofluorescencia sin resultados satisfactorios. Luego decidimos sólo hacer el marcaje de las proteínas sin transfectar la neuronas para utilizar el fluoróforo verde como anticuerpo secundario para marcar PSD95 y el fluoróforo rojo para marcar vGluT1 (figura 1). Al momento de realizar este experimento, estábamos teniendo dificultades con la adherencia de las células, razón por la cual decidimos no tomar en cuenta estos resultados en la presente investigación. A continuación se describe el protocolo que seguimos para conseguir estas imágenes.

Tinción por inmunofluorescencia

Para la adquisición de las imágenes por microscopía confocal, las neuronas de hipocampo de 13 DIV se fijaron y se montaron en portaobjetos. Primero, se retiró el medio, se lavó con PBS a 37 °C y se fijó con la solución de fijación calentada a 37 °C por 8 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador, se lavó 3 veces con PBS, 3 veces con solución BAJA en sales y 3 veces con solución ALTA en sales por 5 min cada uno. Se permeabilizó con Goat Serum Dilution Buffer (GSDB) por 30 min. Se incubaron los anticuerpos primarios (tabla ??) diluídos en GSDB por 2 : 30 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con solución ALTA en sales por 5 min cada uno. Se incubó el anticuerpo secundario diluido en GSDB por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con solución ALTA en sales y 3 veces con solución BAJA en sales por 5 min cada uno. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con la solución de montaje, se dejaron secar, se sellaron con esmalte y se almacenaron a -20 °C protegidos de la luz hasta la toma de imágenes por microscopía confocal. (figura 1).

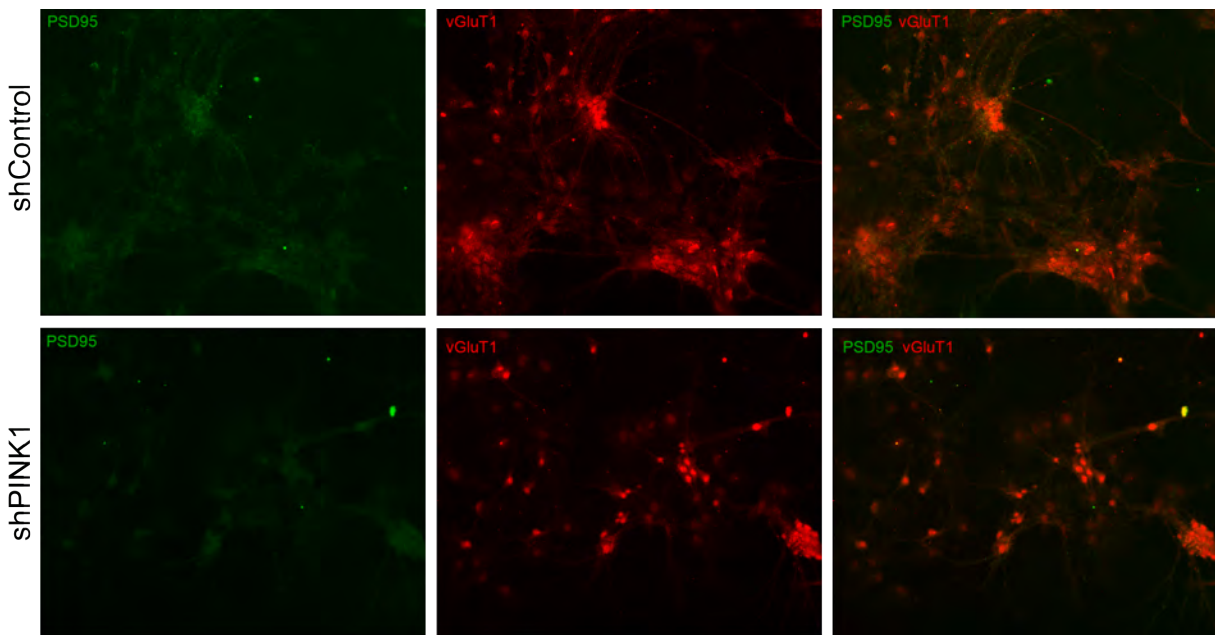


Figura 1: Regulación de proteínas sinápticas. Imagen de fluorescencia de un cultivo primario de neuronas de hipocampo que muestra la localización de las proteínas PSD95 (verde), vGluT1 (rojo) y su colocalización (merge).

ANEXO C: DIFICULTADES CON EXPERIMENTOS DE INMUNOFLUORESCENCIA 2

Queríamos conocer la densidad de sinapsis y si estas sinapsis se localizaban en las espinas. Para esto, las neuronas se cotrasfectaron con los plásmidos shCTL y GFP (azul) y se marcaron las proteínas PSD95 (verde), vGluT1 (rojo). Los resultados muestran que el plásmido fue incorporado por las neuronas, pero las proteínas no se detectaron (figura 1). Utilizamos los fluoróforos azul(405nm), verde (488nm) y rojo (568nm) porque el microscópio confocal tiene tres láseres que excitan a estas longitudes de onda. Se ensayaron diferentes protocolos variando el método de fijación, los componentes de los búfers y tiempo de incubación. Sin embargo, no obtuvimos resultados positivos. El protocolo que seguimos para conseguir estas imágenes fue el mismo que se describe en 7.

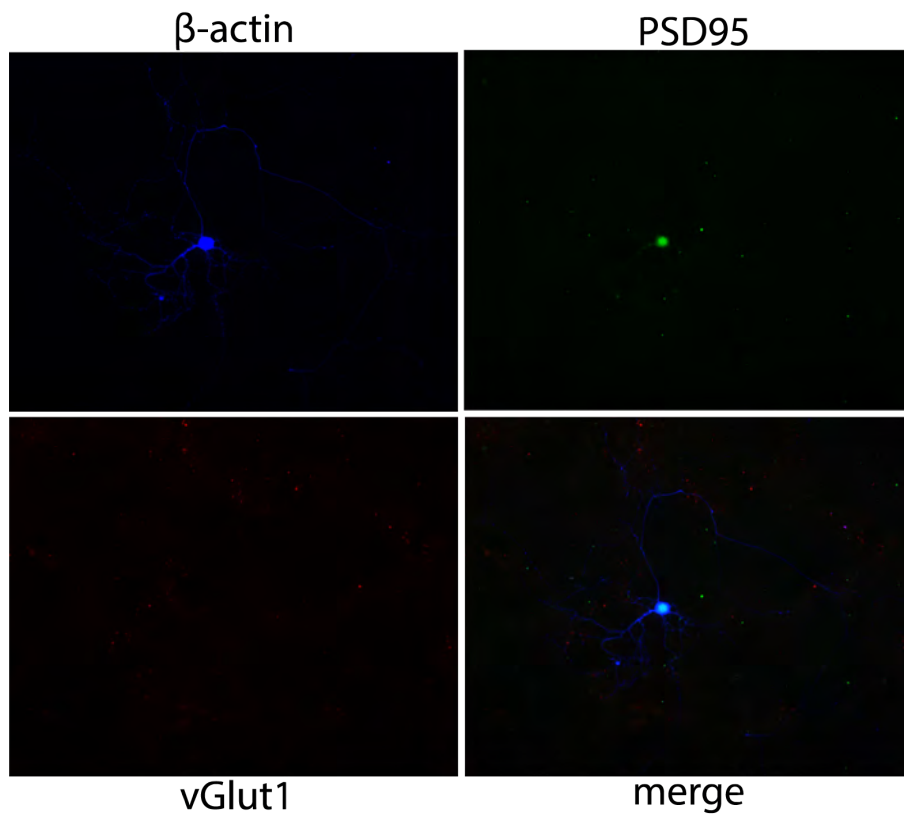


Figura 1: Transfección de cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Imagen de fluorescencia de un cultivo primario de neuronas de hipocampo cotransfectadas con los plásmidos shPINK1 y RFP que muestra la morfología de la neurona (β actin), PSD95 (verde), vGluT1 (rojo) y su colocalización (merge).

- [1] E.K. Tan. PINK1 mutations and differential effects on mitochondrial function. *Experimental Neurology*, 221(1):10–12, jan 2010.
- [2] C.A. Davie. A review of Parkinson’s disease. *British Medical Bulletin*, 86(1):109–127, 2008.
- [3] T. Gasser. Update on the genetics of Parkinson’s disease. In *Movement Disorders*, volume 22, pages 1–8, 2007.
- [4] E.M. Valente. Hereditary Early-Onset Parkinson’s Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science*, 304(5674):1158–1160, 2004.
- [5] W. Lin and U.J. Kang. Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. *Journal of Neurochemistry*, 106(1):464–474, jul 2008.
- [6] R.K. Dagda, I. Pien, R. Wang, J. Zhu, K.Z Wang, J. Callio, T.D. Banerjee, R.Y. Dagda, and C.T. Chu. Beyond the mitochondrion: Cytosolic PINK1 remodels dendrites through Protein Kinase A. *Journal of Neurochemistry*, 128(6):864–877, 2014.
- [7] Hitoshi Murata, Masakiyo Sakaguchi, Yu Jin, Yoshihiko Sakaguchi, Jun Ichiro Futami, Hidenori Yamada, Ken Kataoka, and Nam Ho Huh. A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: Activation of AKT via MTORC2. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9):7182–7189, 2011.
- [8] T. Kitada, A. Pisani, D.R. Porter, H. Yamaguchi, A. Tscherter, G. Martella, P. Bonsi, C. Zhang, E. N. Pothos, and J. Shen. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (27), 2007.
- [9] V.A. Morais, P. Verstreken, A. Roethig, J. Smet, A. Snellinx, M. Vanbrabant, D. Haddad, C. Frezza, W. Mandemakers, D. Vogt-Weisenhorn, R. Van Coster, W. Wurst, L. Scorrano, and B. De Strooper. Parkinson’s disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Molecular Medicine*, 1(2):99–111, 2009.

- [10] G. Madeo, T. Schirinzi, G. Martella, E.C. Latagliata, F. Puglisi, J. Shen, E.M. Valente, M. Federici, N.B. Mercuri, S. Puglisi-Allegra, P. Bonsi, and A. Pisani. PINK1 heterozygous mutations induce subtle alterations in dopamine-dependent synaptic plasticity. *Movement Disorders*, 29(1):41–53, 2014.
- [11] P. Calabresi and V. Ghiglieri. "Lazy" nigrostriatal synapses in the heterozygous PINK1 mouse model of familial Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 29(1):11–14, jan 2014.
- [12] Peter Penzes, Michael E Cahill, Kelly A Jones, Jon-Eric VanLeeuwen, and Kevin M Woolfrey. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 14(3):285–293, 2011.
- [13] P. Damier, E.C. Hirsch, Y. Agid, and A.M. Graybiel. The substantia nigra of the human brain. *Brain*, 122(8):1437 LP – 1448, 1999.
- [14] M. Orth and A.H. Schapira. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 40(6):533–541, may 2002.
- [15] J.A. Obeso, M.C. Rodríguez-Oroz, B. Benitez-Temino, F.J. Blesa, J. Guridi, C. Marin, and M. Rodriguez. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23 Suppl 3:S548—S559, 2008.
- [16] M.R. Cookson. DJ-1, PINK1, and their effects on mitochondrial pathways. *Movement Disorders*, 25(SUPPL. 1):S44–S48, 2010.
- [17] A.W. Greene, K. Grenier, M.A. Aguilera, S. Muise, R. Farazifard, M.E. Haque, H.M. McBride, D.S. Park, and E.A. Fon. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO reports*, 13(4):378–385, 2012.
- [18] C. Klein and M.G. Schlossmacher. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: Multiple clues to a complex disorder. *Neurology*, 69(22):2093–2104, nov 2007.
- [19] M.E. Haque, K.J. Thomas, Ch. D'Souza, S. Callaghan, T. Kitada, R.S. Slack, P. Fraser, M.R. Cookson, A. Tandon, and D.S. Park. Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5):1716–21, 2008.
- [20] R.M. Sánchez-Mora, H. Arboleda, and G. Arboleda. PINK1 overexpression protects against C2-ceramide-induced CAD cell death through the PI3K/AKT pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47(3):582–594, 2012.
- [21] J.W. Pridgeon, J.A. Olzmann, L.S. Chin, and L. Li. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biology*, 5(7):1494–1503, 2007.

- [22] H.L. Wang, A. Chou, T. Yeh, A. Li, Y. Chen, Y. Kuo, S. Tsai, and S. Yu. PINK1 mutants associated with recessive Parkinson's disease are defective in inhibiting mitochondrial release of cytochrome *c*. *Neurobiology of Disease*, 28(2):216–226, 2007.
- [23] M.J. Contreras-Zárate, A. Niño, L. Rojas, H. Arboleda, and G. Arboleda. Silencing of PINK1 Inhibits Insulin-Like Growth Factor-1-Mediated Receptor Activation and Neuronal Survival. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(1):188–197, 2015.
- [24] N. Exner, B. Treske, D. Paquet, K. Holmstrom, C. Schiesling, S. Gispert, I. Carballo-Carbajal, D. Berg, H.H. Hoepken, T. Gasser, R. Kruger, K.F. Winklhofer, F. Vogel, A.S. Reichert, G. Auburger, P.J. Kahle, B. Schmid, and C. Haass. Loss-of-Function of Human PINK1 Results in Mitochondrial Pathology and Can Be Rescued by Parkin. *Journal of Neuroscience*, 27(45):12413–12418, 2007.
- [25] S. Gandhi, A. Wood-Kaczmar, Z. Yao, H. Plun-Favreau, E. Deas, K. Klupsch, J. Downward, D.S. Latchman, S.J. Tabrizi, N.W. Wood, M.R. Duchen, and A.Y. Abramov. PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death. *Molecular Cell*, 33(5):627–638, mar 2009.
- [26] D.P. Narendra, S.M. Jin, A. Tanaka, D.F. Suen, C.A. Gautier, J. Shen, M.R. Cookson, and R.J. Youle. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biology*, 8(1), 2010.
- [27] C. Vives-Bauza, C. Zhou, Y. Huang, M. Cui, R.L. A. de Vries, J. Kim, J. May, M.A. Tocilescu, W. Liu, H.S. Ko, J. Magrane, D.J. Moore, V. L. Dawson, R. Grailhe, T.M. Dawson, C. Li, K. Tieu, and S. Przedborski. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1):378–383, 2010.
- [28] C. Kondapalli, A. Kazlauskaitė, N. Zhang, H.I. Woodroof, D.G. Campbell, R. Gurlay, L. Burchell, H. Walden, T.J. Macartney, M. Deak, A. Knebel, D.R. Alessi, and M.M. Muqit. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biology*, 2(5):120080–120080, 2012.
- [29] D. Sha, L.S. Chin, and L. Li. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF- κ B signaling. *Human Molecular Genetics*, 19(2):352–363, 2009.
- [30] M.E. Gegg, J.M. Cooper, A.H. Schapira, and J.W. Taanman. Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. *PLoS ONE*, 4(3), 2009.
- [31] Y. Imai. Mitochondrial Regulation by PINK1-Parkin Signaling. *ISRN Cell Biology*, 2012:1–15, 2012.

- [32] A. Weihofen, K. Thomas, B. Ostaszewski, M.R. Cookson, and D.J. Selkoe. Pink1 forms a multiprotein complex with miro and milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry*, 48(9):2045–2052, 2009.
- [33] D. Matenia, C. Hempp, T. Timm, A. Eikhof, and E.M Mandelkow. Microtubule affinity regulating kinase 2 (MARK2) turns PTEN-induced kinase 1 (PINK1) on at T313, a mutation site in Parkinson’s disease: Effects on mitochondrial transport. *The Journal of biological chemistry*, 2(11):8174–8186, 2012.
- [34] A. Poole, R. Thomas, L. Andrews, A. McBride, H.and Whitworth, and L. Pallanck. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5):1638–43, 2008.
- [35] P. Tsai, M.M. Course, J.R. Lovas, C. Hsieh, M. Babic, K.E. Zinsmaier, and X. Wang. PINK1-mediated Phosphorylation of Miro Inhibits Synaptic Growth and Protects Dopaminergic Neurons in Drosophila. *Scientific Reports*, 4(1):6962, may 2014.
- [36] C.A. Gautier, T. Kitada, and J. Shen. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32):11364–11369, 2008.
- [37] Z.D. Zhou, F.Sh. Refai, Sh.P. Xie, Sh.H. Ng, C.H. Chan, P.G. Ho, X.D. Zhang, T.M. Lim, and E.K. Tan. Mutant PINK1 upregulates tyrosine hydroxylase and dopamine levels, leading to vulnerability of dopaminergic neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, 68:220–233, 2014.
- [38] Ruth Mélida Sánchez-Mora, Humberto Arboleda, and Gonzalo Arboleda. PINK1 overexpression protects against C2-ceramide-induced CAD cell death through the PI3K/AKT pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47(3):582–594, 2012.
- [39] Kim Tieu and Xu-Gang Gang Xia. Cytosolic PINK1 escapes from mitochondria to promote dendritic outgrowth. *Journal of Neurochemistry*, 128(6):787–789, 2014.
- [40] Eleni Koutsilieri and Peter Riederer. Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson’s disease and Alzheimer’s disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 13:329–331, 2007.
- [41] Edouard Pearlstein, François J Michel, Laurène Save, Diana C Ferrari, and Constance Hammond. Abnormal Development of Glutamatergic Synapses Afferent to Dopaminergic Neurons of the Pink1(-/-) Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10:168, 2016.
- [42] G. Martella, G. Madeo, M. Maltese, V. Vanni, F. Puglisi, E. Ferraro, T. Schirinzi, E.M. Valente, L. Bonanni, J. Shen, G. Mandolesi, N.B. Mercuri, P. Bonsi, and A. Pisani. Exposure to low-dose rotenone precipitates synaptic plasticity alterations in PINK1 heterozygous knockout mice. *Neurobiology of Disease*, 91:21–36, 2016.

- [43] C. Kashani, A. and Betancur, B. Giros, E. Hirsch, and S.E. Mestikawy. Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiology of Aging*, 28(4):568–578, apr 2007.
- [44] T.D. Helton, T. Otsuka, M. Lee, Y. Mu, and M.D. Ehlers. Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49):19492–7, 2008.
- [45] F. Blandini, R. Porter, and J. Greenberg. Glutamate and Parkinson’s disease. *Molecular Neurobiology*, 12(1):73–94, 1996.
- [46] M.E. Flores-Soto, V. Chaparro-Huerta, M. Escoto-Delgadillo, E. Vazquez-Valls, R.E. González-Castañeda, and C. Beas-Zarate. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología (English Edition)*, 27(5):301–310, 2012.
- [47] Giulia Ambrosi, Silvia Cerri, and Fabio Blandini. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Journal of Neural Transmission*, 121(8):849–859, 2014.
- [48] M. Feligioni, D. Mango, S. Piccinin, P. Imbriani, F. Iannuzzi, A. Caruso, F. De Angelis, F. Blandini, N. B. Mercuri, A. Pisani, and R. Nisticò. Subtle alterations of excitatory transmission are linked to presynaptic changes in the hippocampus of PINK1-deficient mice. *Synapse*, 2016.
- [49] J.C. Fiala, J. Spacek, and K.M. Harris. Cause or Consequence of Neurological Disorders? *Dendritic Spines Pathology*, 39:1–34, 2002.
- [50] T. Spires-Jones and Sh. Knafo. Spines, Plasticity, and Cognition in Alzheimer’s Model Mice. *Neural Plasticity*, 2012:1–10, 2012.
- [51] J. Herms and M. M. Dorostkar. Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11:221–50, 2016.
- [52] M. Day, Z. Wang, J. Ding, X. An, C. A. Ingham, A. F. Shering, D. Wokosin, E. Ilijic, Z. Sun, A. R. Sampson, E. Mugnaini, A. Y. Deutch, S. R. Sesack, G. W. Arbuthnott, and D. J. Surmeier. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nature Neuroscience*, 9(2):251–259, 2006.
- [53] W.A. Toy, G.M. Petzinger, B.J. Leyshon, G.K. Akopian, J.P. Walsh, M.V. Hoffman, M.G. Vucković, and M.W. Jakowec. Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson’s disease. *Neurobiology of Disease*, 63:201–209, 2014.
- [54] W. Yu, Y. Sun, S. Guo, and B. Lu. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Human Molecular Genetics*, 20(16):3227–3240, 2011.

- [55] H. Hering and M. Sheng. Dendritic Spines: Structure, Dynamics and Regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(12):880–888, 2001.
- [56] R. Yuste. *Dendritic spines*. The MIT Press, sep 2010.
- [57] J.I. Arellano. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1):131–143, 2007.
- [58] M. Papa, M.C. Bundman, V. Greenberger, and M. Segal. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 15(1 Pt 1):1–11, 1995.
- [59] K.M. Harris and J.K. Stevens. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 9(8):2982–2997, 1989.
- [60] A. Peters and I.R. Kaiserman-Abramof. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, 127(4):321–355, apr 1970.
- [61] S. Ebrahimi and S. Okabe. Structural dynamics of dendritic spines: Molecular composition, geometry and functional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(10):2391–2398, 2014.
- [62] B. Calabrese, M.S. Wilson, and Sh. Halpain. Development and Regulation of Dendritic Spines Synapses. *Physiology*, 21(1):38–47, 2006.
- [63] D.H. Bhatt, S. Zhang, and W. Gan. Dendritic Spine Dynamics. *Annual Review of Physiology*, 71(1):261–282, 2009.
- [64] M. Freire, P. García-López, and V. García-Marín. Dendritic spines and development: Towards a unifying model of spinogenesis a present day review of cajal’s histological slides and drawings. 2010:1–29, 2010.
- [65] Y. Lin and A.J. Koleske. Mechanisms of Synapse and Dendrite Maintenance and Their Disruption in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1):349–378, 2010.
- [66] J. Bourne and K.M. Harris. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3):381–386, 2007.
- [67] T. Tada and M. Sheng. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(1):95–101, 2006.

- [68] E.R. Kandel, J.H. Schwartz, and M.J. Thomas. *Principles of neural science*. McGraw Hill, 4th ed., New York., 2000.
- [69] D.F. Woods and P.J. Bryant. ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mechanisms of Development*, 44(2-3):85–89, dec 1993.
- [70] B.S. Meldrum. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition*, 130(4S Suppl):1007S–15S, 2000.
- [71] D. Repetto, P. Camera, R. Melani, N. Morello, I. Russo, E. Calcagno, R. Tomasoni, F. Bianchi, G. Berto, M. Giustetto, N. Berardi, T. Pizzorusso, M. Matteoli, P. Di Stefano, M. Missler, E. Turco, F. Di Cunto, and P. Defilippi. p140Cap Regulates Memory and Synaptic Plasticity through Src-Mediated and Citron-N-Mediated Actin Reorganization. *Journal of Neuroscience*, 34(4):1542–1553, 2014.
- [72] E.M. Valente, A.R. Bentivoglio, P.H. Dixon, A. Ferraris, T. Ialongo, M. Frontali, A. Albanese, and N.W. Wood. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *American journal of human genetics*, 68(4):895–900, 2001.
- [73] Wassilios G. Meissner, Mark Frasier, Thomas Gasser, Christopher G. Goetz, Andres Lozano, Paola Piccini, José A. Obeso, Olivier Rascol, Anthony Schapira, Valerie Voon, David M. Weiner, François Tison, and Erwan Bezard. Priorities in Parkinson’s disease research. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(5):377–393, 2011.
- [74] A.E. El-Husseini, E. Schnell, and D.M. Chetkovich. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, 290(5495):1364–8, 2000.
- [75] G. Beaudoin, S Lee, D. Singh, Y. Yuan, Y. Ng, L.F. Reichardt, and J. Arikath. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature Protocols*, 7(9):1741–1754, 2012.
- [76] K. Goslin, H. Asmussen, and G.A. Banker. Rat Hippocampal Neurons in Low-Density Cultures. In Goslin K Banker G, editor, *Culturing Nerve Cells*, chapter 13, pages 339–371. MIT press, Cambridge, 1998.
- [77] A. Rodriguez, D.B. Ehlenberger, D.L. Dickstein, P.R. Hof, and S.L. Wearne. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS ONE*, 3(4):doi:10.1371/journal.pone.0001997, 2008.
- [78] J. S. Snyder, J. S. Choe, M. A. Clifford, S. I. Jeurling, P. Hurley, A. Brown, J. F. Kamhi, and H. A. Cameron. Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *Journal of Neuroscience*, 29(46):14484–14495, 2009.

- [79] R.M. Villalba and Y. Smith. Differential striatal spine pathology in Parkinson's disease and cocaine addiction: A key role of dopamine? *Neuroscience*, 251:2–20, 2013.
- [80] Kwok-On Lai, Bryen A. Jordan, Xin-Ming Ma, Deepak P. Srivastava, and Kimberly F. Tolias. Molecular Mechanisms of Dendritic Spine Development and Plasticity. *Neural Plasticity*, 2016:1–3, 2016.
- [81] G. G. Turrigiano. Homeostatic plasticity in neuronal networks: The more things change, the more they stay the same. *22(5):221–227*, 1999.
- [82] C.T. Báez. Efecto de agonista de receptores X del hígado (LXR) sobre la dinámica sináptica en cultivos primarios de neuronas hipocámpales bajo exposición a β -amiloide. Master's thesis, Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- [83] Audrey Guilmatre, Guillaume Huguet, Richard Delorme, and Thomas Bourgeron. The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Developmental Neurobiology*, 74(2):113–122, 2014.
- [84] N. Chang, L. Li, R. Hu, Y. Shan, B. Liu, L. Li, H. Wang, H. Feng, D. Wang, C. Cheung, M. Liao, and Q. Wan. Differential regulation of NMDA receptor function by DJ-1 and PINK1. *Aging Cell*, 9(5):837–850, 2010.
- [85] Y. Shan. Regulation of PINK1 by Nr2B-containing NMDA receptors in ischemic neuronal injury. *Journal of Neurochemistry*, 111:1149–1160, 2009.
- [86] Linda Truebestein, Daniel J. Elsner, Elisabeth Fuchs, and Thomas A. Leonard. A molecular ruler regulates cytoskeletal remodelling by the Rho kinases. *Nature Communications*, 6:10029, 2015.
- [87] E. Meimaridou, S.B. Gooljar, and J.P. Chapple. From hatching to dispatching: The multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *42(1):1–9*, 2009.
- [88] N. R. Wilson. Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *Journal of Neuroscience*, 25(26):6221–34, 2005.
- [89] Silvio O. Rizzoli. Synaptic vesicle recycling: Steps and principles. *33(8):788–822*, 2014.
- [90] Melissa Vos, Elsa Lauwers, and Patrik Verstreken. Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. (SEP), 2010.
- [91] Ai Chen, Li-jing Jing Xiong, Yu Tong, and Meng Mao. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Molecular Medicine Reports*, 8(4):1011–1016, 2013.
- [92] Yves Kellner, Nina Gödecke, Tobias Dierkes, Nils Thieme, Marta Zagrebelsky, and Martin Korte. The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 6(MAR), 2014.

- [93] J.C. Triplett, Z. Zhang, R. Sultana, J. Cai, J.B. Klein, H. Büeler, and D.A. Butterfield. Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: Insights into mechanisms of familial Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 133(5):750–765, 2015.