

LOS ESFEROIDES COMO REACCIÓN ADAPTATIVA AL DAÑO EN TERMINALES DOPAMINÉRGICAS

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Universidad de La Laguna
Facultad de Ciencias de la Salud, sección de medicina

Autoras: Daniela Estephany Escaño Hernández
Claudia Hernández Oramas...

Tutor: Manuel C. Rodríguez Díaz
Cotutora: Ingrid Morales Pérez
Departamento de Ciencias Médicas básicas
Área Departamental de Fisiología

Índice de contenido

Resumen - Abstract	2
Palabras claves	3
Introducción y justificación del trabajo	4
Hipótesis del trabajo y objetivos	6
Material y métodos	7
Animales	
Procesamiento de tejido	
Inmunofluorescencia	
Análisis cuantitativo	
Estudio de rastreo	
Resultados	11
Respuesta adaptativa de los terminales dopaminérgicos	
Metabolismo de las proteínas dentro del esferoide libre	
El esferoide fenestrado y la involucreción astrocitaria	
Discusión	20
Conclusión	29
¿Qué he aprendido realizando el TFG?	30
Bibliografía	31

Índice de figuras y tablas

Figura 1: Inmunohistoquímica de las estructuras bulbares y esferoides.

Figura 2: Marcadores autofágicos en los esferoides libres.

Figura 3: Estructura y componentes del esferoide libre.

Figura 4: Inmunohistoquímica de los esferoides fenestrados.

Figura 5: Proteínas de las terminales dopaminérgicas transferidas a astrocitos.

Figura 6: Estructura y componentes del esferoide fenestrado.

Tabla 1: Resumen de los marcadores empleados en el estudio.

Resumen

El estudio de las estructuras esféricas que aparecen en el estriado durante la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales puede facilitar la comprensión de la patogenia de la enfermedad de Párkinson (EP). En este trabajo se estudiaron las principales características de estas estructuras (esferoides dopaminérgicos) en modelos animales de la EP. El estudio se realizó en ratas adultas a las que se les inyectó 6-hidroxi dopamina (6-OHDA; 25 µg/10µl) en el ventrículo lateral, produciéndose así una denervación dopaminérgica selectiva del estriado que evita el daño tisular inespecífico. Los estudios con técnicas inmunohistoquímicas permitieron identificar la producción de esferoides dopaminérgicos que acumulan los productos de desecho de las neuronas dopaminérgicas (TH, DAT, APP), y que presentan indicadores de la activación de la autofagia (LC3, PS). Los esferoides fueron penetrados por prolongaciones astrocitarias (esferoides fenestrados), presentando así inmunoreactividad para proteínas astrocíticas (GFAP y S100β), así como para marcadores de actividad lisosomal (Stx17, Lamp1 y Lamp2). Estos datos indican que los productos de la degeneración en las neuronas dopaminérgicas en la EP son almacenados en esferoides, desde donde son transportados a los astrocitos para su degradación (transautofagia).

Abstract

Spheroidal structures showed in striatum after dopaminergic nigrostriatal cells degeneration could be relevant to understanding the Parkinson Disease (PD) pathogenesis. In this study, the main characteristics of dopaminergic spheroids were studied in animal models of PD. Adult rats were injected with 25µg/10µl of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the lateral ventricle in order to produce dopaminergic denervation of the striated nucleus, thus preventing damage to surrounding tissues. Through immunohistochemistry, debris from dopaminergic neurons (TH, DAT, APP) were detected in free-spheroids, as well as autophagic (LC3, PS). These were transformed into fenestrated-spheroids when penetrated by the astrocytic processes; therefore, in addition to showing positivity for the markers of free spheroids, they showed astrocytic proteins (GFAP and S100β) and lysosomal activity (Stx17, Lamp1 and 2) markers. These data indicates that products of dopaminergic neuron degeneration in PD are stored in

spheroids, from where they are transported to astrocytes for degradation (transautophagy).

Palabras claves

Párkinson

Degeneración dopaminérgica

Esferoides

Astroцитos

Transautofagia

Parkinson

Dopaminergic degeneration

Spheroids

Astrocytes

Transautophagy

Introducción y justificación del trabajo

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo de alta prevalencia en la población mundial. La aparición de los signos motores característicos de la EP está asociada a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SN) que proyectan al estriado y, secundariamente, a la reducción de la dopamina estriatal. En las neuronas dopaminérgicas que aún no han degenerado, se produce una agregación proteica que forma las inclusiones intracitosólicas características de la EP (cuerpos de Lewy). La proteína más abundante en los cuerpos de Lewy es la α -sinucleína ([Spillantini M.G. et al. 1997](#))¹, proteína cuyas principales funciones se realizan en la sinapsis ([Iwai A. et al. 1995](#)², [Maroteaux L. et al. 1998](#)³) y que es habitualmente utilizada como marcador de daño sináptico ([Koichi W. et al 2007](#))⁴.

Inicialmente se pensó que el daño de las neuronas dopaminérgicas se iniciaba en su soma y axón de forma simultánea. Sin embargo, la evidencia publicada en los últimos años sugiere que el proceso degenerativo comienza en las terminales dopaminérgicas y se extiende luego por el axón hasta alcanzar el soma de estas neuronas. La idea inicial de la degeneración retrograda partió de los estudios del Dr. Oleh Hornykiewicz quien, a partir del estudio de la localización subcelular del transportador de la dopamina durante la degeneración dopaminérgica, sugiere que la degeneración neuronal en la EP progresa desde las terminales al soma de estas neuronas ([Hornykiewicz, O. 1998](#))⁵. Esta posibilidad se ha ido reforzando con la publicación de estudios que utilizan otras evidencias como la distribución de α -Sinucleína y de Tirosina Hidroxilasa ([Orino S. et al. 2008](#)⁶, [Tofaris G.K et al. 2006](#)⁷, [Volpicelly-Dalley L.A. et al. 2011](#)⁸), así como con estudios de modelos de EP en ratones ([Li Y. et al 2009](#))⁹ y en primates ([Meissner W. et al. 2003](#)¹⁰, [Herkenman M. et al. 1991](#)¹¹). También los estudios neuropatológicos en cerebros humanos apoyan la progresión retrograda de la degeneración dopaminérgica en la EP ([Iseki E. et al. 2001](#))¹². De hecho, no es un proceso exclusivo de enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha descrito en patologías como la diabetes o la neurocisticercosis ([Raff M. C. et al. 2002](#))¹³.

Acompañando a este daño axonal, se han descrito estructuras esféricas periaxiales en aquellas enfermedades que cursan con procesos inflamatorios neuronales ([Cheng H.C. et al 2011](#)¹⁴, [Nishiyama J. 2017](#))¹⁵. Los esféricos no deben ser confundidos con vacuolas

autofágicas intraneuronales, las cuales han sido objetivadas en enfermedades neurodegenerativas congénitas ([Petersen A. et al. 2001¹⁶](#); [Ravikumar B., Duden R. & Rubinsztein D.C. 2002¹⁷](#)) o adquiridas ([Finn J.T. et al. 2000¹⁸](#)). Así pues, los esferoides son estructuras vacuolares de doble membrana que albergan en su interior vacuolas más pequeñas, cuya naturaleza y función no ha sido descrita ([Beirowski B. 2010¹⁹](#)). Los esferoides podrían tener un papel importante en el proceso neurodegenerativo de las neuronas dopaminérgicas, y su estudio podría facilitar el desarrollo de tratamientos etiopatogénicos que permitan controlar el inicio y progresión de la enfermedad. Uno de los mecanismos implicados en la degradación de los desechos de las neuronas dopaminérgicas es la autofagia, un proceso no selectivo mediante el cual se engloba una porción citoplasmática dentro de los denominados autofagosomas, los cuales luego se fusionan con lisosomas formando los autofagolisosomas, dentro de los cuales ya se produce la degradación de proteínas y componentes celulares como las mitocondrias ([Mizushima N. 2004²⁰](#)). Pero, ¿cómo participan los esferoides en este proceso? ¿intervienen directamente en este mecanismo autofágico? ¿son meros contenedores (o más bien transportadores) de vacuolas autofágicas?

En este estudio nos centraremos en el papel de los esferoides y su relación con los procesos de autofagia de los desechos dopaminérgicos.

Hipótesis del trabajo y objetivos

Nuestro estudio se basa en la premisa de que los esferoides se producen como resultado de una reacción adaptativa al daño en las terminales neuronales dopaminérgicas y que, de algún modo, participan en el proceso de degradación de las sustancias de desecho originadas por la destrucción neuronal característica de la EP. Consecuentemente, los objetivos de este trabajo son:

1. Describir la naturaleza y el origen de los esferoides con técnicas inmunohistoquímicas para el transportador de dopamina (DAT) y para la enzima limitante de la síntesis de dopamina, la tirosina hidroxilasa (TH).
2. Comprobar la presencia en los esferoides de proteínas asociadas a la actividad sináptica como la proteína precursora de amiloide (APP) y la α -Sinucleína (Syn).
3. Evaluar si en los esferoides existe función autofágica estudiando proteínas relacionadas con autofagosomas (LC3), lisosomas (Lamp1 y Lamp2) y autofagolisosomas maduros (Stx17).

Material y métodos

Animales

Los experimentos se realizaron con 40 ratas machos de la variedad Sprague Dawley de 250 gramos de peso. En cuanto a las condiciones del entorno de mantenimiento, las ratas fueron colocadas a razón de 2 por jaula con periodos de 12 horas de luz-oscuridad a 22°C. Además se les otorgó acceso libre a agua y comida. Estos experimentos se realizaron de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas del 24 de noviembre de 1986 (86/609 / CEE) con respecto al cuidado y uso de animales para procedimientos experimentales. Asimismo, se tomaron las medidas convenientes para minimizar el dolor y las molestias. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de La Laguna.

Las ratas fueron tratadas intraperitonealmente con nortriptilina con el fin de inhibir el transportador de membrana de la noradrenalina y evitar que la acción de la 6OHDA pudiera afectar a las neuronas noradrenérgicas. Transcurridos 30 minutos, se anestesiaron con ketamina a dosis de 30 mg/kg y xilacina a 2 mg/kg administrados también mediante inyección intraperitoneal. Y finalmente, cuando el animal se encontraba profundamente anestesiado (profundidad anestésica valorada por la ausencia del reflejo del dolor en la cola o en las patas) se inyectó en el ventrículo lateral 25 µg/10µl de 6-OHDA en solución salina al 0.9% de NaCl con ácido ascórbico (2mg/10ml) a una velocidad de 1 µl/min.

Procesamiento del tejido

Las ratas fueron sacrificadas 5 días después de inyectarse la 6-OHDA. Para ello, primero fueron anestesiadas con hidrato cloral (400 mg/kg) y se evaluó su efecto a través de la valoración del reflejo corneal, pedal y la ausencia del movimiento de la cola cuando es apretada. Posteriormente, se realizó perfusión intracardiaca de 200 ml de suero salino al 0,9% con heparina, seguido de 400 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M. A continuación, se procedió a la extracción del cerebro. Los cerebros fueron almacenados a 4°C en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, y luego se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% durante al menos 3 días.

Para terminar, los cerebros fueron extraídos de la solución de sacarosa, envueltos en papel de aluminio y congelados a -80°C.

Los cerebros fueron cortados en secciones de 30 µm de grosor en el plano axial mediante un microtomo deslizante. Dichos cortes fueron guardados de forma seriada en 7 eppendorfs de 1,5 ml en sacarosa al 30% a -80°C para finalmente ser procesados para la inmunohistoquímica.

Inmunofluorescencia

Para el marcaje inmunofluorescente, las secciones fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de PBS1x con un 4% de suero normal, bien de cabra (NGS) o bien de burro (NGS) en función del animal en el que estuviera hecho el anticuerpo secundario, para bloquear posibles sitios de unión inespecífica; acompañado de Triton al 0.05%, un detergente que facilita la penetración del anticuerpo al interior celular.

A continuación, se dejan durante la noche en una solución igual a la anterior, a la que se añaden los anticuerpos primarios que van a ser utilizados: TH, DAT, Syn, APP, LC3, Stx17, Lamp1, Lamp2 y GFAP. Además, una parte de las muestras se reservó para ser procesada como control; a dichos tejidos no se les añadieron los anticuerpos primarios.

La elección de estos anticuerpos primarios se basó, por un lado, en la revisión bibliográfica existente (por medio de fichas técnicas y buscadores específicos -facilitados por empresas como Merck Millipore + Sigma-Aldrich o Genelix Inc-) y, por otro lado, en experimentos de laboratorio en los que se ajustó el protocolo y la concentración requerida. En dichos experimentos, estos anticuerpos se probaron útiles tras usarlos en muestras de tejido o células que expresan el epítipo de interés (además, la selectividad para sus dianas biomoleculares fue confirmada por el sistema Western Blot y por controles de absorción). Más tarde, en las mismas muestras de tejido, se buscaron otros componentes subcelulares que también presentarían el epítipo de interés.

Seguidamente, fueron incubadas durante 2 horas en una solución con anticuerpos secundarios unidos a biotina o a fluoróforos (para verde, rojo, infrarrojo o ultravioleta).

A continuación, se añade una solución de estreptavidina unida a fluoróforo durante 2 horas para unirse a aquellos anticuerpos secundarios con biotina. Finalmente, se tiñen los núcleos con 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), un marcador fluorescente U.V. que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, durante 3 o 4 minutos.

En oscuridad, se estiran y montan los cortes sobre portaobjetos gelatinizados (para evitar que el corte se pueda desprender una vez pegado), donde se dejan secar durante unos minutos. Para ello se colocan los cortes en una placa de Petri con PBS 1x que cubre toda la placa y se sumerge de forma inclinada el portaobjetos gelatinizado, que ha sido previamente rotulado con: datos de identificación de la rata, los anticuerpos primarios y secundarios empleados así como la fecha. Con ayuda de un pincel se estiran los cortes en la placa y se trasladan al portaobjetos.

Una vez se encuentren secos los cortes, son añadidas unas gotas de medio de montaje sobre ellos (generalmente glicerol: PBS 1x al 50%); luego, para evitar la pérdida del medio, se emplea un cubreobjetos y se sella por medio de esmalte de uñas transparente.

Finalmente, estas muestras son examinadas con microscopio confocal (Olympus Fluoview FV1000), con el que se obtienen las imágenes que posteriormente serán analizadas utilizando un programa de libre acceso para el procesamiento de imágenes: Image J (IJ1.46r).

Análisis cuantitativo

El diámetro de los esferoides, originados como resultado de la denervación dopaminérgica, fue medido en el lado ipsilateral a la inyección de 6-OHDA. Por su parte, la inmunorreactividad de las proteínas se valoró a través del análisis densitométrico de los mismos. Todas las secciones del tejido fueron tratadas bajo el mismo protocolo y se emplearon los mismos reactivos químicos para evitar sesgos por este motivo.

El análisis se realizó con el software FV10-ASW e ImageJ. A través de Leica Application Suite Advanced Fluorescence, the Colocalization, RG2B colocalization, Colocalization_Finder y JACoP del programa ImageJ se realizaron las mediciones de las

colocalizaciones subcelulares. Las mismas se cuantificaron con el coeficiente de correlación de Pearson, citofluorograma, coeficientes de superposición de Manders M1 y M2 (fracciones de marcador 1 o 2 superpuestos al otro), la tasa de colocalización (grado de colocalización en porcentajes) y el coeficiente de superposición (valorando del 0 al 1, siendo 1 la máxima colocalización).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el test de Scheffe para comparaciones muestrales (programa estadístico Statsoft Tulsa, EE.UU.; $p < 0.001$ fue considerado significativo).

Resultados

Respuesta adaptativa de los terminales dopaminérgicos

La inyección de 6-OHDA en el ventrículo lateral produjo la degeneración dopaminérgica tanto de los axones como de los terminales sinápticos (Fig. 1, panel A1). Además, no se constató la presencia significativa de microgliosis reactiva al daño local producido por la inyección del tóxico, que sí se había observado al administrarlo directamente en el estriado ([Morales I. et al 2015](#))²¹. Esto puede considerarse un dato de interés, ya que sugiere que el cambio en el lugar de administración del 6-OHDA simula de forma más precisa a la EP.

Como resultado de dicha degeneración se crearon productos de desecho, que se manifestaron en forma de estructuras bulbares en el extremo de los axones degenerados; y estructuras esféricas, libres de la conexión astrocitaria, que en adelante denominaremos “esferoides libres” (Fig. 1, paneles A2 y A3). Estos últimos presentaron un diámetro de 4 micrómetros, con un rango variable de entre 1 a 9 micrómetros (Fig. 1, paneles A4 y A5).

Los esferoides libres mostraron proteínas que normalmente se encuentran dentro de las neuronas dopaminérgicas, tales como tirosina hidroxilasa (TH) y transportador activo de dopamina (DAT) (Fig. 1, paneles B1 y B2). Por otro lado, la proteína precursora de amiloide (APP) se encontró en las estructuras bulbares, en los esferoides libres y en algunos axones dañados.

En el análisis inmunohistoquímico se observó inmunorreactividad para TH y App dentro de los esferoides libres, siendo la distribución de ambas proteínas mucho mayor dentro del esferoide que en espacio extracelular (Fig. 1, paneles C1 y C2). Otras proteínas como α -Sinucleína no se encontraron dentro de ambas estructuras, pero sí en el espacio extracelular (Fig. 1, paneles D1-D3) si bien no se hallaron diferencias significativas dentro o fuera del esferoide. En sintonía con esta observación, tampoco se encontró correlación entre α -Sinucleína y TH (Fig. 1, panel D4).

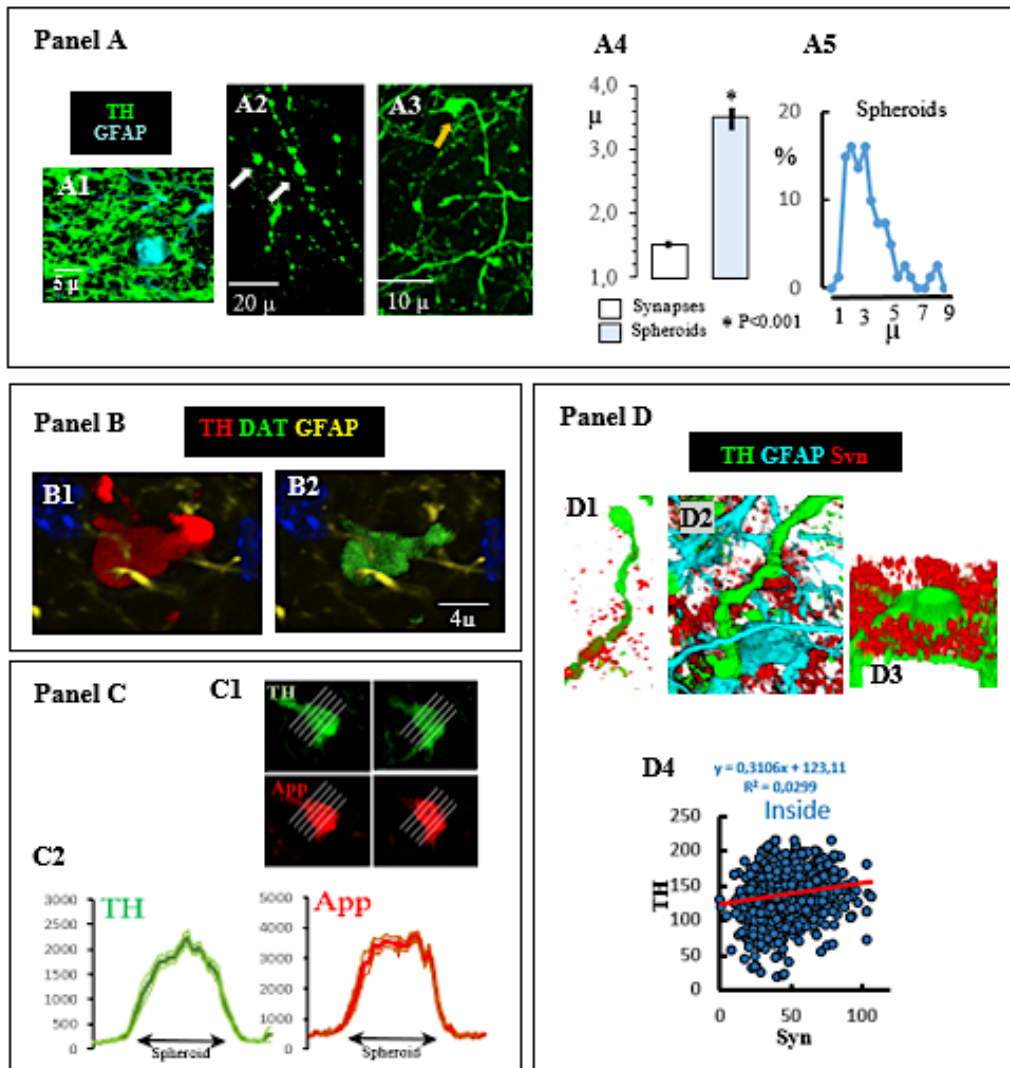


Fig. 1: Inmunohistoquimia de las estructuras bulbosas y esferoides. A1: muestra terminales dopaminérgicas cerca de un astrocito. A2-A3: la flecha blanca señala un esferoide libre, mientras que la amarilla muestra estructuras bulbosas. A4: se compara el diámetro de los esferoides en comparación con las sinapsis dopaminérgicas. A5: se muestra la distribución de diámetros de los esferoides. B1-B2: se observa la acumulación de TH (rojo) y DAT (verde); mientras que GFAP, marcador astrocitario (amarillo) no se ve en el interior de los esferoides libres. C1-C2: se muestra la distribución de TH y APP (C2) de un esferoide que mostró APP (como vemos en la inmunohistoquimia de C1). Las distribuciones representan la media \pm error estándar de los valores de inmunoreactividad a través de las líneas que se muestran en las imágenes del lado izquierdo. D1-D3: muestra tres ejemplos de acumulación extracelular de Syn (rojo) en el espacio extracelular. D4: se muestra ausencia de colocalización TH-Syn.

Metabolismo de las proteínas dentro del esferoide libre

La detección inmunohistoquímica de agregados de LC3 es usado para determinar la actividad autofágica. Esta proteína se subdivide en dos tipos: LC3-I, que se localiza normalmente en el citosol (en baja concentración y poco inmunorreactivo), y LC3-II, que se acumula en las membranas de los autofagosomas. Dado que no existen anticuerpos selectivos para LC3-II, sino anticuerpos inespecíficos para ambos LC3, para constatar la presencia del mismo se debe observar inmunorreactividad en forma de pequeños agregados, para así poder asociar dicho hallazgo con la generación de autofagosomas.

A través del confocal se encontraron agregados de LC3 dentro de los esferoides, siendo un 200% mayor que en el espacio extracelular, lo que sugiere que los esferoides TH positivos generan autofagosomas.

Otra proteína relacionada con los autofagosomas es Syntaxin-17 (Stx17) que suele encontrarse en los autofagosomas maduros, siendo necesario para su transporte al soma celular y para la fusión de los mismos a lisosomas. No se encontraron hallazgos de esta proteína en los esferoides libres. En la Fig. 2 (paneles A1-A4) se observa como los esferoides TH positivo no muestran agregación Stx17, cuya inmunorreactividad no aumenta ni a través ni dentro de los esferoides. Tampoco se encontró colocalización con TH.

En cuanto a los marcadores empleados para detectar los lisosomas, se emplearon Lamp1 y Lamp2. En la Fig. 2 (paneles B1-B3) se observan dos cortes estriatales consecutivos en los que se puede observar LC3 y Lamp2 en el citosol cerca del área nuclear. El esferoide (positivo para TH) presentó LC3, pero ausencia de inmunorreactividad para Lamp2; por lo tanto, no se objetivó la colocalización de LC3 con Lamp2. Estos hallazgos sugieren que la formación de autofagosomas no derivó en la producción de autofagolisosomas en los esferoides libres.

Finalmente, la fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido que puede emplearse como señalizador de fagocitosis puesto que, en situaciones de estrés, pasa de su localización habitual en la porción interna de la membrana celular, a la porción externa (en otras palabras, es una señal para ser fagocitado: “cómeme”). Dicho fosfolípido se encontró en

el interior de los esferoides (Fig. 2, paneles C1 y C2), aunque no en su membrana externa. Además, se demostró la colocalización con TH en el interior del esferoide libre, especialmente donde había mayor inmunoreactividad de TH. Del mismo modo, se observó ubicación conjunta de PS y LC3 (Fig. 2, panel C3).

En conjunto (Fig. 3) estos resultados apuntan a que los esferoides libres, al acumular LC3, son autofagosomas. No obstante, no se produce la maduración del mismo dado que no existen datos que sugieran que se produzca la fusión con un lisosoma (no expresa ni Stx17, ni Lamp1, ni Lamp2), para de este modo, finalizar la degradación del contenido. Entonces, esto plantea una nueva cuestión: cómo se metabolizan y eliminan los desechos dopaminérgicos en los esferoides.

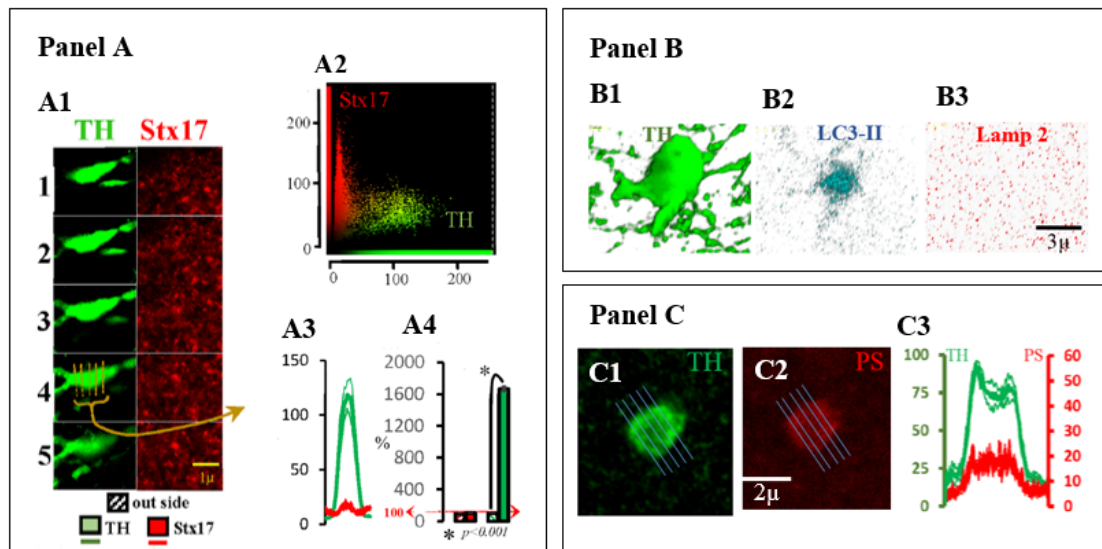


Fig. 2: Marcadores autofágicos en los esferoides libres. A1: se observan 5 cortes consecutivos de esferoides TH+ sin agregación Stx17. A2: no se muestra colocalización LC3-TH en el estriado denervado. A3: muestra la distribución de Stx17 y TH a través del segmento 4 en la figura A1. A4: muestra la inmunoreactividad Stx17 y TH calculada en los esferoides (n=200 en comparación con el espacio extracelular). B1-B3: representan dos cortes consecutivos de un esferoide libre TH positivo en el que se observa LC3, pero ausencia de inmunoreactividad de Lamp2 (B3). C1-C2: muestra la presencia de PS en aquellos esferoides TH positivos. C3: se muestra la distribución de TH (verde) y de PS (rojo) en el mismo esferoide, yendo desde el borde externo del mismo, con ausencia de inmunofluorescencia, hasta un máximo dentro del esferoide, que vuelve a hacerse cero al salir de él.

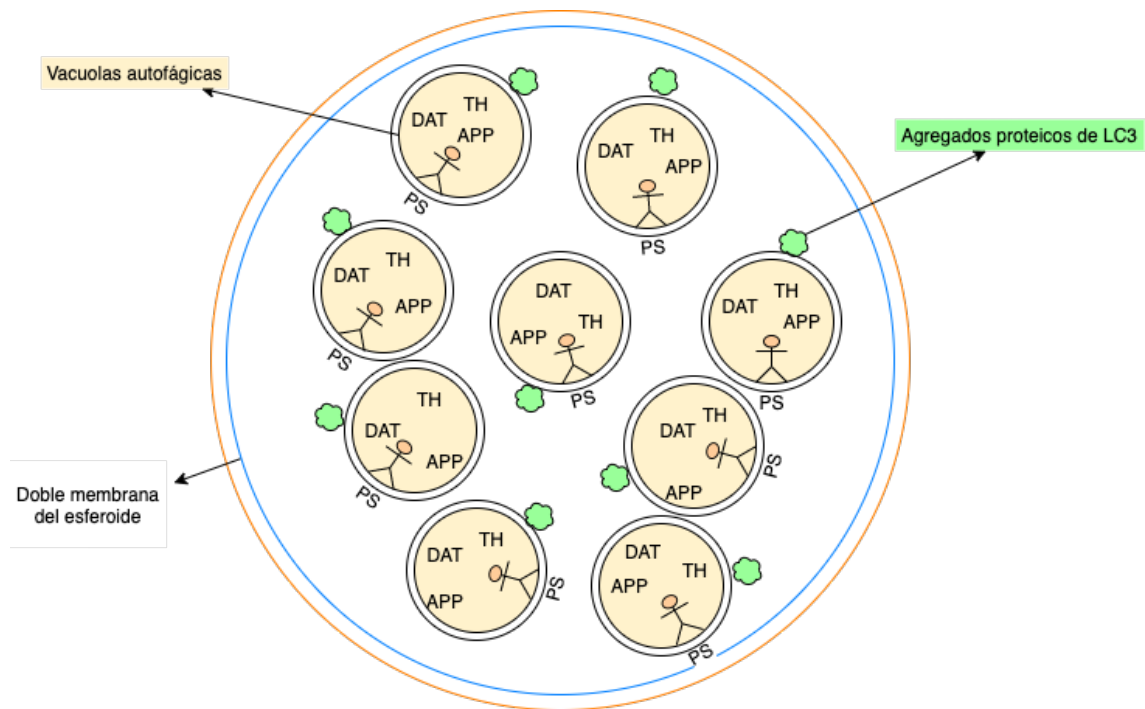


Fig. 3: Estructura y componentes del esferoide libre. Esquema de la estructura de un esferoide libre en cuyo interior muestra vacuolas autofágicas (autofagoforos) inmunopositivas para LC3, que contienen agregados de marcadores dopaminérgicos TH y DAT, así como agregados proteicos procedentes de la actividad sináptica (APP), además de PS, el señalizador “cómeme”.

Formación de esferoides fenestrados

Tras la administración del tóxico, se observó como la distancia entre los esferoides libres y los astrocitos parecía reducirse hasta que, aparentemente, se fusionaron (Fig. 4, paneles A1-A8). Por ese motivo, se realizó un estudio inmunohistoquímico en el que se objetivó la presencia de GFAP y S100 β (proteínas astrocitarias) dentro de los esferoides libres (dato que no presentaban con anterioridad), lo que podría confirmar la penetración de las prolongaciones astrocíticas en los esferoides. Así pues, desde el momento en el que se produce este fenómeno, ya que hay un aparente cambio en los esferoides, nos referiremos a estos como “esferoides fenestrados” (Fig. 4, panel B).

Además de GFAP y S100 β , una vez que los esferoides libres pasan a ser fenestrados, comienzan a presentar marcada inmunorreactividad para Lamp1, así como colocación entre Lamp1 y LC3. Cabe mencionar que PS (que como vimos en el apartado anterior, se encontraba en los esferoides libres) también fue detectada. Esto confirma la presencia de

actividad fagocítica, y más concretamente, la maduración de autofagosomas a autofagolisosomas (Fig. 5, paneles A1-A4).

Tanto las prolongaciones (Fig. 5, paneles B1-B2) como el soma (Fig. 5, paneles B3-B4) astrocíticos envueltos en el proceso de fenestración, presentaron inmunorreactividad para la TH, sugiriendo por ello que el contenido de los esferoides fenestrados se transfiere a los astrocitos. Por otro lado, la proteína APP fue detectada en los esferoides libres y en los fenestrados, mas no en astrocitos (Fig. 5, panel D); mientras que Syn se encontró en astrocitos, pero no en esferoides, en ninguna de sus formas (Fig. 5, paneles C1-C6). Ergo no todas las proteínas parecen metabolizarse por la misma vía.

En conclusión, la colocalización Lamp1 y LC3 que presentan los esferoides fenestrados, sugiere que el proceso de autofagia se inicia en los esferoides libres y se continúa con la llegada de las prolongaciones astrocitarias. Por otra parte, la ausencia de APP en los astrocitos y la presencia de Syn en ellos, indica que podrían existir distintas rutas de metabolización para estas proteínas. Los resultados sugieren que App es metabolizada en los esferoides fenestrados directamente mientras que, la α -Sinucleína se transfiere directamente a los astrocitos, donde sería metabolizada.

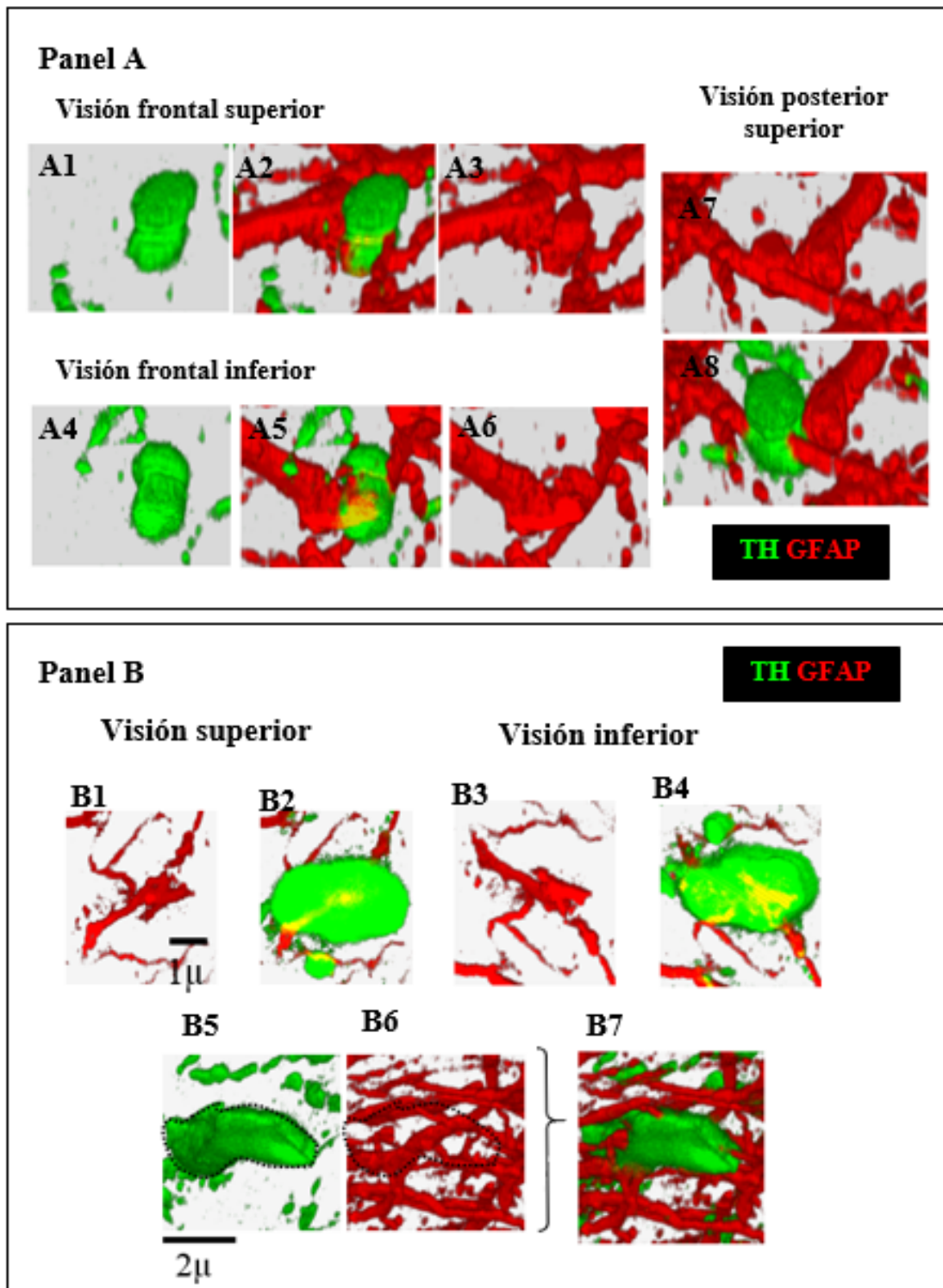


Fig. 4: Inmunohistoquimia de los esferoides fenestrados. En las imágenes de A1-A8, se muestra la relación espacial entre un esferoide dopaminérgico típico y las prolongaciones astrocitarias circundantes desde diferentes perspectivas. Los paneles B1-B4 ponen de manifiesto una prolongación astrocítica que se ramifica en dos dentro de un esferoide. En las imágenes B5-B7 (esferoides delimitados con una línea de puntos), vemos un ejemplo de esferoide penetrado por numerosas prolongaciones astrocitarias procedentes de diferentes astrocitos.

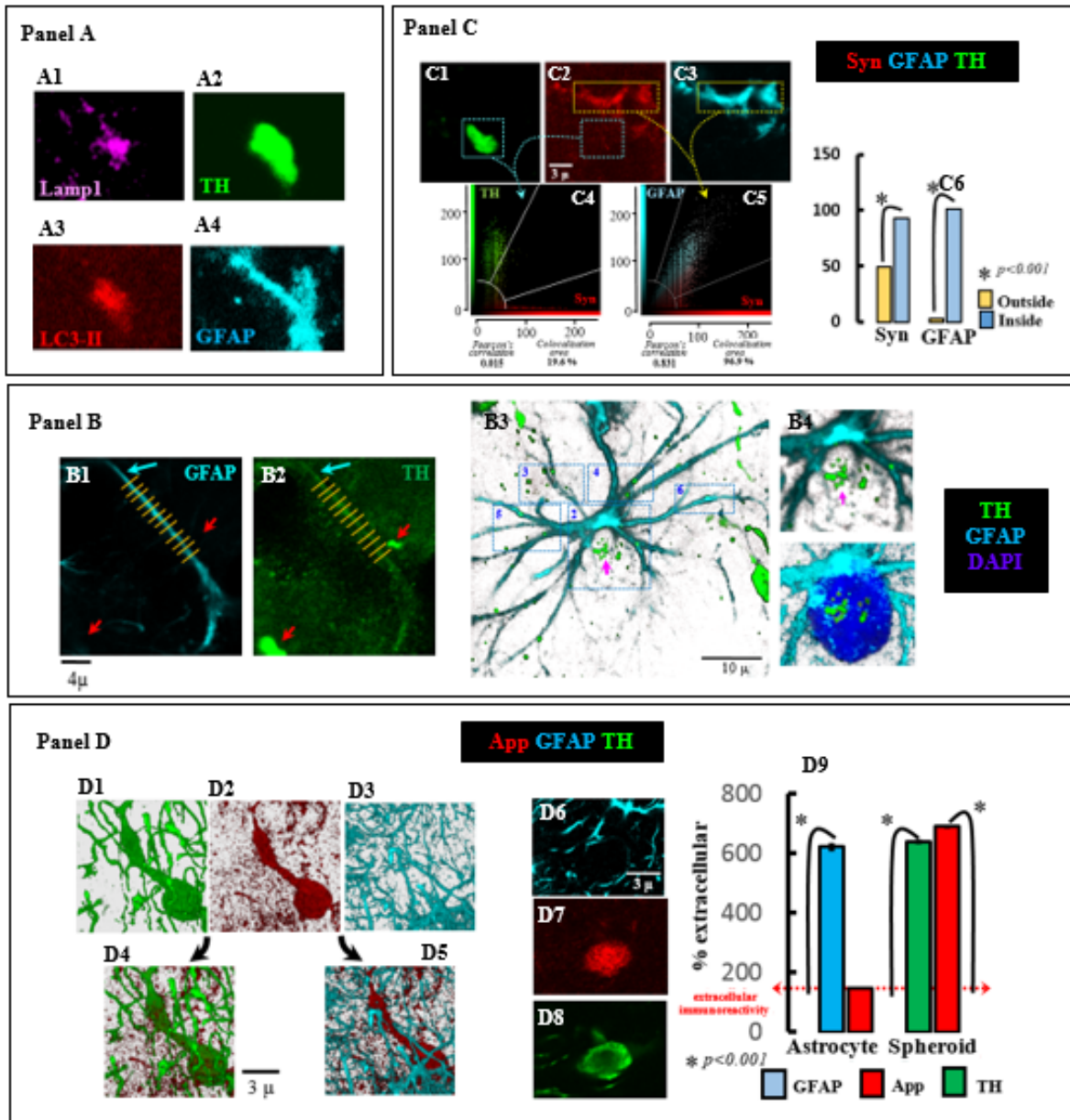


Fig 5: Proteínas de las terminales dopaminérgicas transferidas a astrocitos. A1-A4: se observa alta inmunorreactividad para Lamp1, TH, LC3 y GFAP respectivamente en los esferoides fenestrados. B1: muestra un proceso astrocítico (señalado con una flecha azul) dada la inmunorreactividad positiva para GFAP, en el que además en B2 se objetiva inmunorreactividad positiva para TH. Las flechas rojas en ambas imágenes ponen de manifiesto esferoides libres sin inmunorreactividad para GFAP. B3-B4: se observa un astrocito con inmunorreactividad para TH tanto en los procesos astrocíticos (B3) como en el soma (B4). C: se detectó Syn en los procesos astrocíticos, demostrando la colocalización Syn-GFAP (C2, C3 y C5) que en cambio, no fue observado en los esferoides libres (C1 y C4). C6: el soma astrocitario mostró alta inmunorreactividad tanto para GFAP como para Syn. D1-D5: la acumulación de APP (D2) en un esferoide con inmunorreactividad para TH (D1), sin embargo, no se constata acumulación de APP en los procesos astrocíticos GFAP positivos (D3). D6-D8: muestra otro ejemplo de acumulación de APP en los esferoides, pero no en los procesos astrocíticos. D9: tras realizar la comparación entre la concentración de APP tanto en los esferoides como en los astrocitos, se aprecia como la correlación es despreciable en estos últimos.

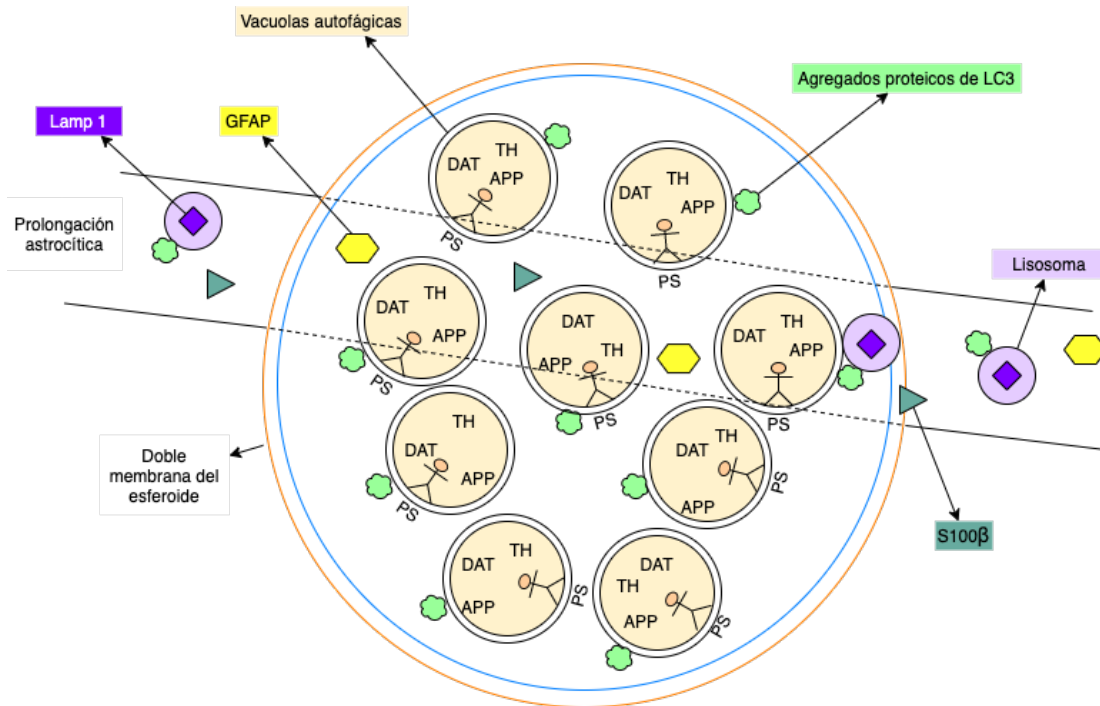


Fig. 6: Estructura y componentes del esferoide fenestrado. Dado que comparten estructura los esferoides libres y los fenestrados, se observan las mismas características mencionadas en la Fig. 3. Además de ello, presentan marcadores positivos para actividad lisosomal (Lamp1) y para proteínas astrocitarias (S100b y GFAP).

En la tabla 1 se muestra un resumen de los marcadores empleados en el estudio y qué función detectan. Además, se muestra su positividad (“+”) o, por el contrario su negatividad (“-”), para los esferoides libres, los esferoides fenestrados y los astrocitos.

Proteínas	Esferoide libre	Esferoide fenestrado	Astrocito	Marcador
TH	+	+	+	Neuronas DAérgicas
DAT	+	+		Neuronas DAérgicas
GFAP	-	+	+	Astrocitos
S100β	-	+	+	Astrocitos
APP	+	+	-	Neuronas DAérgicas
Syn	-	-	+	Neuronas DAérgicas (proteínas sinápticas)
LC3	+	+	+	Actividad autofágica
Lamp1	-	+	+	Actividad lisosómica
Lamp2	-	-		Actividad lisosómica
PS	+	+		Señal “cómeme”
Stx-17	-	+		Autofagolisosomas

Tabla 1: Resumen de los marcadores empleados en el estudio. TH: tirosina hidroxilasa; DAT: transportador dopaminérgico; GFAP: proteína gliofibrilar ácida; APP: proteína precursora de amiloide; Syn: α -Sinucleína; LC3: proteína asociada a los microtúbulos 1A/1B de cadena ligera 3; Lamp1: proteína de membrana asociada a lisosoma 1; Lamp2: proteína de membrana asociada a lisosoma 2; PS: fosfatidilserina; Stx17: Syntaxin-17.

Discusión

Este estudio busca explicar el papel de las estructuras esferoidales (esferoides) en la patogenia de la EP. Tras la administración de 6-OHDA, se observó que los productos de desecho dopaminérgicos se agruparon en esferoides “libres”, ya que inicialmente se encontraron libres de la conexión astrocitaria. Dichas estructuras se comportaron como fagocitos dado que, por un lado, almacenaron los productos de desecho y por otro, presentaron datos de autofagia (aunque incompleta porque no se hallaron lisosomas vinculados ni inmunorreactividad para Stx17) y se prepararon para ser fagocitados, puesto que se objetivaron agregados de PS. Posteriormente, estos esferoides libres fueron penetrados por prolongaciones astrocitarias, pasando entonces a denominarse esferoides “fenestrados”. Es en este momento en el que se culmina la fagocitosis por acción de los lisosomas aportados por los astrocitos. Por lo tanto, el proceso de degeneración neuronal está mediado por autofagia parcial en las neuronas dopaminérgicas junto a fagocitosis astrocítica; o dicho de otro modo, por transautofagia.

Existen dos tipos de modelos experimentales que replican de una forma u otra la patogenia de la EP: los neurotóxicos y los genéticos; el 6-OHDA pertenece a los primeros. Esta sustancia comparte con la dopamina su estructura (aunque con un grupo OH de más que lo vuelve tóxico), lo cual permite que su toxicidad sea selectiva para las neuronas dopaminérgicas. El daño es inducido por su capacidad para producir estrés oxidativo, una característica que comparten todos los modelos neurotóxicos ([Blesa J. et al 2012](#))²². Dado que producen una lesión selectiva para las neuronas dopaminérgicas, tiene valor para estudiar la patogenia de la EP. No obstante, no parecen afectar a otras regiones del cerebro (como las estructuras olfativas, áreas del tallo cerebral inferior o locus coeruleus), tampoco son capaces de generar cuerpos de Lewy o la depleción dopaminérgica, todos característicos de la EP. Luego es un modelo limitado que resulta de utilidad para estudiar el inicio de la historia natural de la enfermedad ([Blesa J. et al 2012](#))²².

Cabe mencionar que este compuesto no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que es imprescindible su inyección directa en el sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP); además, esta inyección generará una lesión en función de la cantidad de tóxico empleado y de la localización de la inyección ([Blesa J. et al 2012](#))²². Teniendo esto en

cuenta, en este estudio se ha realizado la inyección unilateral del 6-OHDA en el ventrículo lateral, de modo que se redujo la activación local de la glía causada por la administración directa del tóxico en el estriado ([Morales I. et al. 2015](#))²¹; lo cual permite que el modelo sea más fiel a la EP.

La degeneración axonal y dendrítica propia de la EP se acompaña de un proceso autodestructivo; concretamente, un mecanismo de muerte celular no apoptótico ([Yang J. et al. 2007](#))²³. Es posible que el único mecanismo que se adapte a las condiciones metabólicas de los axones y a sus bajos niveles de ATP, sea la autofagia ([Ikegami K. Koike T. 2003](#))²⁴; [Ikegami K. et al., 2004](#))²⁵; de hecho, es probable que debido a un manejo deficiente de los mecanismos energéticos, los autofagosomas se acumulen en las terminales axonales y formen los denominados esferoides “axonales” ([Coleman, M. 2005](#))²⁶ o estructuras bulbares, como se han descrito en este estudio. La secuencialidad y la ordenación de la patogenia es imprescindible para entender la EP; por ese motivo, resulta esencial saber si estas estructuras bulbares terminales surgen después de que los axones se degeneren, o si su aparición precede a la pérdida de continuidad axonal ([Coleman, M. 2005](#))²⁶. En este estudio se observó que fue el daño neuronal producido por este tóxico el que desencadenó una reacción activa dentro de las terminales afectadas, lo que las transformó en estructuras masivas que retuvieron muchos de sus componentes dentro de un volumen confinado. Este confinamiento se manifestó a modo de estructuras bulbares terminales y a modo de estructuras esferoidales periaxiales (“libres”).

Este almacenamiento de desechos intracelulares puede evitar que una dispersión desordenada de orgánulos y proteínas de células dañadas a través del espacio extracelular, obstaculice las interacciones normales de las células no dañadas; no obstante, como sugieren los datos actuales, también puede facilitar una rápida retirada de los desechos. Por otra parte, el contenido de los anteriormente mencionados esferoides es metabolizado; es decir, los esferoides no son estructuras que únicamente almacenan y transportan desechos neuronales, sino que también participan en su degradación.

Esta teoría está sustentada por la presencia de marcadores de autofagia como LC3. Existen aproximadamente 20 proteínas que están implicadas en la regulación de la autofagia; sin embargo, únicamente LC3 se ha encontrado en todas las estructuras autofágicas: fagóforo, autofagosomas y autofagolisosomas (Wang L. 2013)²⁷. Esta proteína se subdivide en LC3-I, forma citosólica, y LC3-II, que se encuentra unida a la membrana de los autofagosomas (Mizushima N. 2004)²⁰ (Fig. 6). No obstante, dado que no existen anticuerpos específicos para LC3-II, el análisis inmunohistoquímico fue no selectivo, interpretando que nos encontrábamos ante este subtipo cuando se observaran acúmulos en forma de punta, ya que este dato representa la unión de LC3-II a los autofagosomas nacientes.

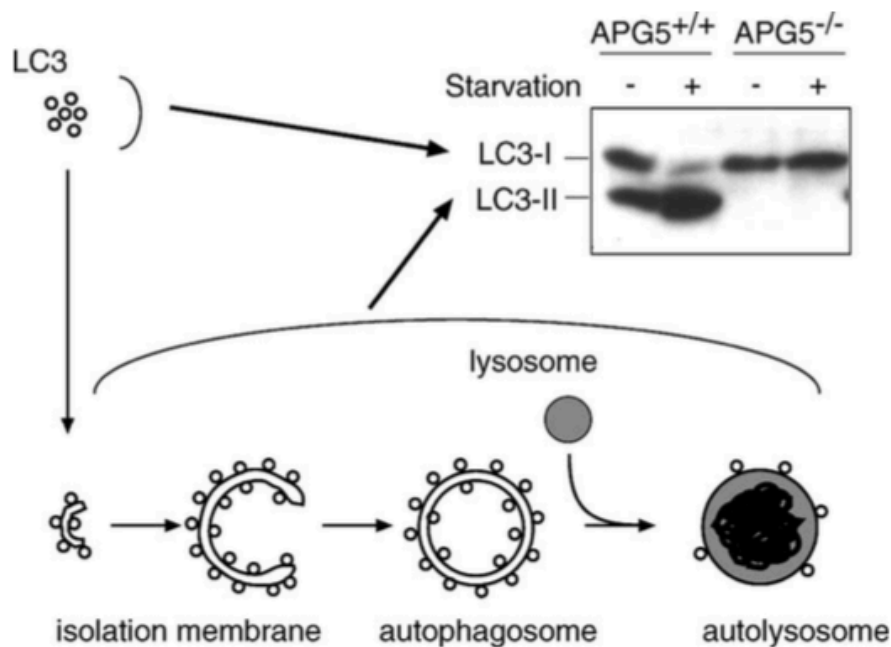


Fig. 6: El proceso de autofagia y su relación con el marcador LC3. Se muestra la formación de autofagosomas y su conversión a autofagolisosomas. Asimismo, se observa la localización de LC3 en estas estructuras durante el proceso. Imagen extraída de Mizushima N, 2004²⁰.

Así pues, una vez se han formado autofagosomas, cabría esperar su unión con lisosomas para finalizar su proceso madurativo; en consecuencia, mostraría positividad para marcadores de actividad lisosomal. Por este motivo, se emplearon los marcadores de Lamp1/Lamp2, glicoproteínas transmembrana lisosomales (Eskelinen E.L 2006)²⁸ que, además de favorecer la acción de lisis (mediante la acidificación de su medio, el transporte de sustancias degradadas, etc.), participan en la interacción y fusión de los lisosomas con ellos mismos y con otros componentes celulares (Fukuda M. 1991)²⁹. Los datos registrados en este estudio demostraron que los esferoides libres carecen de

inmunorreactividad positiva para Lamp1 o Lamp2, con lo cual, el proceso de autofagia en estas estructuras parece incompleto.

Por otro lado y en sintonía con esta línea de pensamiento, si en el esferoide libre se finalizara este proceso de maduración autofagosómica, también mostraría positividad para marcadores de la proteína Stx17. Esta proteína se ancla en la membrana autofagosómica facilitando la fusión de la misma con lisosomas, luego es una de las proteínas *driver* más importantes (que no única) de este proceso ([Diao J. et al., 2015](#))³⁰. En este estudio se objetivó la ausencia de inmunorreactividad para Stx17 en los esferoides libres, con lo cual, se interpreta que estos autofagosomas no maduran y finalizan el proceso autofágico; entonces, ¿cómo se finaliza dicho proceso? ¿es plausible la participación de otras células para finalizar el proceso autofágico?

Dentro de los grupos celulares que podrían participar en este proceso, se encuentra la glía. Existen diversos tipos de células gliales, que pueden ser clasificadas en: central (astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células ependimarias) y periférica (células de Schwann, capsulares y de Müller). Las células gliales no solo cumplen función de sostén sino que además intervienen en la regulación del sistema nervioso así como en su desarrollo y plasticidad. Incluso se ha comprobado que juegan un papel importante en el progreso de enfermedades neurológicas. El tipo celular más abundante en el SNC son los astrocitos; estas células son fundamentales en la promoción de la supervivencia neuronal, regulación de la sinapsis, regulación del metabolismo del SNC y eliminación de neurotransmisores de la hendidura sináptica ([Zuchero J.B., Barres, B., 2015](#))³¹. Es por ello y por su capacidad fagocítica, por lo que se planteó la posibilidad de que concretamente estas células interviniesen en el proceso de degradación de los productos de la degeneración neuronal en EP.

Esto fue lo que motivó el estudio de proteínas astrocitarias. Para ello, se emplearon marcadores proteicos característicos: GFAP y S100 β . La proteína GFAP (la proteína ácida fibrilar glial) es una de las principales proteínas astrocitarias. Como marcador, representa la actividad astrocitaria; de hecho, esa es la razón por la que clásicamente se ha empleado para demostrar el daño neuronal o neurodegenerativo ([Middeldorp, J., 2011](#))³². Asimismo, S100 β es una proteína principalmente producida por astrocitos; y, al igual que GFAP, se utiliza como marcador de actividad astrocitaria. El incremento de la

actividad astrocítica parece estar presente en una variedad de trastornos que afectan al SNC como consecuencia del daño neuronal, incluso en trastornos neurodegenerativos como la EP ([Wilhelm et al., 2011³³](#), [Sofroniew & Vinters, 2010⁴⁶](#), [Morales I. et al. 2015²¹](#)).

Así pues, se constató cómo los esferoides libres fueron atravesados por las prolongaciones astrocitarias, convirtiéndolos de este modo en esferoides “fenestrados”. En este momento, los esferoides mantuvieron inmunoreactividad positiva para LC3 así como para PS y, además, pasaron a positivar GFAP, S100 β y Lamp1, que hasta este momento se habían mostrado ausentes. Con esta información podemos concluir que efectivamente el esferoide libre ha sido penetrado por el astrocito, consiguiendo de este modo que el autofagosoma madure finalmente, convirtiéndose por tanto en un autofagolisosoma. Con lo cual, la función del esferoide fenestrado parece ser la de finalizar el proceso autofágico iniciado en el esferoide libre. Sin embargo, esto suscita una nueva pregunta: ¿qué ocurre a continuación con el contenido lisado?

En los astrocitos se detectó la proteína TH, que en condiciones normales no está presente en dichas células. Sin embargo, el esferoide (en ambas formas: libre y fenestrado) presentaba inmunoreactividad positiva para TH; por lo tanto, resulta lógico pensar que el contenido de los esferoides fenestrados pasa al astrocito, donde se encargará del aclaramiento final de los desechos dopaminérgicos. Consecuentemente, podríamos aventurarnos a aseverar que el proceso en su conjunto es una transautofagia, dado que el mecanismo iniciado por los esferoides parece haber sido finalizado gracias a la participación de los astrocitos.

Resulta de interés valorar la posibilidad de que todas las proteínas sinápticas sigan o no la misma ruta de degradación, ya que esto podría abrir puertas a nuevas líneas de investigación. Por este motivo, se evaluaron tanto la proteína α -Sinucleína (Syn) como la Proteína Precursora Amiloidea (APP), proteínas involucradas en la patogenia de la EP. En cuanto a la proteína APP, esta puede estar formada por distintas proteínas (de hecho, se conocen al menos 50 proteínas o péptidos diferentes) con capacidad de autoensamblarse en forma de fibrillas amiloides que se acumulan en forma de placas extracelulares o de inclusiones intracelulares, frecuentemente asociadas con la EP ([Iadanza, M. G. et al. 2018³¹](#)). En este estudio se localizó la presencia de APP en los

esferoides libres y posteriormente, en los esferoides fenestrados. Sin embargo, su relación con los astrocitos no fue igual de evidente, puesto que no se objetivó inmunorreactividad para APP en dichas células.

Por otro lado, si bien 6-OHDA no produce ni induce agregados proteicos o inclusiones similares a las de los cuerpos de Lewy (compuestas principalmente por Syn) como las que se ven en la EP, sí que se ha objetivado que interactúa con ella ([Blandini F. et al. 2008](#))³² pues ante la administración del tóxico que inicia la degradación neuronal, Syn responde trasladándose al espacio extracelular mediante exocitosis ([Lee H.J. et al. 2005](#))³³ donde luego será absorbida por otras células (microglía, astrocitos, oligodendrocitos, etc.) ([Bates C.A. et al. 2014](#))³⁴. Los hallazgos en este estudio con respecto a la proteína Syn, demostraron una abundante inmunorreactividad para la misma en el espacio extracelular (periaxonalmente, cerca de las terminaciones neuronales dopaminérgicas); no obstante, tanto los esferoides libres como los fenestrados, carecieron de inmunorreactividad para dicha proteína que, en cambio, sí fue verificada en los astrocitos.

En resumen, mientras la proteína APP sigue la ruta de degradación liderada por el esferoide, la proteína Syn sigue una ruta de degradación independiente del mismo. Luego no todas las proteínas sinápticas siguen la misma ruta de degradación y, consecuentemente, las estructuras esferoideas no son estrictamente necesarias para la degradación de todos los productos de desecho. En su conjunto, estos resultados confirman que no existe una ruta de degradación única; esto es, existen rutas de metabolización de desechos proteicos distintos de la acción efectuada por los esferoides.

En este estudio hemos valorado la autofagia como principal proceso de degradación de sustancias en los esferoides, no obstante, podrían existir otras vías para llevar a cabo la eliminación de las mismas. Existen dos rutas fundamentales de degradación de proteínas que son, por un lado, la vía vesicular mediada por lisosomas (que es la que valoramos en este trabajo) y, por otro lado, la vía citosólica mediada por la ubiquitina. Entre otras funciones, la ubiquitinación participa en la regulación de vías de señalización intercelular involucradas en funciones como el control de la apoptosis, la autofagia, el ciclo celular, la regulación transcripcional y la reparación del ADN ([Zamudio-Arroyo J.M et al. 2012](#))³⁵.

Diversos estudios sugieren que el complejo ubiquitina-proteosoma participa en la patogénesis de la EP ya que, se ha objetivado colocalización de subunidades de proteosomas en los cuerpos de Lewy. Por otro lado, se ha relacionado la EP juvenil con una mutación en el gen de la *parkina* (una ligasa de ubiquitina E3) así como también se ha vinculado mutaciones en la ubiquitina UCH-L1 (C-hidrolasa L1 terminal) en otras familias de EP ([Tanaka Y. et al., 2001³⁶](#)). Sin embargo, el fallo de este complejo no solo se relaciona con formas familiares, sino que se han observado alteraciones del mismo incluso en la EP esporádica. ([Tanaka Y. et al., 2001³⁶](#)).

El puente de unión entre la patogenia de la EP y la ubiquitinación, es la constatación de que una alteración de esta vía favorece la generación y acumulación de agregados en las neuronas dopaminérgicas; concretamente de agregados de Syn ([Tanaka Y. et al., 2001³⁶](#), [Stefanis L. et al. 2001³⁷](#)). De ahí que resulte de interés valorar la presencia de este mecanismo en los esferoides libres en la EP; de hecho, ya ha empezado a estudiarse la inmunorreactividad de la ubiquitina en estructuras bulbares ([Schultz C. et al., 2001³⁸](#)).

Los datos actuales sugieren además, que la acción metabólica de los esferoides libres es incompleta; consecuentemente, se requiere la participación de otros grupos celulares para finalizar la degradación y el transporte de los desechos dopaminérgicos. Pero, ¿cuáles? Dado el cambio en las características inmunohistoquímicas reflejado en los esferoides libres al ser penetrados por prolongaciones astrocitarias, se concluye que son los astrocitos los que completan este proceso de autofagia (ahora transautofagia).

La transautofagia debería ser lo suficientemente eficiente como para limpiar el tejido estriado de una degeneración dopaminérgica masiva (incluso en aquellas regiones sometidas a una degeneración completa) en unos pocos días ([Morales I. et al 2015²¹](#), [Morales I. et al 2016³⁹](#)). Basándonos en los datos reflejados en este estudio, la transautofagia en la EP consta de los siguientes pasos: 1. Agrupación de desechos dopaminérgicos dentro de los esferoides libres; 2. Disposición de los desechos intraesferoidales dentro de autofagosomas (LC3); 3. Preparación de autofagosomas para su fagocitosis por otras células (PS); 4. Unión de procesos astrocíticos a los esferoides libres, para finalmente penetrarlos (esferoides fenestrados); 5. Reactivación del procesamiento de desechos en esferoides fenestrados (autofagolisosomas); 6. Transferencia de los componentes internos de los esferoides fenestrados al citoplasma de

los astrocitos; 7. Transporte de proteínas dopaminérgicas (TH, DAT) al soma celular de astrocitos donde pueden continuar su degradación.

No obstante, si este mecanismo fuera lo suficientemente eficaz, no se producirían agregados proteicos derivados de los desechos dopaminérgicos que retroalimenten positivamente la lesión neuronal ([Stefanis L. et al. 2001³⁷](#); [Webb J. et al. 2003⁴⁰](#); [Martinez-Vicente M. et al. 2008⁴¹](#); [Friedman L. et al. 2012⁴²](#)). Así pues, ¿qué datos influyen en la ineficacia de este proceso autofágico? ¿está relacionado con el estado de la glía, o más concretamente, de los astrocitos? La actividad anómala de las células gliales ha estado involucrada en la progresión de la EP; si bien con frecuencia se consideran específicas de la enfermedad, la mayoría de ellas también se han observado en el cerebro envejecido ([Sofroniew & Vinters, 2010⁴³](#); [Belanger et al., 2011⁴⁴](#); [Rodríguez et al., 2012⁴⁵](#)): tanto promoviendo daño como proporcionando protección a las neuronas, ([Sofroniew & Vinters, 2010⁴³](#); [Rodríguez et al., 2012⁴⁵](#)). De hecho, la activación de microglía podría ser necesaria para completar la metabolización de los desechos mencionados. De este modo, parece que el estudio de los astrocitos (sus cambios relacionados con la EP, los mecanismos mediante los cuales les llegan los desechos dopaminérgicos y su actuación conjunta con la microglía) podría ser la nueva lente con la que enfocar esta patología, dado que permitiría obtener hallazgos relacionados con su patogénesis y finalmente, podría inducir un cambio radical en el enfoque terapéutico.

Actualmente, el tratamiento de la EP gira en torno a los síntomas motores que se manifiestan en estadios avanzados de la enfermedad, en los que las neuronas dopaminérgicas se encuentran extensamente afectadas. Sin embargo, los estudios de Braak han demostrado que las alteraciones en células no dopaminérgicas preceden a la degeneración de las células dopaminérgicas. En dichos estudios se encontraron acúmulos precoces de Syn y cuerpos de Lewy en el núcleo olfatorio anterior y el tronco encefálico inferior, lo que explica que las primeras manifestaciones de esta enfermedad sean los síntomas no motores (hiposmia, hipotensión ortostática, impotencia, etc.). Posteriormente, en el estadio tres se empieza a afectar el cuerpo estriado y finalmente en el estadio cuatro, aparecen los síntomas motores ([Braak H. et al. 2009⁴⁶](#)).

En resumen, conocer los esferoides y su participación en la transautofagia suponen un paso fundamental en el conocimiento del proceso de eliminación de sustancias producidas

por la degeneración dopaminérgica. Por este motivo es necesario continuar investigando, no solo la formación de agregados tóxicos, sino también su transporte y aclaramiento, haciendo especial hincapié en la intervención de otros grupos celulares así como en las posibles causas que provocan su ineficacia. Luego entender esto en profundidad podría orientar un abordaje terapéutico mucho más eficaz que actúe preventivamente, o lo que es lo mismo, antes de la manifestación clínica (motora) característica de la EP.

Conclusión

Los resultados expuestos en este trabajo han demostrado que los desechos generados en las terminales neuronales dopaminérgicas, se albergan en esferoides periaxoniales extracelulares con características propias de autofagosomas. Dichas estructuras interactúan con los astrocitos, consiguiendo de este modo las enzimas necesarias para continuar su maduración, convirtiéndose así en autofagolisosomas. Por último, estos desechos son trasladados al astrocito, con lo que finaliza la degradación; lo cual refleja que se trata de un proceso transautofágico.

Finalmente y con el fin de comprender completamente todos los mecanismos que engloban este proceso, es necesario realizar nuevos estudios que valoren la acción de otras proteínas asociadas (como la ubiquitina) y determinar qué factores intervienen en la ineficacia de la transautofagia que deriva a la evolución a la EP (como el envejecimiento). Esto se debe a que el conocimiento en profundidad de este mecanismo de aclaramiento así como su alteración en los pacientes con EP, puede orientar futuras estrategias terapéuticas que impidan la progresión del daño neuronal y que, en consecuencia, eviten la aparición de síntomas motores característicos de la EP.

¿Qué he aprendido realizando el TFG?

En este estudio se ha trabajado en un laboratorio experimental con animales, lo que nos ha permitido conocer los protocolos de un ámbito poco explorado en nuestro recorrido académico. De este modo, hemos podido observar la obtención de muestras, cómo se conservan y los pasos a seguir para obtener tejido en condiciones óptimas para su estudio. Asimismo, nos ha permitido conocer y experimentar con el uso de sustancias inmunofluorescentes. Finalmente, al trabajar con animales, pudimos estudiar qué medidas se realizan para su cuidado al igual que los medios necesarios para garantizar el menor sufrimiento posible.

Debido a la extensa búsqueda bibliográfica acerca de la Enfermedad de Párkinson y su relación con los esferoides, no solo ampliamos nuestro conocimiento acerca de esta enfermedad, sino que hemos podido apreciar el profundo desconocimiento que rodea a las enfermedades neurodegenerativas y la imperiosa necesidad de continuar estudiándolas.

Ergo, dada la elección de este tema, hemos aprendido puntos involucrados en la medicina que no veremos en nuestra práctica clínica, lo cual no puede sino enriquecer nuestra perspectiva del cuidado de la salud y mostrarnos la oportunidad que puede suponer realizar estudios de investigación experimental en nuestra carrera profesional.

Bibliografia

1. Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.
2. Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A.R., Kittel, A., Saitoh, T., (1995). The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475.
3. Maroteaux, L., Campanelli, J.T., Scheller, R.H., (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8, 2804–2815.
4. Koichi Wakabayashi, Kunikazu Tanji, Fumiaki Mori y Hitoshi Takahashi, (2007). The Lewy Body in Parkinson's Disease: Molecules Implicated in the Formation and Degradation of Alpha-Synuclein Aggregates. *Japanese Society of Neuropathology.* 27, 494–506.
5. Hornykiewicz, O., (1998). Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51, S2–S9.
6. Orimo, S., Uchihara, T., Nakamura, A., Mori, F., Kakita, A., Wakabayashi, K., Takahashi, H., (2008). Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 131, 642–650.
7. Tofaris, G.K., Garcia, R.P., Humby, T., Lambourne, S.L., O'Connell, M., Ghetti, B., Gossage, H., Emson, P.C., Wilkinson, L.S., Goedert, M., et al., (2006). Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1–120): implications for Lewy body disorders. *J. Neurosci.* 26, 3942–3950.
8. Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., (2011). Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57–71.
9. Li, Y., Liu, W., Oo, T.F., Wang, L., Tang, Y., Jackson-Lewis, V., Zhou, C., Geghman, K., Bogdanov, M., Przedborski, S., et al., (2009). Mutant

- LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 12, 826–828.
10. Meissner, W., Prunier, C., Guilloteau, D., Chalon, S., Gross, C.E., Bezard, E., (2003). Time-course of nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* 28, 209–218.
 11. Herkenham, M., Little, M.D., Bankiewicz, K., Yang, S.C., Markey, S.P., Johannessen, J.N., (1991). Selective retention of MPP⁺ within the monoaminergic systems of the primate brain following MPTP administration: an in vivo autoradiographic study. *Neuroscience* 40, 133–158.
 12. Iseki, E., Kato, M., Marui, W., Ueda, K., Kosaka, K., (2001). A neuropathological study of the disturbance of the nigro-amygdaloid connections in brains from patients with dementia with Lewy bodies. *J. Neurol. Sci.* 185, 129–134.
 13. Raff, M.C., Whitmore, A.V., Finn, J.T., (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296, 868–871.
 14. Cheng, H.C., Kim, S.R., Oo, T.F., Kareva, T., Yarygina, O., Rzhetskaya, M., Wang, C., Doring, M., Talloczy, Z., Tanaka, K., et al., (2011). Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy. *J. Neurosci.* 31, 2125–2135.
 15. Nishiyama, J., Miura, E., Mizushima, N., Watanabe, M., & Yuzaki, M., (2007). Aberrant Membranes and Double-Membrane Structures. Accumulate in the Axons of Atg5-Null Purkinje Cells before Neuronal Death. *Autophagy*, 3:6, 591-596.
 16. Petersen, A., Larsen, K. E., Behr, G. G., Romero, N., Przedborski, S., & Brundin, P. et al., (2001). Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Human Molecular Genetics*, 10, 1243–1254.
 17. Ravikumar, B., Duden, R., & Rubinsztein, D. C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human Molecular Genetics*, 11, 1107–1117.
 18. Finn, J.T., Weil, M., Archer, F., Siman, R., Srinivasan, A., Raff, M.C., (2000). Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced

- by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *J. Neurosci.* 20, 1333–1341.
19. Beirowski B, Nogradi A, Babetto E, Garcia-Alias G, Coleman MP. (2010). Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*; 69:455–72.
 20. Mizushima N (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2491–2502.
 21. Morales I., Sanchez A., Rodriguez-Sabate C. and Rodriguez M. (2015). The degeneration of dopaminergic synapses in Parkinson's disease: a selective animal model. *Behav. Brain Res.* 289, 19–28.
 22. Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–10.
 23. Yang, Y., Fukui, K., Koike, T., & Zheng, X. (2007). Induction of autophagy in neurite degeneration of mouse superior cervical ganglion neurons. *European Journal of Neuroscience*, 26(10), 2979–2988.
 24. Ikegami, K. & Koike, T. (2003) Non-apoptotic neurite degeneration in apoptotic neuronal death: pivotal role of mitochondrial function in neurites. *Neuroscience*, 122, 617–626.
 25. Ikegami, K., Kato, S. & Koike, T. (2004) N-alpha-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) suppresses neuritic degeneration caused by different experimental paradigms including in vitro Wallerian degeneration. *Brain Res.*, 1030, 81–93.
 26. Coleman, M. (2005). Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 889–898.
 27. Wang, L., Chen, M., Yang, J., & Zhang, Z (2013) LC3 fluorescent puncta in autophagosomes or in protein aggregates can be distinguished by FRAP analysis in living cells, *Autophagy*, 9:5, 756-769.
 28. Eskelinen, E.-L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5-6), 495–502.

29. Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266, 21327–21330.
30. Diao, J., Liu, R., Rong, Y., Zhao, M., Zhang, J., Lai, Y., ... Zhong, Q. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 520(7548), 563.
31. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., & Radford, S. E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
32. Blandini, F., Armentero, M.-T., & Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism & Related Disorders*, 14, S124–S129.
33. Lee, H.-J. (2005). Intravesicular Localization and Exocytosis of α -Synuclein and its Aggregates. *Journal of Neuroscience*, 25, 6016–6024.
34. Bates, C. A., & Zheng, W. (2014). Brain disposition of α -Synuclein: roles of brain barrier systems and implications for Parkinson's disease. *Fluids and Barriers of the CNS*, 11, 17.
35. Zamudio-Arroyo J.M , Peña-Rangel M.T y Escovar J.R. (2012)La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 5(2):133-141.
36. Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, Sawa AL, Dawson V, Dawson TM, Ross CA (2001) Inducible expression of mutant α -synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 10:919–926.
37. Stefanis, L., Larsen, K. E., Rideout, H. J., Sulzer, D., & Greene, L. A. (2001). Expression of A53T Mutant But Not Wild-Type α -Synuclein in PC12 Cells Induces Alterations of the Ubiquitin-Dependent Degradation System, Loss of Dopamine Release, and Autophagic Cell Death. *The Journal of Neuroscience*, 21(24), 9549–9560.
38. Schultz, C., Dick, E. J., Cox, A. B., Hubbard, G. B., Braak, E., and Braak, H. (2001). Expression of stress proteins alpha B-crystallin, ubiquitin, and hsp27 in pallido-nigral spheroids of aged rhesus monkeys. *Neurobiol. Aging*. 22, 677–682.

39. Morales, I., Sanchez, A., Rodriguez-Sabate, C., & Rodriguez, M. (2016). The astrocytic response to the dopaminergic denervation of the striatum. *Journal of Neurochemistry*, 139(1), 81–95.
40. Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., & Rubinsztein, D. C. (2003). α -Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 25009–25013.
41. Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z. Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E.V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P.T., Sulzer, D. and Cuervo, A.M. (2008). Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy.
42. Friedman, L. G., Lachenmayer, M. L., Wang, J., He, L., Poulou, S. M., Komatsu, M., Yue, Z. (2012). Disrupted Autophagy Leads to Dopaminergic Axon and Dendrite Degeneration and Promotes Presynaptic Accumulation of α -Synuclein and LRRK2 in the Brain. *Journal of Neuroscience*, 32(22), 7585–7593.
43. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.
44. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738.
45. Rodriguez M, Sabate M, Rodriguez-Sabate C, Morales I (2012) The role of non-synaptic extracellular glutamate. *Brain Res. Bull.* 93, 17–26.
46. Braak, H., Ghebremedhin, E., Ruß, U., Bratzke, H., Del Tredici, K., 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research* 318, 121–134.
47. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738.
48. Rodriguez M, Sabate M, Rodriguez-Sabate C, Morales I (2012) The role of non-synaptic extracellular glutamate. *Brain Res. Bull.* 93, 17–26.
49. Braak, H., Ghebremedhin, E., Ruß, U., Bratzke, H., Del Tredici, K., 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research* 318, 121–134.