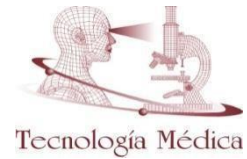




Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Tecnología Médica



“Exocitosis de AMPAR y organización del citoesqueleto de actina en cultivo de neuronas hipocampales en un modelo murino de Miopatía Centronuclear causada por mutación de Dinamina 2”

**Seminario de Grado
presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”**

Marjorie Labraña Allende
Michelle Mattar Araos

Profesor guía: Arlek González Jamett
Profesor co-guía: Álvaro Ardiles Araya

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, queremos agradecer a nuestra profesora guía Arlek González Jamett por recibimos en este hermoso proyecto y orientarnos, además del cariño, paciencia y confianza entregada. También queremos agradecer a nuestro profesor co-guía Álvaro Ardiles Araya por acompañarnos y guiarnos en esta gran experiencia. Ambos nos ayudaron a crecer y encantarnos en el ámbito de la maravillosa labor de la investigación. Además, queremos agradecer al CINV y al laboratorio “AMC”, por permitirnos hacer nuestro trabajo en sus dependencias y a todas las personas que tuvimos el agrado de conocer durante este proyecto y que de alguna u otra forma nos ayudaron siempre con cordialidad.

Asimismo, queremos agradecer a nuestras familias y amigos por acompañarnos en este proceso, animarnos y tenernos paciencia, si bien este proyecto fue en un contexto de pandemia, disfrutamos mucho la experiencia de trabajar en esta investigación.

Muchas gracias a todos por ayudarnos a crecer, por el aprendizaje y por el afecto, este proyecto de tesis siempre lo recordaremos como una gran formación en nuestras vidas con cariño.

FINANCIAMIENTO

Este estudio se realizó con financiamiento de:

Nombre del proyecto	“Role of Dynamin-2 in central nervous system synapses: Potential impact of Centronuclear Myopathy-causing mutations on AMPA-Receptor trafficking and excitatory synaptic transmission”
Institución	Instituto Milenio Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV)
Investigador Responsable	Arlek González Jamett
Financiamiento	Fondecyt 11180731

RESUMEN

Antecedentes: La miopatía centronuclear (MCN) es una enfermedad neuromuscular congénita causada mayoritariamente por mutaciones en el gen DNM2 que codifica para la GTP-asa dinamina-2. Estudios clínicos han demostrado que pacientes con MCN manifiestan trastornos del aprendizaje y un bajo coeficiente intelectual, aunque los mecanismos patológicos no han sido estudiados. Ya que en el sistema nervioso central dinamina-2 regula el tráfico de los receptores glutamatérgicos AMPA (AMPA), principal mediador de la transmisión sináptica excitatoria, y la dinámica del citoesqueleto de actina, el presente estudio evalúa si mutaciones en DNM2 causantes de MCN afectan la exocitosis de AMPAR y la organización de la actina neuronal, responsable de la arquitectura sináptica.

Objetivo: Evaluar el impacto de la mutación p.R465W en DNM2 sobre la exocitosis de AMPAR y sobre la organización del citoesqueleto de actina en cultivos de neuronas hipocampales de ratón.

Material y método: Este estudio es realizado en cultivo primario de neuronas hipocampales de ratones postnatales de un modelo murino de MCN que expresa la mutación p.R465W en DNM-2 y su contraparte silvestre. La exocitosis de AMPAR es evaluada en condiciones basales (sin estímulo químico) y el remodelamiento de actina es evaluado en condiciones basales y en respuesta a la inducción química de potenciación a largo plazo (ch-LTP).

Resultados: La mutación p.R465W afecta la función sináptica de dinamina-2 lo que perturba la morfología de las espinas dendríticas, la cual depende del citoesqueleto de actina. Adicionalmente, se asocia con una reducción en la densidad de las espinas dendríticas y con un tráfico de AMPAR defectuoso hacia la membrana plasmática.

Conclusiones: Mutaciones en DNM2 causantes de MCN afectan el citoesqueleto de actina neuronal, perturbando la estructura sináptica y el tráfico de AMPAR. Estos mecanismos podrían explicar los defectos cognitivos reportados en pacientes con MCN.

PALABRAS CLAVES: Miopatía centronuclear, dinamina-2, exocitosis, AMPAR, actina, neuronas hipocampales, potenciación sináptica, espinas dendríticas.

LISTA DE ACRÓNIMOS

- **AMPA**R: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico. Receptor ionotrópico transmembrana de Glutamato
- **Ch-LTP**: inducción de LTP de forma química
- **DIV**: días in vitro
- **DNA**: Ácido desoxirribonucleico
- **DNM2**: Gen Dinamina-2
- **PSD**: del inglés post-synaptic-density (Densidad post sináptica)
- **HTZ**: Heterocigoto
- **LTD**: del inglés long-term depression (Depresión sináptica de largo plazo)
- **LTP**: del inglés long-term potentiation (Potenciación sináptica de largo plazo)
- **MCN**: Miopatía centronuclear
- **MCN-AD**: Miopatía centronuclear autosómica dominante
- **WT**: Silvestre del inglés wild type

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Miopatías Hereditarias	2
1.2 MCN asociada a mutaciones en dinamina-2	3
1.3 Dinaminas.....	4
1.4 Tráfico de AMPAR y rol de Dinamina-2 en las postsinapsis	6
1.5 Dinamina-2, remodelamiento de actina y su potencial impacto en la función sináptica.....	8
CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	12
2.1 Pregunta de Investigación	12
2.2 Hipótesis.....	12
2.3 Relevancia	13
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo General	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Tipo de Diseño	15
4.2 Descripción de la población de estudio.....	15
4.3 Muestreo.....	15
4.4 Tamaño muestral	16
4.5 Variables.....	17
4.6 Criterios de Inclusión y exclusión	18
4.7 Fuentes y método de recolección de datos	19
4.8 Procedimientos	20

4.8.1 Cultivo celular de neuronas hipocampales	20
4.8.2 Inmunofluorescencia	20
4.8.3 Transformación de Bacterias competentes	21
4.8.4 Extracción de DNA	21
4.8.5 Transfección por lipofección	21
4.8.6 Microscopía Confocal	21
4.8.7 Microscopía TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)	22
4.8.8 Genotipificación y PCR.....	23
4.9 Plan de Análisis	23
4.10 Consideraciones éticas	24
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	26
Cantidad y duración de los eventos espontáneos de exocitosis de AMPAR en neuronas hipocampales en cultivo	26
Tendencia a una menor densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales de ratones HTZ.....	30
Las espinas dendríticas de neuronas HTZ muestran una morfología inmadura en comparación a las WT	34
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	37
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	45
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	47
CAPÍTULO 9. ANEXOS.....	52
Anexo N° 1: Cultivo Primario de hipocampo de ratón	52
Anexo N° 2: Inmunofluorescencia	54
Anexo N° 3: Transformación de Bacterias Competentes.....	56
Anexo N° 4: Extracción de DNA (E.Z.N.A Endo-Free Plasmid DNA Mini	

Kit Protocols)	59
Anexo N° 5: Transfección de Neuronas Hipocampales	60
Anexo N°6: Protocolo de Genotipificación.....	61
Anexo N° 7: Inducción de ch-LTP para cultivo neuronal.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>FIGURA 1 Representación lineal de los dominios de dinamina</i>	<i>6</i>
<i>FIGURA 2. Ilustración de espina dendrítica</i>	<i>11</i>
<i>FIGURA 3. Constructo SEP.....</i>	<i>27</i>
<i>FIGURA 4. Los eventos espontáneos de exocitosis de AMPAR tienden a ser menos y de menor duración en neuronas de ratones HTZ basal.....</i>	<i>29</i>
<i>FIGURA 5. Inmunofluorescencia neuronas 7 DIV.....</i>	<i>31</i>
<i>FIGURA 6 La densidad de espinas dendríticas tiende a ser menor en neuronas HTZ que en neuronas WT a los 7 DIV.....</i>	<i>31</i>
<i>FIGURA 7 Imagen representativa de neuronas WT a los 7 DIV y 14 DIV I neuronas WT a los 7 DIV y 14 DIV.....</i>	<i>33</i>
<i>FIGURA 8. Densidad de espinas dendríticas en neuronas WT y HTZ de 14 DIV en ch-LTP.....</i>	<i>34</i>
<i>FIGURA 9. Distribución de la morfología de las espinas dendríticas por neurona de 7 DIV para cada condición experimental</i>	<i>35</i>
<i>FIGURA 10. Distribución de la morfología de las espinas dendríticas en neuronas WT y HTZ de 14 DIV en condición ch-LTP.....</i>	<i>36</i>
<i>FIGURA 11. Modelo propuesto de mutación p.R465W en DNM-2 y su efecto en sinapsis estructural y funcional.....</i>	<i>44</i>

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 MIOPATÍAS HEREDITARIAS

Las miopatías hereditarias son un grupo de enfermedades heredables de etiología variada que afectan principalmente a la musculatura esquelética (1). El signo clínico predominante de las miopatías hereditarias es la hipotonía, la cual se presenta desde el nacimiento o desde los primeros meses de vida y puede acompañarse de signos como debilidad muscular proximal y/o distal, disminución de los reflejos osteotendinosos, disparexia facial y trastornos respiratorios y alimentarios entre otros (2). Dependiendo de su etapa de inicio, las miopatías hereditarias pueden manifestarse con signos leves a severos. En general, las formas más graves se asocian con un inicio neonatal mientras que las menos severas pueden comenzar a manifestarse en la edad escolar e incluso en la edad adulta (2). A pesar de que en los diferentes tipos de miopatía hereditaria existen variaciones en cuanto a la clínica, el diagnóstico diferencial se determina mediante histopatología de la fibra muscular y estudios genéticos (2). Actualmente no existe tratamiento curativo para los diferentes tipos de miopatías hereditarias, sólo apoyo en el manejo de síntomas. De aquí la importancia de determinar específicamente el tipo de miopatía hereditaria presentada, ya que esto repercutirá tanto en un mejor pronóstico de la enfermedad como en la prevención de algunos signos graves (1).

Las miopatías hereditarias incluyen distrofias musculares, como la distrofia muscular de Duchenne, en las que existe degeneración y destrucción del tejido muscular y miopatías congénitas no distróficas. Estas últimas pueden clasificarse, de acuerdo con las alteraciones patológicas del músculo observadas con microscopía óptica y electrónica (2) en : 1) miopatía nemalínica (MN), grupo amplio con agregados proteicos interfibras denominados cuerpos nemalínicos; 2) miopatía por desproporción congénita del tipo de fibras (MDCF); 3) miopatía con *cores* (MCC), en donde se observa desestructuración del patrón inter miofibrilar y 4) miopatía centronuclear (MCN) donde el signo histológico más predominante es una centralización anormal de los mionúcleos.

La MCN es una enfermedad congénita caracterizada clínicamente por debilidad y atrofia muscular progresiva, acompañada morfológicamente por presencia de núcleos centrales en la mayoría de las fibras de los músculos afectados (3) . Este trastorno afecta principalmente a la musculatura de la cintura, el tronco, el cuello y extremidades distales. La debilidad puede estar presente durante la niñez y adolescencia, o puede manifestarse en la tercera década de vida o superiores (4).

La MCN es causada por mutaciones en tres genes: MTM1, que codifica para miotubularina, DNM2 que codifica para la GTP-asa dinamina-2 y BIN1, que codifica para anfifisina-1 (5). Basado en los casos reportados durante las últimas décadas, se ha propuesto la distinción entre formas de MCN de inicio temprano y tardío; el inicio de las formas autosómicas dominantes (EA) se produce en la adolescencia o la edad adulta, mientras que la mayoría de las formas autosómicas recesivas (RA) o esporádicas comienzan a una edad más temprana (6). Según lo anterior, las mutaciones causantes de MCN se clasifican en: miopatía miotubular ligada a cromosoma X debida a mutaciones en miotubularina, MCN autosómica recesiva asociada a mutación en BIN1/anfifisina y MCN autosómica-dominante ligada a mutación en el gen dinamina-2 (DNM2) (7), la cual es el objeto de estudio de este trabajo de tesis.

1.2 MCN ASOCIADA A MUTACIONES EN DINAMINA-2

La forma autosómica dominante de MCN (MCN-AD) representa aproximadamente un 50% de los casos totales de MCN y se asocia a mutaciones en el gen de dinamina-2 (DNM2) (8). Dinamina-2 es una GTPasa implicada en el remodelamiento de membranas y del citoesqueleto (9,10). Mutaciones heterocigotas (HTZ) de DNM2 causantes de MCN-AD están asociadas a diversas manifestaciones clínicas, las cuales pueden presentarse en la infancia y/o adolescencia y progresar lentamente a lo largo de los años o manifestarse de forma esporádica y grave en la vida neonatal. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes con MCN-AD son: hitos motores retardados, debilidad facial y muscular, ptosis y limitación de los movimientos oculares (7). Las características histopatológicas que más destacan incluyen núcleos de localización central

en un gran número de fibras musculares extrafusales, disposición radial de hebras sarcoplásmicas alrededor de los núcleos centrales y predominancia e hipotrofia de fibras lentas o de tipo 1 (4).

A pesar de que la afección muscular es la manifestación clínica más estudiada de la MCN-AD, diversos reportes sugieren que pacientes portadores de mutaciones en DNM2 causantes de MCN-AD exhiben también defectos cognitivos. En el año 2004, se informó que dentro de un estudio a 29 pacientes con MCN perteneciente a 3 familias, se presentaba deterioro cognitivo en 5 pacientes, tres de ellos con la forma autosómica dominante presente, y dos con la forma autosómica recesiva, todos ellos con requerimiento de escolarización adaptada (6). En el año 2005, se realizaron estudios electrofisiológicos a pacientes con MCN-AD los cuales mostraron, además de cambios miopáticos, una reducción de la conducción nerviosa motora y sensorial, evidenciando una alteración a nivel de las fibras nerviosas que conectan con el músculo (11), conexiones que posiblemente también se vean alteradas a nivel de sistema nervioso central.

Un reporte clínico del año 2007 describió un grupo de pacientes con MCN-AD que requirieron de educación adaptada debido a dificultades en el aprendizaje y “retraso mental” leve desde la infancia (12), sugiriendo fuertemente que mutaciones en el gen DNM2 conducen a defectos cognitivos en pacientes con MCN-AD. En la misma línea, Böhm et al. (13) en el año 2012, reportaron un “coeficiente intelectual limitado” en un grupo de pacientes con MCN-AD causadas por diversas mutaciones en el gen DNM2. Pero, **¿por qué mutaciones en la proteína dinamina-2 podrían causar defectos a nivel cognitivo en estos pacientes?** Hasta la fecha los mecanismos moleculares que podrían explicar estos defectos no han sido descritos y fueron el objeto de estudio de este trabajo de tesis.

1.3 DINAMINAS

La súper familia de las dinaminas son mecano-enzimas con actividad GTPasa involucradas en diversos procesos asociados a membrana, tales como, endocitosis, exocitosis y tráfico vesicular. Además, participan en la dinámica del citoesqueleto de actina a través de la estabilización, elongación y remodelamiento de los filamentos de actina (14). La súper-familia de las dinaminas

se compone de dinaminas clásicas y proteínas tipo-dinamina. Dentro de las dinaminas clásicas existen tres isoformas en mamíferos: dinamina-1, dinamina-2 y dinamina-3 (9), cada una de ellas codificadas por genes diferentes: DNM1 localizado en el cromosoma 9, DNM2 localizado en el cromosoma 19 y DNM3 localizado en el cromosoma 1 (10). Las tres dinaminas clásicas exhiben también distintos patrones de expresión: dinamina-1 se expresa en neuronas en niveles muy altos, dinamina-2 se expresa de forma ubicua, mientras que dinamina-3 se expresa en cerebro (en menor proporción que dinamina-1) y además en corazón, testículos y pulmones (9,14,15). Las tres dinaminas clásicas poseen alta homología entre sus secuencias y se organizan en cinco dominios altamente conservados: un dominio GTPasa amino-terminal (dominio G) que une e hidroliza GTP, un dominio medio necesario para su oligomerización, un dominio homólogo a pleckstrina (PH) necesario para su interacción con lípidos de membrana, un dominio efector de su actividad GTPasa (GED) y un dominio C-terminal rico en prolinas y argininas necesario para su interacción con proteínas con dominio SH3 (9,14), (FIGURA 1).

Si bien dinamina-1 es la isoforma predominante en el sistema nervioso y dinamina-3 cumple un rol a nivel postsináptico específico (9), se ha observado que dinamina-2 participa tanto a nivel presináptico en el reciclaje de vesículas sinápticas (16), como a nivel postsináptico en el reciclaje endocítico de receptores glutamatérgicos tipo AMPA (AMPA) (17,18), lo que sugiere que esta isoforma es particularmente relevante para mantener la transmisión sináptica. En esta línea se ha demostrado que en ratones doble knock-out (KO) para dinamina-1 y para dinamina-3, pero no para dinamina-2, aún es posible una eficiente transmisión sináptica (19) ya que aun cuando estos ratones presentan fallas neurológicas, son viables hasta dos semanas post-natal (20), lo que demuestra que su ausencia puede, hasta cierto punto, ser compensada por las otras isoformas. Sin embargo, la delección de dinamina-2 es letal durante el desarrollo embrionario y por tanto incompatible con la vida (9,20), lo que fuertemente sugiere que dinamina-2 juega un papel preponderante para el desarrollo del sistema nervioso y para la función sináptica (21). De ser así, las mutaciones causantes de MCN-AD podrían afectar la función de dinamina-2 a nivel pre y post-sináptico y consecuentemente alterar la transmisión sináptica explicando los defectos cognitivos descritos en pacientes con MCN-AD.

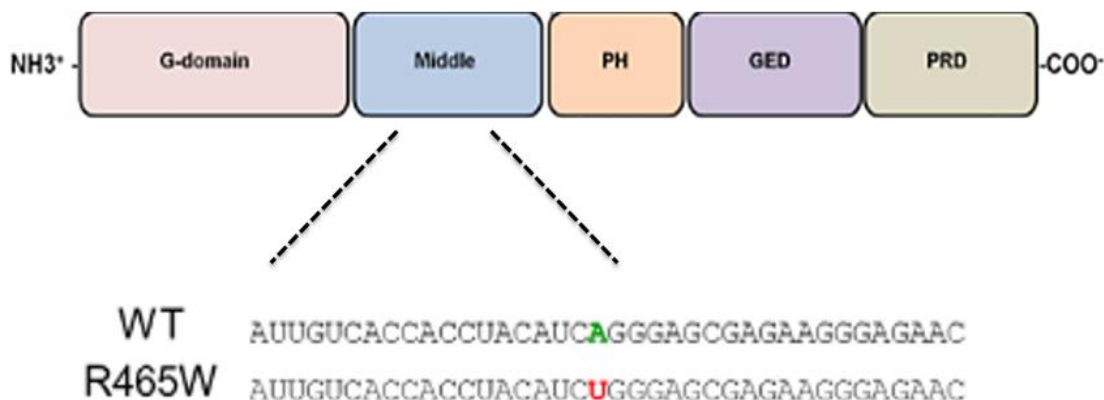


FIGURA 1. Representación lineal de dominios de dinamina. (Arriba) Esquema representativo de los cinco dominios que forman la estructura general de las dinaminas y (abajo) se muestra la mutación p.R465W con la cual se trabaja a lo largo de este estudio. Adaptado de Gonzalez Jamett et al., 2013 y Trochet et al., 2018.

1.4 TRÁFICO DE AMPAR Y ROL DE DINAMINA-2 EN LAS POSTSINAPSIS

El sistema nervioso central de los mamíferos posee billones de neuronas altamente especializadas para la transmisión de señales y cada conexión entre neuronas está formada por cientos de sinapsis que permiten la comunicación entre unas y otras (22), siendo el receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico, (AMPAR), uno de los principales receptores de la transmisión sináptica excitatoria en el sistema nervioso de los mamíferos (17).

Este receptor ionotrópico para glutamato consta de un ensamblaje tetamérico con subunidades de alta homología codificadas por cuatro diferentes genes: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. Todas estas subunidades de AMPAR poseen una región extracelular y una región transmembrana que varía en su dominio C-terminal intracelular (22). Las subunidades GluR1 y GluR4 poseen un dominio C-terminal más largo con gran importancia para la inserción de AMPAR

en las sinapsis durante un aumento de la actividad neuronal, mientras que una cola C-terminal corta se asocia al reciclaje de AMPAR dentro y fuera de la sinapsis en ausencia de actividad neuronal (22). El ensamblaje de AMPAR se conforma de dos heterodímeros idénticos, con GluR1/2 siendo las subunidades más predominantes en neuronas piramidales de hipocampo, seguido luego por los heterómeros GluR2/3 (22).

El número de AMPAR expresados en las sinapsis individuales en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo es variable, con evidencia de que la expresión superficial de este receptor es regulada dinámicamente por la actividad neuronal (17).

La mayoría de las sinapsis excitatorias se caracterizan por la presencia de protrusiones ricas en actina denominadas espinas dendríticas, cuyas “cabezas” poseen una matriz proteica electrodenso denominada “densidad post-sináptica (PSD)”. Las PSDs están enriquecidas en AMPAR y en otras proteínas de andamiaje requeridas para la transmisión sináptica y transducción de señales (23).

El tráfico de AMPAR desde y hacia la PSD es un mecanismo determinante que controla cambios en la eficacia sináptica (22), lo que se conoce como plasticidad sináptica. Dependiendo de la actividad neuronal y de las cascadas de señalización producidas, las sinapsis individuales pueden incrementar o disminuir la fuerza de su transmisión sináptica durante minutos, horas, días o hasta meses, por lo que estos cambios son considerados un modelo celular para los procesos de aprendizaje y memoria (24). En general, un incremento en el número y en la actividad de AMPAR en las sinapsis resulta en una potenciación de largo plazo (LTP) de la fuerza sináptica, mientras que una remoción de este receptor desde la sinapsis conduce a una depresión de largo plazo (LTD) (22). La disponibilidad de AMPAR en las PSDs está determinado por un balance entre la inserción y la remoción de estos receptores en las PSDs. Hay evidencia de que estos procesos son dinámica y estrechamente regulados por mecanismos de exocitosis, endocitosis y de difusión lateral desde el eje dendrítico hacia la PSD (25). Pero, **¿qué rol cumple dinamina-2 en estos procesos?** La primera evidencia de la participación de dinamina-2 en el tráfico de AMPAR fue reportada por Carroll et al., el año 1999. Estos autores demostraron que al inhibir la actividad GTP-asa de dinamina-2, sobre-expresando su mutante K44A incapaz de unir e hidrolizar GTP, se reducía de manera significativa la endocitosis del receptor AMPAR en neuronas hipocampales en cultivo (17), sugiriendo que dinamina-2 controla la internalización de AMPAR desde las PSDs. Una década más

tarde Jaskolski y colaboradores demostraron que dinamina-2 también regula la inserción de AMPAR hacia las PSDs.

Jaskolski et al. (23) demostraron que la exocitosis *de novo* de la subunidad GluR2 de AMPAR ocurre en el eje dendrítico y no directamente en las espinas por lo que los “nuevos AMPAR” deben difundir hacia las espinas mediante difusión lateral en la membrana. Ya que la topología de la espina restringe este movimiento los autores mostraron que la actividad GTP-asa de dinamina-2 es capaz de facilitar este proceso lo que sugiere fuertemente que dinamina-2 es un factor relevante que no sólo regula la remoción sino también la llegada de AMPAR a las PSDs.

En base a estos antecedentes es posible suponer que las mutaciones causantes de MCN-AD potencialmente afectarán estas funciones de dinamina-2 en la post-sinapsis y por lo tanto suponer que el tráfico de AMPAR está alterado en el contexto de la MCN-AD. Dada la importancia de AMPAR para la transmisión y plasticidad sináptica, estos mecanismos podrían explicar, al menos en parte, los defectos cognitivos descritos en pacientes con MCN-AD.

1.5 DINAMINA-2, REMODELAMIENTO DE ACTINA Y SU POTENCIAL IMPACTO EN LA FUNCIÓN SINÁPTICA

Los cambios funcionales que ocurren durante la plasticidad sináptica se atribuyen mayoritariamente a cambios en la actividad de AMPAR debido a un aumento en la inserción o remoción de éstos desde o hacia las PSDs (22). Sin embargo, existe también una “plasticidad estructural” que se asocia a cambios morfológicos de las sinapsis inducidos por actividad neuronal. Un aspecto relevante de la plasticidad sináptica estructural dice relación con cambios en el número, morfología y madurez de las espinas dendríticas (24). Múltiples estudios han demostrado que la inducción de LTP promueve la formación de nuevas espinas dendríticas e incrementa el volumen de las ya existentes, mientras que la inducción de LTD conduce a la contracción o desaparición de las espinas dendríticas (24). A lo largo de los años se ha especulado sobre la función principal de las espinas dendríticas, llegando a evidenciarse su importancia en el aumento del área de superficie para el incremento de la capacidad de recepción de señales, por lo que un mayor volumen de la

cabeza de la espina se asocia directamente a una mayor superficie de contacto con los terminales axónicos presinápticos y consiguientemente con un aumento de la eficacia sináptica (26). Bajo este contexto, podemos encontrar diferentes clasificaciones de espinas durante el desarrollo del sistema nervioso: tipo filopoidal (o “filopodio”), “thin”, “stubby”, “mushroom” y “branched” (FIGURA 2). Durante el desarrollo, las primeras protrusiones dendríticas en aparecer son las de tipo filopoidal, estas son altamente dinámicas y se consideran inmaduras, se caracterizan por ser largas y delgadas sin una subdivisión evidente de cabeza y cuello. Seguidas a estas se encuentran las espinas dendríticas de tipo “thin”, las cuales poseen un angosto cuello y una pequeña cabeza. Luego, con un fenotipo más maduro, se observan espinas dendríticas tipo “stubby”, estas son cortas y no es posible distinguir la constricción del cuello de la cabeza. En último lugar se encuentran las espinas dendríticas tipo “mushroom”, las cuales poseen una amplia cabeza con un cuello angosto. Además, de forma poco frecuente se pueden encontrar espinas dendríticas tipo “branched” en sinapsis más maduras, las cuales poseen múltiples cabezas en un mismo cuello (26,27).

Actina es la principal proteína del citoesqueleto en las espinas dendríticas, en donde sirve como un molde para la estabilidad mecánica de la estructura de la espina y como andamio para reclutar diversas proteínas de la PSD, incluido AMPAR. Actina existe en forma de monómeros globulares (G-actina) o en forma de filamentos (F-actina), formas que existen en equilibrio bidireccional modulado por proteínas de unión a actina (24). Estudios indican que las espinas dendríticas pueden contener al menos dos grupos diferentes de F-actina. En primer lugar, se cree que existe un conjunto dinámico debajo de la superficie de la espina que interactúa directa o indirectamente con AMPAR, NMDAR (receptor *N*-methyl-D-aspartate) y proteínas de señalización y andamiaje de la PSD. Un segundo grupo más interno y estable de F-actina puede servir como el andamio principal que sostiene la estructura general de la espina, donde han sido detectados filamentos estables de actina en el núcleo de la cabeza de la espina y el cuello de ésta (24).

La actividad GTP-asa de las dinaminas en general y de dinamina-2 en particular es un modulador clave de la dinámica del citoesqueleto de actina en distintos tipos celulares. Es así como dinamina-2 promueve la elongación, remodelamiento y estabilización de F-actina (14), sin embargo el mecanismo exacto que regula este proceso es poco entendido aún. Algunos estudios sugieren una interacción directa entre F-actina y dinamina en células del glomérulo renal (28). La sobre-expresión de la mutante de dinamina-2 K44A reduce de manera significativa la formación

de F-actina en los podocitos del glomérulo renal. Estas células contienen un citoesqueleto de actina muy organizado en las que una disminución en la expresión de dinamina-2 endógena, mediante un knock-down con RNA-interferentes específicos, resultó en células más pequeñas y menos redondeadas (28) recalcando la importancia de dinamina-2 para controlar la arquitectura celular que depende de actina.

Las mutaciones causantes de MCN-AD, ¿afectan la función de dinamina-2 como regulador del citoesqueleto de actina? A nivel muscular, se ha demostrado que las mutaciones de dinamina-2 asociadas a MCN-AD causan desorganización de la unión neuromuscular y del sarcómero en ratones y en músculo esquelético de pez cebra, así como fragmentación del túbulo T en músculos de *Drosophila melanogaster* (29–31). Además, se ha evidenciado que la actividad GTPasa de dinamina-2 es necesaria para inducir la polimerización de actina *de novo* así como para promover la inserción en membranas del transportador de glucosa GLUT4 en células musculares (14). La expresión de mutantes de dinamina-2 causantes de MCN-AD alteran estos mecanismos suprimiendo la formación de nueva actina e inhibiendo la inserción de GLUT4 en la membrana plasmática, sugestivo de defectos en el tráfico de receptores (14). Considerando que el citoesqueleto de actina es un regulador importante del tráfico intracelular y el papel clave que desempeña dinamina-2 en la regulación de éste a nivel muscular, es factible suponer que estos mecanismos se verán alterados en otros tejidos donde se expresen las mutaciones de dinamina-2 incluyendo el sistema nervioso central. Bajo este supuesto, la dinámica de actina y el tráfico de receptores que dependen del remodelamiento de F-actina podrían ser mecanismos afectados en el contexto de la MCN-AD. En particular el tráfico de AMPAR desde y hacia las PSDs, el cual es regulado por dinamina-2 (17,23) y por el citoesqueleto de actina sináptico (32) , podrían verse afectados en neuronas donde se expresen mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN-AD.

En base a lo anteriormente expuesto, a lo largo de esta tesis se evalúa el tráfico excitotóxico de AMPAR y la organización de actina neuronal en neuronas hipocampales en cultivo provenientes de un ratón knock-in (KI) para la mutación p.R465W en dinamina-2, único modelo mamífero de la MCN-AD.

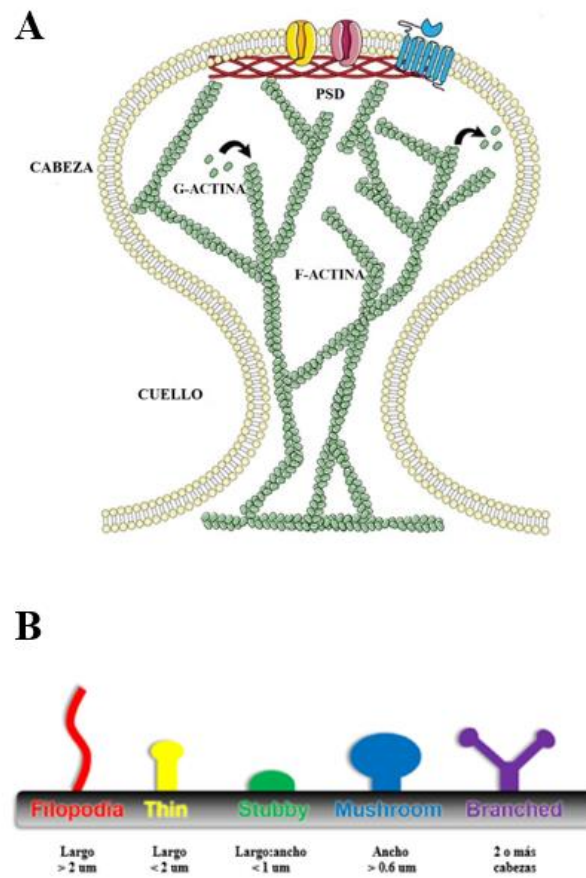


FIGURA 2. Ilustración de espina dendrítica. (A) En general, las espinas dendríticas se caracterizan por poseer cabeza y cuello en su forma madura, poseen una estructura dinámica de citoesqueleto de actina, donde G-actina polimeriza en F-actina, lo que permite la plasticidad sináptica. En la zona PSD se encuentran proteínas de unión a membrana con receptores que según requerimiento se insertan o remueven. Adaptada de Gipson and Olive 2017. (B) Clasificación de espinas dendríticas según morfología. Adaptada de Risher et al., 2014.

CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se ve afectada la exocitosis del receptor glutamatérgico de tipo AMPA y la estructura del citoesqueleto de actina en neuronas hipocampales de un modelo murino de miopatía centronuclear causada por mutaciones en dinamina-2?

2.2 HIPÓTESIS

Debido a que existe evidencia del rol clave que juega dinamina-2 en la exocitosis de proteínas de membrana y en el remodelamiento del citoesqueleto de actina en distintos tipos celulares, suponemos que las mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN-AD afectan la función de dinamina-2 sináptica y modifican la exocitosis del receptor AMPA y la organización de actina en neuronas hipocampales de un modelo murino de MCN-AD.

2.3 RELEVANCIA

A través de este proyecto se aporta un mayor entendimiento del rol de dinamina-2 en el sistema nervioso central y en sinapsis excitatorias, más específicamente de su rol en el tráfico de AMPAR y el remodelamiento del citoesqueleto de actina en espinas dendríticas. El escaso conocimiento que se tiene hasta el momento sobre los mecanismos asociados a defectos cognitivos en pacientes con Miopatía Centronuclear ligada a mutación en el gen DNM-2 implica que los resultados obtenidos en esta investigación aportan datos que permitirán un avance en la investigación hacia el conocimiento de los mecanismos moleculares que sustentan los defectos cognitivos y desórdenes del aprendizaje descritos en pacientes con MCN.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la mutación p.R465W en el gen DNMT2 sobre la exocitosis del receptor glutamatérgico AMPA y sobre la organización del citoesqueleto de actina en cultivos de neuronas hipocampales de ratón.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Comparar el **número y cinética de eventos espontáneos de exocitosis** del receptor **AMPA** entre neuronas hipocampales provenientes de ratones silvestres (**WT**) y neuronas hipocampales provenientes de ratones knock-in para la mutación **p.R465W (HTZ)**.

II. Comparar el número de espinas dendríticas teñidas con la toxina de unión a actina faloidina-rodamina-B entre neuronas hipocampales fijadas provenientes de ratones silvestres (**WT**) y neuronas hipocampales fijadas provenientes de ratones knock-in para la mutación **p.R465W (HTZ)** en condiciones basales y en condiciones de estimulación química para la inducción de **LTP**.

III. Comparar la morfología de las espinas dendríticas teñidas con la toxina de unión actina faloidina-rodamina-B entre neuronas hipocampales fijadas provenientes de ratones silvestres (**WT**) y neuronas hipocampales fijadas provenientes de ratones knock-in para la mutación **p.R465W (HTZ)** en condiciones basales y de estimulación química para la inducción de **LTP**.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE DISEÑO

Según la intervención del investigador, este estudio posee un tipo de diseño experimental, debido a que se interviene en las variables de estimulación de las muestras (condición basal y condición tras inducción de LTP química) y se analizan bajo parámetros de tipo analítico, ya que se contrastan los resultados de una variable en dos circunstancias distintas.

4.2 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Neuronas hipocampales de ratones WT o HTZ postnatales (P0 – P2) nacidos de una ratona HTZ para la mutación p.R465W en DNM2.

4.3 MUESTREO

El tipo de muestreo es no probabilístico por conveniencia, ya que el número total de ratonas preñadas es dependiente del resultado entre las cruzas por disposición del bioterio, y los ratones postnatales varían en número y genotipo dependiendo de cada camada.

4.4 TAMAÑO MUESTRAL

Con fines de esta investigación se utiliza la “Ecuación de Recursos” proporcionada por el Centro Nacional de Refinamiento, Reemplazo y Reducción de Animales para la Investigación de Reino Unido, planteada en la aprobación de investigación que involucre a animales como sujetos de investigación” del proyecto Fondecyt 11180731, aprobada por CICUAL.

E = (N° de experimentos por condición) x (N° de condición) - N° de condición. Siendo E el número de animales a utilizar con un valor razonable de entre 10-20.

Considerando 4 experimentos por condición como mínimo para que los resultados del experimento sean significativos, y considerando que el número de condiciones experimentales a analizar es 4 (neuronas de ratones WT en estado basal, neuronas de ratones HTZ en estado basal, neuronas de ratones WT tras inducción de LTP química y neuronas de ratones HTZ tras inducción de LTP química.), nuestro **n es de 12 animales (3 por cada condición experimental).**

En el presente estudio se trabajó con un total de 10 ratones post-natales de P0-P2, de los cuales 2 fueron WT Y 8 HTZ. Por lo que se requiere repetir al menos un cultivo para aumentar el tamaño muestral para ratones WT según el diseño.

Para todos los análisis realizados las comparaciones son dadas en base al **número de neuronas** analizadas para cada objetivo.

4.5 VARIABLES

- **Presencia o ausencia de mutación en DNM-2:** Es una variable categórica nominal, se obtiene mediante genotipificación. Se tendrán ratones WT: (“Wild type”, ratón tipo silvestre, sin mutación.) y ratones HTZ (ratón con mutación heterocigota p.R465W para DNM-2).
- **Estados de estimulación:** Es una variable categórica nominal, ya que se tendrán dos condiciones: Condición basal (estado de reposo, sin estimulación) e Inducción de LTP química (estado de estimulación de plasticidad sináptica con potenciación a largo término).

Tráfico de AMPAR:

- **Número de eventos:** Número de eventos de exocitosis de AMPAR. Es una variable cuantitativa de razón, que en esta investigación tomará valores numéricos continuos y es medida mediante microscopía TIRF y analizada por el software *Mac Biophotonics ImageJ*. Los resultados se expresarán en forma de gráficos.
- **Cinética de eventos:** Tiempo de permanencia de AMPAR en membrana plasmática. Es una variable cuantitativa de razón, que en esta investigación tomará valores numéricos continuos evaluados segundos (s), es medida mediante microscopía TIRF y analizada por el software *Mac Biophotonics ImageJ*. Los resultados se expresarán en forma de gráficos

Remodelamiento del citoesqueleto de actina:

- **Número de espinas dendríticas:** Es una variable cuantitativa de razón, que en esta investigación tomará valores numéricos continuos y es medida mediante microscopía confocal con uso de faloidina-rodamina-B y analizada por el software *Mac Biophotonics ImageJ*. Los resultados se expresarán en forma de gráficos.

- **Morfología de espinas dendríticas:** Es una variable categórica nominal, en la cual se encontrarán cuatro tipos de espinas dendríticas: “filopodio”, “thin”, “stubby” y “mushroom”, las cuales serán visualizadas mediante microscopía confocal con uso de faloidina-rodamina-B y analizadas por el software *Mac Biophotonics ImageJ*. Los resultados se expresarán en forma de gráficos.

4.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión:

- Neuronas hipocampales de ratones postnatales vivos nacidos de ratonas hembras heterocigotas para el gen p.R465W los que podrán tener el genotipo WT o HTZ.

Criterios de exclusión:

- Cultivos de neuronas hipocampales contaminadas con bacterias.
- Cultivos de neuronas hipocampales que no hayan cumplido con los requisitos de incubación (por ejemplo, si hay fallas en el incubador en el que se mantienen).
- Neuronas en las que no sea visible el núcleo mediante microscopía.
- Neuronas degeneradas.

4.7 FUENTES Y MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Este trabajo de investigación fue realizado en las dependencias del Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, ubicado en el edificio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, Gran Bretaña 1111, Valparaíso.

Los objetivos planteados se llevaron a cabo a partir de neuronas cultivadas desde ratones postnatales de un modelo murino de MCN que expresa la mutación p.R465W en DNM-2 los que son comparados con su contraparte-WT. Estos animales se encuentran en el Bioterio de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

El background genético de las hembras y de las crías a utilizar es C57-BL6

- Para conocer la presencia/ausencia de la mutación del gen de la dinamina-2 en las neuronas hipocampales, se realiza genotipificación a cada ratón postnatal y cultivos separados por cada uno.
- Cada cultivo tiene un número propio correlativo a la cantidad y su número de camada.

Como registro y análisis de resultados se utilizan los siguientes equipos y softwares:

- Los eventos y cinética de los eventos de exocitosis de AMPAR son registrados bajo microscopía de TIRF y son analizados posteriormente con el software *Mac Biophotonics ImageJ*. La exocitosis de AMPAR es visualizada como puntos fluorescentes que aparecen en el campo evanescente y son registrados con el software de adquisición NIS-ELEMENT de NIKON. La exocitosis se analiza en condiciones basales (sin estímulo).
- La densidad de espinas dendríticas y su morfología se visualiza mediante microscopía confocal y para el análisis se utiliza el software *Mac Biophotonics ImageJ*. La morfología de las espinas dendríticas es clasificada de acuerdo con los criterios descritos por Risher et al. (2014).

4.8 PROCEDIMIENTOS

A continuación, se presenta la serie de procedimientos que permiten llevar a cabo los objetivos planteados en el problema de investigación y, por ende, dar respuesta a la pregunta de investigación e hipótesis a través del análisis posterior de resultados.

4.8.1 Cultivo celular de neuronas hipocampales

El cultivo primario de neuronas hipocampales permite realizar estudios morfológicos y funcionales bajo diferentes condiciones experimentales. Los ratones se encuentran en el Bioterio de la Escuela de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso ubicada en calle Hontaneda N°2664, edificio Bruno Günther, a cargo del veterinario Enzo Seguel. Se utilizan ratones post natales (P0-P2), los cuales fueron decapitados bajo estrictas normas de bioética siguiendo protocolos aprobados en el acta BEA 131-18 por el COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO UV (CICUAL-UV).

A cada ratón se le extrae el cerebro, se aísla el hipocampo bajo lupa posteriormente y se realiza cultivo primario con ellos, cada ratón por separado según el protocolo de Beaudoin, et al., 2012 (33) . Se guarda un pequeño segmento de cola de cada ratón, el cual es debidamente etiquetado para posteriormente aislar DNA genómico y genotipificar. Detalles en el Anexo N°1.

4.8.2 Inmunofluorescencia

La inmunocitoquímica nos permite evidenciar diferencias estructurales entre las neuronas hipocampales HTZ y WT. Con fin de este estudio, se utilizan anticuerpos contra proteínas específicas como: Map2 para evidenciar dendritas, Tau para evidenciar axón, PSD95 para destacar la densidad post sináptica, y la sonda fluorescente Faloidina-rodamina-B para evidenciar el citoesqueleto de actina. El anticuerpo secundario a utilizar está marcado con sonda fluorescente, por lo que los resultados podrán verse a través de microscopía confocal. Detalles del procedimiento en el Anexo N° 2.

4.8.3 Transformación de Bacterias competentes

Para poder amplificar el DNA requerido para la transfección de las neuronas hipocampales con el constructo GLUR1-SEP, se debe realizar transformación bacteriana para que estas últimas expresen el constructo resistente a antibiótico y crezcan en condiciones específicas y estériles. Una vez crecidas las bacterias (bacterias competentes) se procede a la extracción y purificación del DNA. Para este estudio se utiliza el constructo GluR1-SEP como reportero de la exocitosis de AMPAR. Los constructos fueron adquiridos en la plataforma *Addgene*. Detalles del proceso en el Anexo N° 3.

4.8.4 Extracción de DNA

La extracción de DNA desde las bacterias competentes se realiza a través del kit comercial de E.Z.N.A Endo-Free Plasmid DNA Mini Kit Protocols. Detalles del protocolo en el Anexo N° 4.

4.8.5 Transfección por lipofección

Para abordar los objetivos en relación a la exocitosis de AMPAR, se transfectan neuronas hipocampales en cultivo a los 5 días *in vitro* (*DIV*) con el constructo GluR-1 (subunidad de AMPAR)-SEP mediante el reactivo Lipofectamina 2000 y 48 h posterior a la transfección (*7DIV*) las células eficientemente transfectadas son registradas mediante microscopía TIRF. Detalles del protocolo de transfección en el Anexo N° 5.

4.8.6 Microscopía Confocal

Microscopía de fluorescencia que permite tomar fotografías de distintos planos focales de una muestra en el plano z. La muestra a visualizar se excita con un láser de distinta longitud de

onda dependiendo del fluoróforo de interés. Bajo este microscopio se toman registros de los cultivos celulares a los que se les realice inmunocitoquímica fluorescente. La organización de actina se visualiza mediante la tinción con la toxina de unión a F-actina faloidina-fusionada a la sonda fluorescente rodamina-B.

Las especificaciones del microscopio confocal utilizado en esta tesis son las siguientes: imagen adquirida por upright Eclipse Nikon 80i, utilizando aceite de inmersión, objetivo de 60x (N.A 1.3), imágenes aisladas son adquiridas por el software EZ-C1 (Nikon) con una resolución de 1024×1024 píxeles, analizado y procesado por software *Mac Biophotonics ImageJ* (NIH, USA).

Para estimular los fluoróforos verdes (AF-488 /CY2) se usa el láser de Argon 488 nm con filtros de absorción de 515/30, para estimular DAPI (marcador de núcleos), se utiliza el láser Diodo Violeta con filtro de emisión de 450/35, y para estimular los fluoróforos rojos (CY3/AF555/RODAMINA-B/) se utiliza láser He-Ne 543 nm con filtros de emisión 605/75.

4.8.7 Microscopía TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

Microscopía de excitación de fluoróforos en una delimitada zona en la interfase entre el vidrio y una célula adherida a él, por lo que se visualizan de manera eficiente eventos en la cercanía de la membrana plasmática, siendo este tipo de microscopía muy utilizado para el estudio de eventos de exocitosis en las células, así también como para etapas tardías del ciclo vesicular como tráfico, docking y fusión (34). Las neuronas transfectadas con GluR-1-SEP son monitoreadas bajo este microscopio, y se obtienen videos e imágenes que son analizadas bajo software. Los eventos de exocitosis son monitoreados en neuronas hipocampales transfectadas con un constructo de la subunidad GluR1 de AMPAR fusionado a una variable sensible a pH de la proteína fluorescente verde (GFP) denominada fluorina super-ecliptica (SEP). SEP no fluoresce cuando está en un ambiente ácido como el lumen de las vesículas que las transportan (pH 5.5), mientras que su fluorescencia aumenta significativamente en un ambiente neutro/alcalino como el medio extracelular (pH 7.4). Por lo tanto, cuando GluR1-SEP se inserta en la membrana plasmática producto de la exocitosis del receptor AMPAR se produce un pico de fluorescencia cuya intensidad y cinética es medible y entregan información del número de eventos de exocitosis de AMPAR

(inserción del receptor en membrana) y de las características cinéticas de esos eventos (tiempo que el receptor permanece en membrana).

Las especificaciones técnicas del microscopio TIRF a utilizar en este trabajo de investigación son las siguientes: TIRF microscopy (Nikon Eclipse Ti-E), usando un objetivo 60×/1.49 NA Plan APO TIRF (Nikon), Surface Reflective Interference Contrast (SRIC; NIKON). La resolución es de 16-bit imágenes 960 × 720 píxeles, adquirido por NIS-Element viewer 4.3 software.

Para estimular los fluoróforos de SEP (GFP) se utiliza el láser 488 a una potencia del 10%.

4.8.8 Genotipificación y PCR

Se extrae DNA desde la cola de cada ratón post-natal para la genotipificación de cada animal utilizando kits comerciales (Thermo Fischer, 182001). Mediante primers específicos capaces de detectar los alelos WT (peso molecular de 445 pares de bases) y mutante p.R465W (533 pares de bases) de dinamina-2 se asegura si los ratones corresponden o no al genotipo HTZ, y por tanto es posible reconocer cada cultivo celular. Detalles del protocolo en Anexo N° 6.

4.9 PLAN DE ANÁLISIS

Resultados obtenidos a través de microscopía TIRF son analizados bajo el software *Mac Biophotonics ImageJ*, mediante el cual se evalúa el número y duración de eventos de exocitosis captados en video de forma manual. Para esto se realiza un análisis de cada neurona de forma individual en las cuales se seleccionan regiones de interés (ROI) de procesos neuríticos, para una posterior visualización de eventos mediante quimógrafo, herramienta que muestra en un solo plano los peaks de fluorescencia distinguibles en un video de varios segundos con gráficos de datos de intensidad de fluorescencia y duración de cada evento. Los eventos considerados como exocitosis de AMPAR en éste trabajo son aquellos que aumentan 3 veces en relación al promedio de la desviación estándar (la cual es calculada con 3 spots por condición (WT y HTZ). De acuerdo con

esto, el promedio de la desviación estándar es de 0.1, razón por la cual fueron considerados los eventos con un peak de fluorescencia mayor a 1.3, teniendo como referencia una línea de base en el punto 1 del gráfico. Una vez que se seleccionan los eventos, se calculan la cantidad de eventos por μm^2 dentro de cada ROI analizado (segmentos dendríticos) para tener una visión general de los eventos en cada neurona. De acuerdo con el número de muestras y la distribución de los datos las variables se analizan mediante Mann-Whitney test, variante no paramétrica de la prueba de t de Student.

Resultados obtenidos a través de microscopía confocal se analizan bajo el software *Mac Biophotonics ImageJ* evaluando la cantidad de espinas y su morfología. Para esto se seleccionan manualmente 3 regiones de interés (ROI) por neurona, considerando aquellas regiones en las que se visualizan dendritas aisladas cercanas al soma neuronal. Posterior a esto, se hace el recuento de espinas dendríticas por ROI y se clasifican morfológicamente según criterios de Risher et al., (2014) en 4 tipos de espinas dendríticas: “filopodio”, “thin”, “stubby” o “mushroom” (35).

Para la densidad de las espinas, de acuerdo con el número de muestras y la distribución de los datos las variables se analizan mediante Mann-Whitney test, variante no paramétrica de la prueba de t de Student para 2 grupos y mediante prueba de Kruskal-Wallis, método no paramétrico para 3 o más grupos. Para la morfología de las espinas se presentan datos mediante gráfico de porcentaje de torta.

4.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación cuenta con la aprobación de CICUAL-UV (acta de aprobación BEA131-18 “Role of dynamin-2 in central nervous systems synapses: potential impact of centronuclear myopathy-causing mutations on AMPA-receptor trafficking and excitatory synaptic transmission”), de la investigadora responsable Dra. Arlek González Jamett.

Principio de No Maleficencia

El bioterio donde se encuentran los animales posee una habitación especialmente destinada a ratones con control de temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con acceso *ad-libitum* al agua y alimento y con un ciclo fijo de luz/oscuridad de 12 por 12 horas. Los animales se mantienen en cajas separadas, debidamente etiquetadas las que se encuentran en racks ventilados, con un máximo de 4 ratones por caja. En todo lo que dura la investigación se mantendrán al menos dos cajas con reproductores (2 hembras y 1 macho por caja) para efectos de cruce y mantención de la cepa. Las hembras preñadas son separadas del macho. Al destete (21 días) los ratones son identificados mediante perforaciones en las orejas siguiendo un código numérico y del tejido resultante de esas perforaciones se extrae DNA para la genotipificación de cada animal. La investigadora a cargo de este proyecto semanalmente evalúa aspectos como: el peso, el pelaje, presencia de heridas o secreciones anormales y temperatura corporal, ésta última es monitoreada utilizando un termómetro infra-rojo digital tipo “pistola”. Se evalúa además el comportamiento espontáneo (movilidad) y el comportamiento frente a la manipulación de los animales. Los ratones postnatales son trasladados desde el bioterio a los laboratorios en los que se desarrollaran los objetivos propuestos. Para el traslado de los animales al Centro Interdisciplinario de Neurociencias (cultivos primarios) los animales son transportados en jaulas ventiladas en un vehículo contratado para dicho efecto el que deberá contar con aire acondicionado que permita mantener la temperatura del vehículo a unos 24°C constantes durante lo que dure el traslado (15 minutos). Una vez en sus laboratorios de destino los ratones son decapitados rápidamente con tijeras estériles bajo estrictas normas de bioética para la consiguiente extracción de tejido hipocampal para el cultivo neuronal y el desarrollo de las distintas metodologías experimentales.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

Cantidad y duración de los eventos espontáneos de exocitosis de AMPAR en neuronas hipocampales en cultivo

El primer paso fue evaluar si es que la mutación p.R465W en dinamina-2 afecta el tráfico excitotico de AMPAR en neuronas del modelo murino de MCN. Neuronas hipocampales cultivadas a partir de ratones neonatos WT y HTZ fueron mantenidas durante 5 días *in vitro* (DIV) y fueron transfectadas con un constructo que expresa la subunidad GluR1 de AMPAR fusionada a la variante de GFP sensible a pH fluorina–super-ecliptica (SEP). 48 horas después (7 DIV) las neuronas eficientemente transfectadas fueron visualizadas por microscopía de TIRF (TIRFM) para la visualización de eventos de exocitosis de AMPAR espontáneos (sin inducir estimulación). Mientras GluR1 viaja en vesículas hacia las membranas superficiales la sonda SEP permanece “apagada” debido al pH ácido intra-vesicular (36). Cuando GluR1 se inserta en la membrana SEP entra en contacto con el pH extracelular aumentando varias veces su intensidad de fluorescencia por lo que los eventos de exocitosis de AMPAR son visualizados como “puntos brillantes” que se encienden y apagan rápidamente en el campo evanescente del TIRFM (36) (FIGURA 3, A). El perfil de fluorescencia de esos eventos y su duración son cuantificables y entregan información acerca del número de eventos de exocitosis de AMPAR (inserción del receptor en membrana) y de las características cinéticas de esos eventos (tiempo que el receptor permanece en membrana) (FIGURA 3, B).

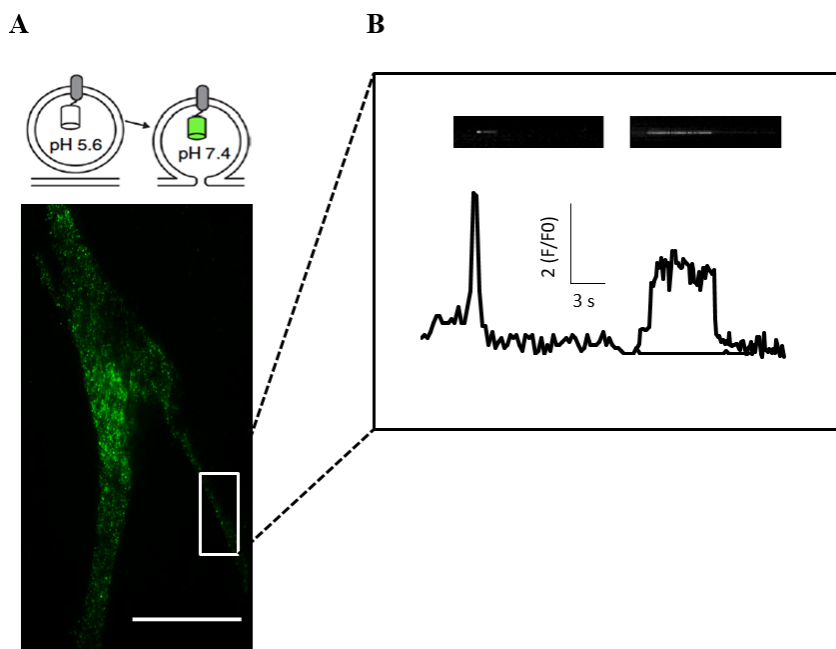


FIGURA 3. Constructo SEP. (A) (Arriba) Esquema del funcionamiento de constructo SEP sensible a pH (Adaptada de Martineau et al., 2017 “Semisynthetic fluorescent pH sensors for imaging exocytosis and endocytosis”). (Abajo) célula HT22 línea celular neuronal representativa transfectada con SEP. (B) Perfiles representativos de eventos de exocitosis captados en neuronas transfectadas con SEP.

Para cada registro, las neuronas fueron monitoreadas durante 60 segundos en 500 uL de medio extracelular Tyrode (pH 7.4) a temperatura ambiente. Para estimular a la sonda SEP se utilizó un láser de excitación de una longitud de onda de 488 nm a una potencia del 10%. Para el análisis se utilizó el software *Mac Biophotonics ImageJ*, el cual a través de un quimógrafo nos muestra el perfil de cada evento de fluorescencia (FIGURA 4, A).

Cabe destacar que los datos de la genotipificación de las muestras se conocen posterior al análisis para la imparcialidad de los resultados, por este motivo la cantidad de neuronas analizadas en ambos genotipos difiere según camada.

Debido a la diferencia del número de datos entre neuronas WT y HTZ, los resultados de la comparación entre el número de eventos obtenidos según el test estadístico Mann-Whitney test son no significativos, sin embargo, se logra observar una tendencia de las neuronas de ratones HTZ

(n=11; 0.02 ± 0.009) a presentar una menor cantidad de eventos espontáneos de exocitosis de AMPAR por micra cuadrada en comparación a la cantidad de eventos observados en neuronas WT (n=3; 0.128 ± 0.125) (FIGURA 4, B).

En cuanto al tiempo medio de duración de los eventos espontáneos de exocitosis observados, se realizó un promedio por neurona de los eventos registrados por genotipo y posteriormente se analizaron mediante Mann-Whitney test, dando como resultado una diferencia no significativa entre los tiempos de duración de los eventos. Sin embargo, las neuronas WT presentan eventos de exocitosis con un promedio de duración media de 3.99 ± 2.16 segundos mientras que en neuronas del genotipo HTZ los eventos de exocitosis de AMPAR muestran una duración media de 2.35 ± 0.57 segundos (FIGURA 4, C). Estos datos sugieren que los receptores glutamatérgicos AMPAR llegan menos (FIGURA 4, B) y permanecen menos tiempo (FIGURA 4, C) en la membrana plasmática de las neuronas hipocampales provenientes de ratones HTZ comparado con lo que ocurre en neuronas cultivadas a partir de ratones WT de la misma camada. Ya que el tráfico de AMPAR es uno de los mecanismos determinantes de la eficiencia de la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria en mamíferos (22) estos resultados podrían ser indicativos de que en la MCN-AD causada por mutaciones en dinamina-2 la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria son mecanismos defectuosos.

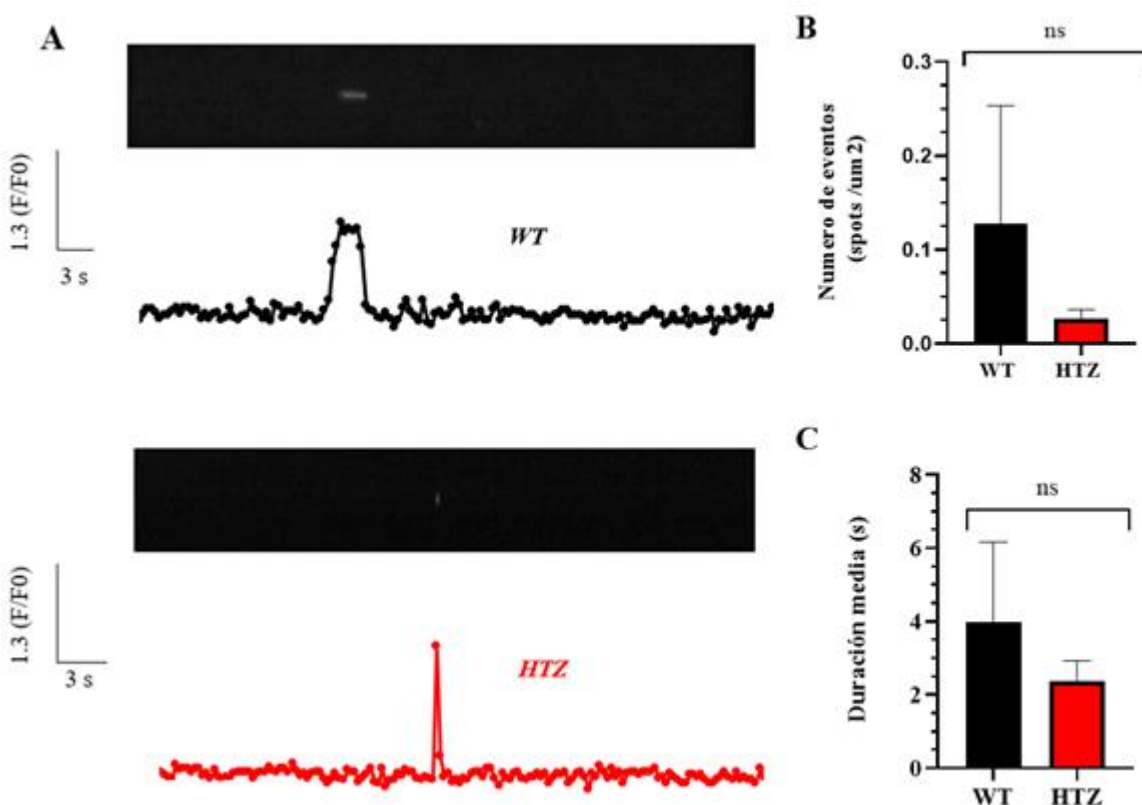


FIGURA 4. Los eventos espontáneos de excitación de AMPAR tienden a ser menos y de menor duración en neuronas de ratones HTZ (A) (arriba) Evento típico de excitación de AMPAR en neuronas WT con su respectivo quimógrafo en condición basal. (Abajo) Evento típico de excitación de AMPAR en neuronas HTZ con su respectivo quimógrafo en condición basal. Nótese la diferencia de la duración del peak entre ambos genotipos. (B) Número de eventos de excitación de AMPAR por neuronas WT y HTZ en condición basal. (Mann-Whitney Test; WT n=3, MEAN±SEM = 0.128±0.125; HTZ n=11, MEAN±SEM = 0.02±0.009; P value < 0.05 = 0.9313). (C) Duración media de eventos de excitación de AMPAR por neurona WT y HTZ en condición basal. (Datos no paramétricos; Mann-Whitney Test; WT n=2, MEAN±SEM = 3.99±2.16; HTZ n=9, MEAN±SEM = 2.35±0.57; P value < 0.05 = 0.43). Nótese la disminución en la duración media de los eventos en neuronas HTZ comparado con neuronas WT.

Tendencia a una menor densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales de ratones HTZ

Considerando que la densidad y morfología de las espinas dendríticas es otro importante factor que modula la transmisión sináptica y su plasticidad (24), el siguiente paso fue visualizar la estructura sináptica en neuronas hipocampales en cultivo provenientes de ratones neonatos WT y HTZ. Debido a que las espinas dendríticas son protrusiones enriquecidas en actina (24) y debido a que la organización y remodelamiento de actina es un mecanismo afectado en el contexto de la MCN-AD en los ratones HTZ (14) marcamos la estructura sináptica con la toxina de unión a actina faloidina-rodamina-B y con un anticuerpo específico contra la proteína PSD95 para marcar densidades postsinápticas en neuronas hipocampales de 7 *DIV* fijadas. Lo anterior se evaluó en neuronas en condición basal (resting) y en neuronas estimuladas con un protocolo capaz de inducir químicamente una potenciación a largo plazo (ch-LTP) de la estructura sináptica. Brevemente, para la inducción de ch-LTP las neuronas se pre-estimularon con una solución extracelular Tyrode sin Mg^{2+} (para favorecer la activación de NMDAR) durante 20 minutos; luego la solución se reemplazó por Tyrode sin Mg^{2+} en presencia de 600 μM del agonista de NMDAR Glicina, durante 20 minutos y finalmente se dejó a las neuronas realizar la “plasticidad estructural” durante 45 minutos en solución Tyrode normal, en presencia de Mg^{2+} (Adaptado de Molnár, 2011 (37)). Detalles del protocolo en Anexo N°7. Luego, las neuronas estimuladas fueron fijadas y teñidas con faloidina y PSD95 para su visualización por microscopia confocal (FIGURA 5). La densidad promedio de espinas dendríticas por cada micra de eje dendrítico es de 0.19 ± 0.03 en neuronas WT en condiciones de reposo y como es de esperar existe una tendencia a un aumento en la densidad de espinas 0.24 ± 0.03 luego de la inducción de ch-LTP, aunque esa diferencia no alcanzó la significancia estadística. Sin embargo, las neuronas HTZ no muestran ninguna tendencia a modificar su densidad de espinas dendríticas luego de inducida la ch-LTP y en ambas condiciones (resting 0.18 ± 0.03 y ch-LTP 0.16 ± 0.02) las neuronas HTZ muestran una menor densidad de espinas dendríticas que su contraparte WT (FIGURA 6, B).

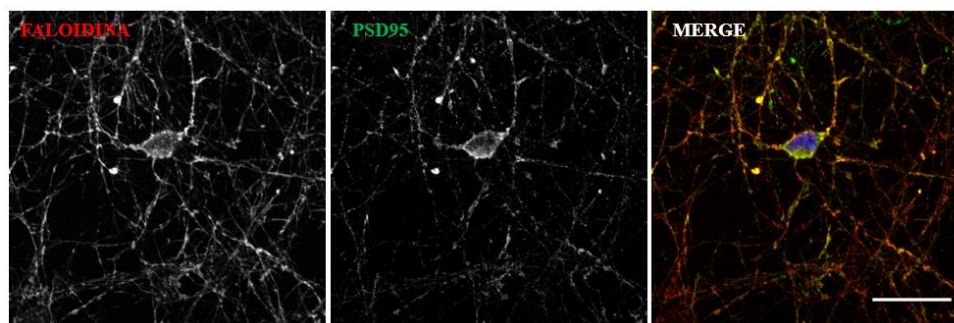


FIGURA 5. *Inmunofluorescencia neuronas 7 DIV.* Imagen representativa de neuronas WT a los 7 DIV marcadas con faloidina (rojo) para citoesqueleto de actina y anticuerpo anti-PSD95 (verde) para marcar densidades post-sinápticas. Barra de escala= 20 μ m.

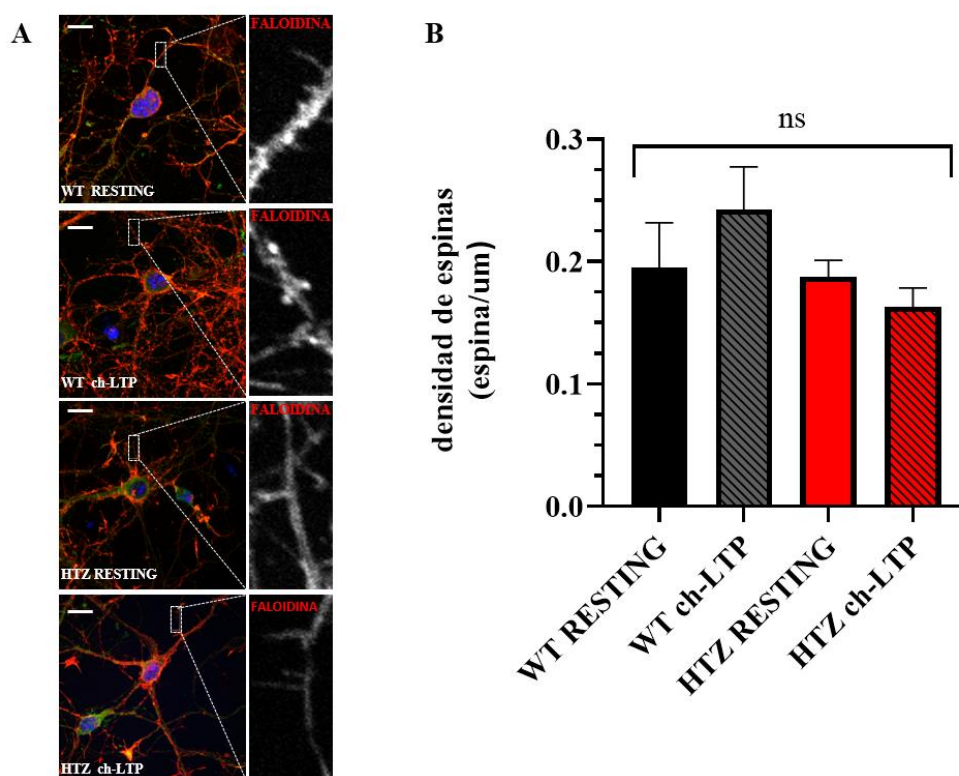


FIGURA 6. *La densidad de espinas dendríticas tiende a ser menor en neuronas HTZ que en neuronas WT a los 7 DIV (A)* Imágenes representativas de neuronas y segmentos dendríticos (amplificados) para cada condición experimental. **(B)** Densidad promedio de espinas dendríticas por neurona. (Kruskal-Wallis Test. WT resting $n=6$, $MEAN \pm SEM = 0.19 \pm 0.03$; WT LTP $n=7$, $MEAN \pm SEM = 0.24 \pm 0.03$; HTZ resting $n=18$, $MEAN \pm SEM =$

0.18 ± 0.03; HTZ LTP n=16, MEAN±SEM = 0.16 ± 0.02; P value <0.05 = 0.3989). Nótese la tendencia a una menor densidad de espinas dendríticas en neuronas HTZ estimuladas con ch-LTP en comparación con neuronas WT en las mismas condiciones. Los datos presentan distribución no paramétrica (las diferencias no alcanzan la significancia estadística). Barra de escala= 10 um.

Para evaluar si en neuronas con mayor madurez sináptica se mantienen estas tendencias, realizamos los mismos experimentos en neuronas cultivadas durante 14 *DIV*, en las cuales se espera que exista mayor conectividad, madurez y funcionalidad de las sinapsis (27). De hecho, nuestros propios resultados muestran que al comparar neuronas WT de 7 y 14 *DIV* inmuno-teñidas con anticuerpos contra MAP2 para marcar dendritas y con anticuerpos contra Tau para marcar axones, las últimas muestran una mayor arborización dendrítica y conectividad entre neuronas (FIGURA 7).

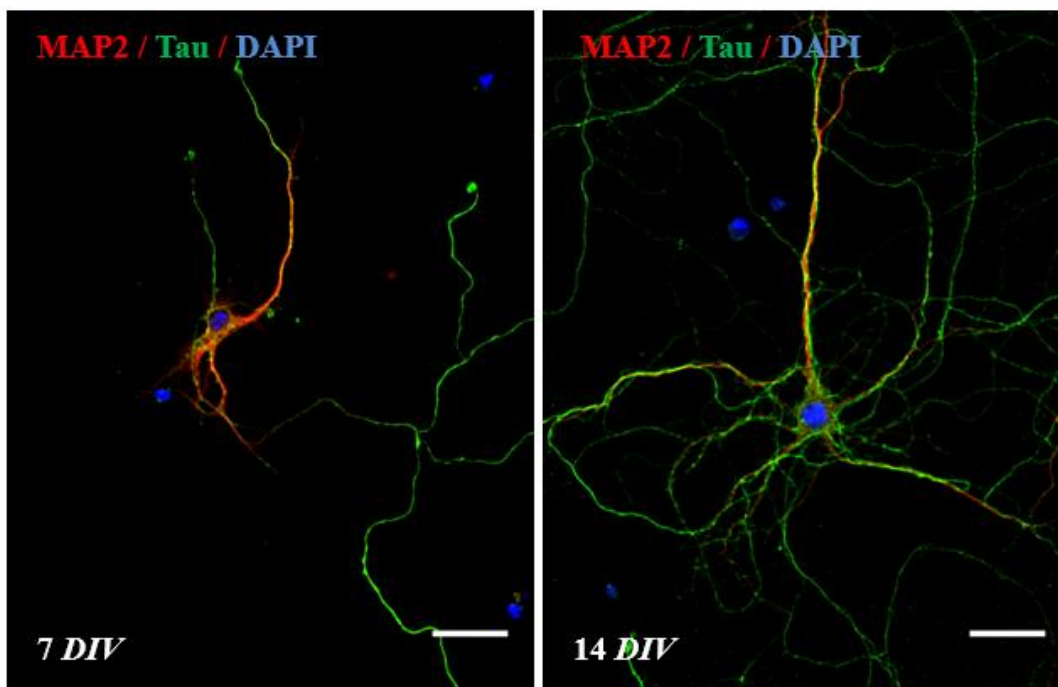


FIGURA 7. *Imagen representativa de neuronas WT a los 7 DIV y 14 DIV. Marcadas con anticuerpo anti-MAP2 (rojo) para dendritas y anti-Tau (verde) para axones. Nótese la diferencia en arborización dendrítica y conectividad con otras neuronas. Barra de escala= 10 μ m.*

Respecto a la densidad de espinas entre neuronas de ratones WT y HTZ de 14 DIV no se logró observar una diferencia significativa en el número de espinas entre ambos genotipos (0.1 ± 0.01 y 0.09 ± 0.01 respectivamente) (FIGURA 8, B) aunque existe una pequeña tendencia a que este valor sea menor en neuronas HTZ.

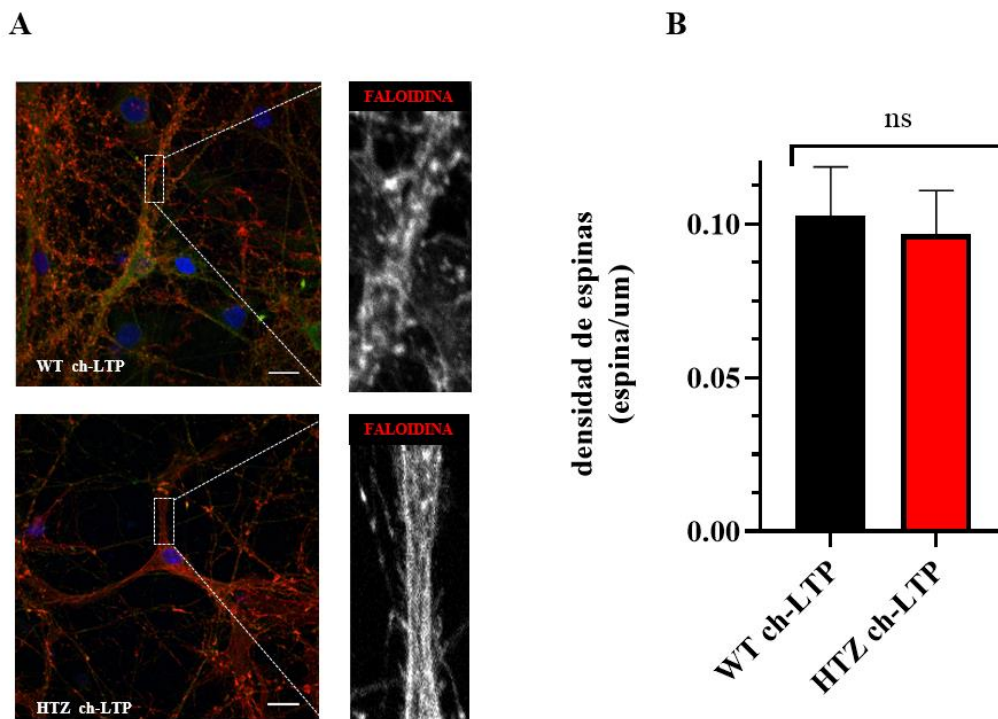


FIGURA 8. Densidad de espinas dendríticas en neuronas WT y HTZ de 14 DIV en ch-LTP. (A) Imágenes representativas de segmentos dendríticos para cada condición experimental. (B) Densidad de espinas promedio por neurona. (Mann-Whitney Test; WT LTP $n=3$, $MEAN \pm SEM = 0.1 \pm 0.01$; HTZ LTP $n=10$, y $MEAN \pm SEM = 0.09 \pm 0.01$; P value $< 0.05 = 0.9$) Los datos presentan distribución no paramétrica (las diferencias no alcanzan la significancia estadística). Barra de escala = 10 μm .

Las espinas dendríticas de neuronas HTZ muestran una morfología inmadura en comparación a las WT

Para evaluar si la morfología de las espinas dendríticas, la cual es un indicador de su madurez y funcionalidad (26), se encuentra afectada en neuronas de ratones HTZ se utilizó la misma metodología descrita anteriormente. El análisis se realizó con el software *Mac Biophotonics ImageJ* y la clasificación morfológica de las espinas dendríticas se hizo según criterios descritos por Risher et al. (2014) (35) en “filopodio”, “thin”, “stubby” o “mushroom”.

Tras el análisis, en neuronas HTZ se pudo evidenciar una gran cantidad de protrusiones dendríticas de tipo “filopodio” tanto en condición ch-LTP (43.58%) como en condición reposo (42.88%) a los 7 DIV, morfología que se corresponde con una forma inmadura en las espinas dendríticas (26,27). Por otro lado, en neuronas WT de 7 DIV en condición reposo se logra distinguir con mayor abundancia espinas dendríticas tipo “stubby” (63.45%), las cuales aumentan tras el estímulo ch-LTP (73.25%) y corresponden a la clasificación de espinas maduras (26,27) (FIGURA 9).

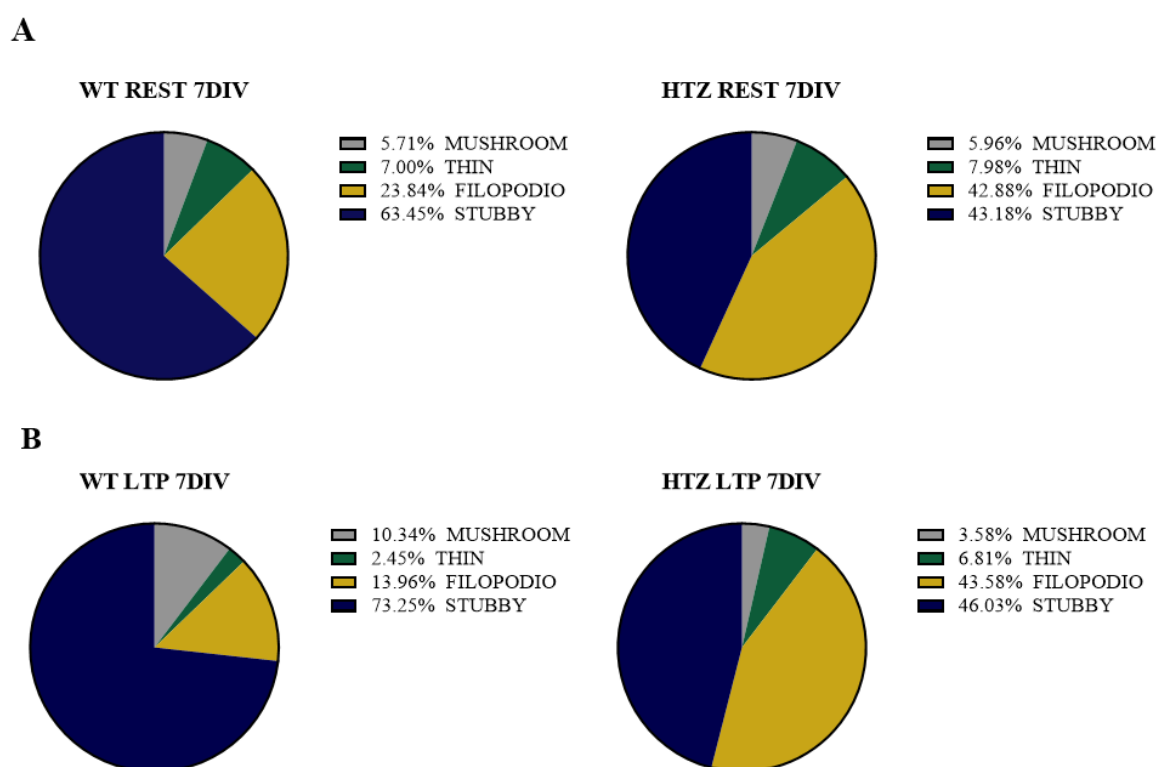


FIGURA 9. Distribución de la morfología de las espinas dendríticas por neurona de 7 DIV para cada condición experimental. (A) Distribución de morfología de espinas en neurona WT y HTZ en condición basal (rest). (WT REST n=6; HTZ REST n=18). (B) Distribución de morfología de espinas en neurona WT y HTZ en ch-LTP. (WT LTP n= 7; HTZ LTP n=16). Nótese que en neuronas HTZ estimuladas con ch-LTP las protrusiones inmaduras tipo filopodio son las más abundantes y esto no es distinto de la condición HTZ basal. En las neuronas WT en reposo abundan las espinas tipo stubby (cercanas a las mushroom en madurez y funcionalidad) y su porcentaje aumenta en respuesta al estímulo ch-LTP.

Respecto a esto, también se analizaron neuronas WT y HTZ en condición ch-LTP a 14 *DIV* para evaluar diferencias debido a la mayor madurez sináptica que presentan las neuronas en cultivo en este estadio (FIGURA 10). En neuronas HTZ, se observa predominancia de espinas dendríticas de tipo “stubby” (37.71%) y “filopodio” (35.01%) casi en la misma relación, a las que le sigue las de tipo “thin” (21.04%) y finalmente en menor proporción las de tipo “mushroom” (6.24%). En cuanto a neuronas WT, se evidenció una amplia predominancia de espinas dendríticas tipo “stubby” (73.33%), a las que le siguen en notable menor proporción las de tipo “filopodio” (14.44%), “mushroom” (8.89%) y por último “thin” (3.33%). Por tanto, estos resultados muestran una mayor proporción de espinas dendríticas inmaduras en ratones HTZ comparados a ratones WT a los 14 *DIV* igual que a los 7 *DIV*, lo que sugiere que en el contexto de la MCN-AD, la estructura sináptica es inmadura y disfuncional lo que podría explicar los defectos cognitivos descritos en pacientes.

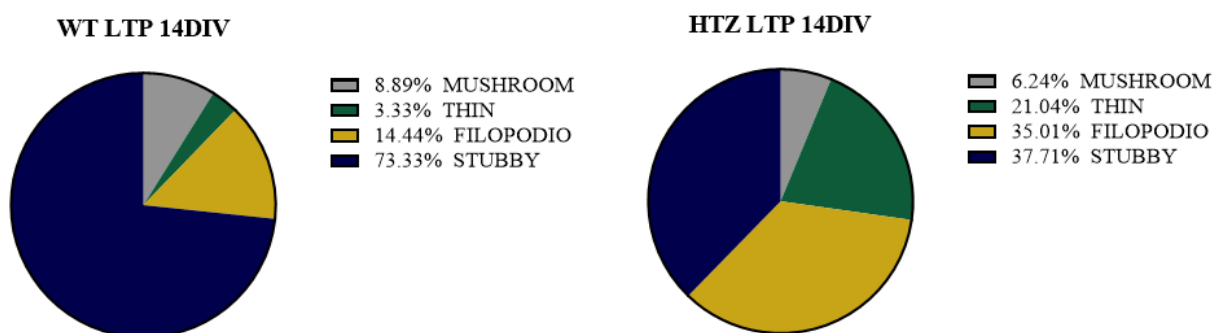


FIGURA 10. Distribución de la morfología de las espinas dendríticas en neuronas WT y HTZ de 14 DIV en condición ch-LTP. Nótese que en neuronas HTZ si bien se observa un aumento de espinas de tipo stubby, sigue existiendo una gran proporción de espinas de tipo filopodial (morfología inmadura), mientras que en neuronas WT abundan protrusiones de tipo stubby (morfología madura). (WT LTP n= 3; HTZ LTP n= 10).

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La MCN es una enfermedad congénita caracterizada clínicamente por debilidad y atrofia muscular progresiva, acompañada de cambios estructurales en la mayoría de las fibras de los músculos afectados (3). Dentro de las formas de MCN, la MCN-AD es la forma más común y se asocia a mutaciones en dinamina-2 (8). Si bien se ha descrito ampliamente que la MCN-AD es una patología principalmente de afección muscular, se han descrito casos de pacientes con esta patología que presentan defectos cognitivos (6), sin embargo, hasta la fecha se desconocen los mecanismos involucrados.

En este contexto, los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis sugieren que las mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN-AD afectan la función sináptica de dinamina-2 lo que lleva a defectos en la exocitosis del receptor glutamatérgico AMPA y a una desregulación de la estructura sináptica que depende del citoesqueleto de actina en neuronas hipocampales de un modelo murino de MCN-AD. Lo anterior podría explicar los defectos cognitivos observados en pacientes con esta patología.

La hipótesis planteada en el presente proyecto de tesis fue que, efectivamente, “las mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN-AD afectan la función sináptica de dinamina-2 desregulando la exocitosis del receptor AMPA y la dinámica de actina en las sinapsis excitatorias de neuronas hipocampales de un modelo murino de la patología”. Para validar esta hipótesis analizamos los eventos de exocitosis del receptor AMPA, principal receptor implicado en la transmisión sináptica excitatoria en el sistema nervioso de mamíferos (17) y evaluamos el número y la morfología de las espinas dendríticas, indicador de madurez y funcionalidad sináptica (26).

Exocitosis espontánea de AMPAR: número y cinética de eventos

Para determinar el número de eventos de exocitosis de AMPAR y la duración media de éstos utilizamos la sonda fluorescente SEP como “reportera” del tráfico de AMPAR. La fluorina super-eclíptica (SEP), una variante de la proteína fluorescente verde (GFP) sensible a pH, se ha utilizado ampliamente para visualizar la dinámica de distintos receptores en membrana (25,38,39). Aquí, mostramos cómo la subunidad GluR1 del receptor AMPA se inserta en la membrana superficial en dendritas de neuronas hipocampales de ratones WT y HTZ en condición basal (en ausencia de estimulación).

Nuestros resultados sugieren que dinamina-2 juega un rol importante en el tráfico de AMPAR controlando tanto la llegada del receptor, como su duración en las membranas superficiales de neuronas hipocampales en cultivo. Congruentemente, la mutación p.R465W en dinamina-2 causante de MCN-AD perturba tanto la cantidad como la duración de los eventos de exocitosis de AMPAR. Es así como las neuronas hipocampales cultivadas a partir de ratones HTZ presentaron una tendencia a la baja tanto en el número de eventos de exocitosis espontánea por micra cuadrada (FIGURA 4, B) como en el tiempo de permanencia en la membrana de dichos eventos (FIGURA 4, C) en comparación a lo observado en neuronas provenientes de ratones WT. En línea con estos resultados, González-Jamett et al. (2017) demostraron que mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN-AD afectan la inserción en superficie del transportador de glucosa GLUT4 en células musculares (14), lo que sugiere que el tráfico hacia las membranas plasmáticas está afectado en el contexto de la MCN-AD. Esto podría explicar la menor llegada de AMPAR a la superficie de neuronas HTZ. ¿Pero, de qué manera una mutación en dinamina-2 podría afectar la llegada de AMPAR a las membranas superficiales de las neuronas HTZ? Jaskolski y colaboradores en el año 2009 demostraron que dinamina-2 facilita la difusión lateral de AMPAR desde el eje dendrítico hacia las espinas controlando su inserción en las PSDs (23). Una mutación que afecta la actividad GTP-asa de dinamina-2 (K44A) afecta de manera significativa este proceso (23). Debido a que existe evidencia de que la mutación p.R465W induce efectos similares a los producidos por inhibidores farmacológicos de la actividad GTP-asa de dinamina como dynasore o Dynole 34-2 (14), es posible suponer que ésta mutación de alguna manera también afecta la actividad catalítica de dinamina-2 y por ende podría impactar negativamente en su función facilitadora del tráfico de AMPAR. Más aún la actividad GTP-asa de dinamina-2 también controla otros aspectos del tráfico

de AMPAR como su internalización (17) y su reciclaje endocítico (40–42) lo que también repercute en la cantidad de receptor disponible en las PSDs. Estos estadíos del tráfico de AMPAR hacia y desde las sinapsis también podrían afectarse por la mutación p.R465W en dinamina-2 causando las diferencias que observamos en número y duración de los eventos de exocitosis de AMPAR en neuronas HTZ.

De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran una tendencia que, aun cuando no alcanza la significancia estadística debido al reducido número de réplicas, apoya la posible conexión entre fallas en dinamina-2 y defectos cognitivos debidos a un tráfico de AMPAR defectuoso en el contexto de la MCN-AD. Considerando que el tráfico de AMPAR es uno de los mayores determinantes de la transmisión y la plasticidad de la eficacia sináptica en mamíferos (22) y que ésta última es el correlato molecular del aprendizaje y la memoria (43,44), es posible suponer que la mutación p.R465W afecta la función de dinamina-2 en el tráfico de AMPAR y conduce progresivamente a un deterioro cognitivo.

Las técnicas utilizadas en este proyecto de tesis nunca habían sido utilizadas bajo el contexto de MCN en neuronas, por lo que aún es necesario seguir desarrollando estas técnicas con el fin de poder evaluar la significancia estadística de nuestras observaciones y extrapolar resultados que sean significativos para una población.

Estructura de las espinas dendríticas y del citoesqueleto de actina en neuronas WT y HTZ

La plasticidad de las sinapsis excitatorias en mamíferos, además de estar determinada por cambios en el tráfico de AMPAR (22,43,44) también depende de cambios estructurales que se producen principalmente a nivel de las espinas dendríticas. Éstas corresponden a protrusiones enriquecidas en actina (24) cuya densidad y morfología están estrechamente ligadas a la madurez y a la funcionalidad de las sinapsis excitatorias (24). En este contexto, la plasticidad sináptica también supone cambios en el número de espinas y un remodelamiento de las ya existentes (26). No es extraño entonces que un sin-número de patologías sinápticas en las que existe una pérdida de la función cognitiva se asocien con la pérdida de la estructura sináptica (45). Por éstos

antecedentes evaluamos también si en el contexto de la MCN-AD existen defectos estructurales en las espinas dendríticas de neuronas hipocampales.

En primera instancia analizamos la densidad (número de espinas por cada micra de eje dendrítico) de espinas dendríticas presentes en neuronas fijadas WT y HTZ de 7 DIV. Las neuronas y espinas dendríticas fueron teñidas con la toxina de unión a actina Faloidina-rodamina-B y también se realizó el marcaje de las densidades postsinápticas con el anticuerpo PSD95 ya que las espinas dendríticas son el sitio principal para las sinapsis excitatorias (35).

Se logró observar que la densidad promedio de espinas dendríticas por cada micra de eje dendrítico es de 0.19 ± 0.03 en neuronas WT en condiciones de reposo y tal como esperábamos existe una tendencia a un aumento en la densidad de espinas luego de la inducción de ch-LTP (0.24 ± 0.03). Estos resultados son concordantes con los que se describe en la literatura, puesto que bajo condiciones de LTP la neurona experimenta un incremento en la densidad de sus espinas (24,26).

No obstante, las neuronas HTZ no muestran ninguna tendencia a modificar su densidad de espinas dendríticas luego de la inducción ch-LTP y en ambas condiciones (basal y ch-LTP) las neuronas HTZ muestran una tendencia a presentar menor densidad de espinas dendríticas que su contraparte WT (FIGURA 6, B). Al analizar lo que sucedía con neuronas WT y HTZ, se experimentó a los 14 DIV bajo condiciones de inducción de ch-LTP y no se logró observar una diferencia significativa en el número de espinas entre ambos genotipos (FIGURA 8, B) aunque también existe una pequeña tendencia a que este valor sea menor en neuronas HTZ.

Debido a que actina es la principal proteína presente en el citoesqueleto de las espinas dendríticas y se ha demostrado que la actividad GTP-asa de las dinaminas en general y de dinamina-2 en particular es un modulador clave de la dinámica del citoesqueleto de actina en distintos tipos celulares (14,28,46), la mutación p.R465W presente en las neuronas HTZ podría ser un potencial causante de esta reducción en la densidad de espinas dendríticas al alterar el dominio medio de dinamina-2, el cual es un dominio clave para su oligomerización (14). Estudios han descrito que dinamina-2 regula el citoesqueleto de actina a través de mecanismos dependientes de su actividad GTP-asa (28,46). En particular la mutación p.R465W ha mostrado, en experimentos *in vitro*, que causa un aumento en la actividad GTPasa basal de dinamina-2 (47), aunque en el contexto celular ésta mutación induce efectos similares a los causados por inhibidores farmacológicos de su actividad GTP-asa (14), lo que nos hace suponer una pérdida de su capacidad

de hidrolizar GTP. Es factible que, al estar ubicada en su dominio de oligomerización, la mutación p.R465W afecte la agregación de dinamina-2 pudiendo afectar el ciclo de hidrólisis de GTP y desencadenar desórdenes en los procesos celulares dependientes de dinamina-2, como por ejemplo el tráfico de receptores de membrana y/o la dinámica del citoesqueleto de actina (14). En éste sentido, otros autores han corroborado que diferentes mutantes de dinamina, que afectan su capacidad de unir actina, reducen de manera significativa la formación de filamentos (F-actina) en podocitos. Interesantemente, los mismos autores mostraron que existe un potencial sitio de unión directa entre F-actina y dinamina, el que justamente se encuentra en el dominio medio de oligomerización (28). Si es que efectivamente, y por su ubicación, la mutación p.R465W afecta la capacidad de dinamina-2 de interactuar con F-actina, ésta podría ser la causa de una defectuosa polimerización de actina en el contexto de la MCN-AD (14).

Ya que la estructura de las espinas dendríticas está principalmente determinada por el citoesqueleto de actina (24), es posible que nuestro resultado de un reducido número de espinas teñidas con faloidina en neuronas HTZ (FIGURA 6, A) se deba a defectos en la organización de la actina de la espina causados por la mutación p.R465W en dinamina-2.

Es importante notar que, además de su rol estructural en las espinas, el citoesqueleto de actina es un regulador clave del tráfico de AMPAR (32). Zhou et al., (2001) demostraron que la despolimerización del citoesqueleto de actina promueve la internalización de AMPAR (48) por lo que es muy probable que, si la actina en la espina tiene una reducida capacidad de remodelamiento, eso también repercuta en que la cantidad de AMPAR disponible en las PSDs se vea reducida. Según nuestros resultados, ambos mecanismos parecen operar en el contexto de la MCN-AD.

Teniendo en cuenta que la densidad de espinas se relaciona directamente con la cantidad y conectividad de las sinapsis excitatorias (27), una reducción en el número de espinas dendríticas como el que observamos en neuronas HTZ podría sin duda explicar los defectos a nivel cognitivo en pacientes con MCN-AD.

Además de la densidad de las espinas dendríticas, la morfología de las espinas es también un aspecto relevante para la plasticidad sináptica, aunque el cómo éste aspecto afecta los procesos de memoria y aprendizaje ha sido motivo de debate. En primera instancia, se tenía una noción de que la densidad de las espinas, es decir, la cantidad de espinas presente en la dendrita se relacionaba directamente con el aprendizaje, sin embargo, posteriormente diversos estudios han propuesto que

los cambios en la morfología de la espina dendrítica también es de suma importancia para los mecanismos que conducen a la consolidación de la memoria y al aprendizaje (26). Con esto en mente realizamos paralelamente una clasificación morfológica de las espinas dendríticas en las mismas neuronas usadas para el conteo de la densidad de espinas. Basándonos en los criterios definidos por Risher et al. (2014) clasificamos las espinas según su morfología en: “filopodio”, “thin”, “stubby” o “mushroom”. Según estos criterios, las primeras corresponden a protrusiones inmaduras y disfuncionales de un largo mayor o igual a 2 μm , que presentan escasa superficie de contacto sináptico. Las de tipo mushroom, son las espinas maduras por excelencia que tienen un cuello y una cabeza bien definida de un diámetro de al menos 0.6 μm que ofrece una mayor superficie de contacto con los terminales pre-sinápticos asegurando una mayor y mejor conectividad. Las stubby son cercanas a las mushroom en madurez y las thin están en un escalón intermedio (35).

Nuestros resultados muestran que en neuronas HTZ de 7 *DIV* predominan las protrusiones dendríticas de tipo “filopodio” tanto en condición ch-LTP como en condición basal lo que hace suponer la existencia mayoritaria de sinapsis inmaduras en el contexto de la MCN-AD (26,27). Por el contrario, en neuronas WT de 7 *DIV* se logra distinguir una mayor abundancia de espinas dendríticas de tipo “stubby” en condición basal, las cuales aumentan tras el estímulo ch-LTP (26,27) (FIGURA 9).

Algo muy parecido ocurrió en neuronas WT y HTZ en condición ch-LTP a 14 *DIV* (FIGURA 10). Se utilizaron neuronas a este estadio debido a que luego de la primera semana postnatal las espinas maduran a formas con cuello y cabeza (27) y así es posible ver si existe un cambio significativo respecto a los 7 *DIV*. Tal como observamos a los 7 *DIV* en las neuronas HTZ a los 14 *DIV* también predominan las espinas dendríticas de tipo “stubby” y las protrusiones “filopoidales” casi en la misma proporción, mientras que en neuronas WT, se evidenció una amplia predominancia de espinas dendríticas tipo “stubby”.

Nuestros resultados fuertemente sugieren una mayor proporción de espinas dendríticas inmaduras en neuronas de ratones HTZ comparado con neuronas de ratones WT tanto a los 7 *DIV* como a los 14 *DIV*. Esto se puede explicar debido a la importancia de la integridad del citoesqueleto de actina en la plasticidad funcional y estructural (24), integridad que se ve afectada

en ratones con la mutación p.R465W (14) tal como se explicó anteriormente. No obstante, el mecanismo molecular bajo el cual esto ocurre aún no ha sido demostrado.

El aumento del volumen de las cabezas de las espinas dendríticas bajo la inducción de LTP se asocia a un aumento en la eficacia sináptica (26) y formas más estables de espinas (maduras) contienen elevados niveles de receptores que sustentan altos niveles de actividad sináptica (35). Bajo este contexto, los defectos cognitivos descritos en pacientes con MCN-AD podrían también explicarse por alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas. En un estadio de madurez neuronal rara vez son observadas protrusiones de tipo “filopodio” (27), las cuales ven limitada su funcionalidad en la transmisión sináptica (26). Por lo tanto, neuronas de ratones HTZ que presentarían una morfología sináptica en su mayoría inmadura tendrían, de seguro, deficiencias en su actividad sináptica y en las funciones que ésta determina como aprendizaje y memoria.

Claramente una mala función de dinamina-2 puede desencadenar alteraciones sinápticas, lo que sugiere la importancia de esta proteína. Aunque en el cerebro mamífero existen tres isoformas de dinamina (dinamina-1, dinamina-2 y dinamina-3) las cuales podrían eventualmente compensar la disfunción de la otra, se ha mostrado que sólo dinamina-2 es relevante para el desarrollo del SNC embrionario. Es así como en ratones doble knock-out (KO) para dinamina-1 y dinamina-3 aún es posible una eficiente transmisión sináptica (19) hasta dos semanas posnatal (20), mientras que el KO de dinamina-2 es letal durante el desarrollo embrionario y por tanto incompatible con la vida (9,20). Lo anterior fuertemente sugiere que dinamina-2, y no sus otras isoformas, juega un papel preponderante para la función sináptica (21) y es por esta razón que sugerimos que, aun existiendo los otros dos tipos de dinamina en el cerebro de los ratones HTZ, existen fallas en la transmisión sináptica en neuronas del modelo murino de MCN-AD asociada a mutaciones en DNM2.

En base a lo discutido anteriormente proponemos un modelo que pretende explicar los resultados aquí obtenidos: La mutación p.R465W en dinamina-2 modula negativamente la actividad catalítica de dinamina-2 afectando su capacidad de promover el remodelamiento de actina. Debido a que la espina dendrítica es un compartimiento rico en F-actina, lo que determina la apropiada estructura sináptica y debido que en ésta ocurre un activo tráfico de receptores AMPA que determina una apropiada función sináptica (32), cuando está presente la mutación p.R465W la morfología de las espinas dendríticas se ve perturbada, lo que limita su madurez, produce una

disminución en la densidad de las espinas dendríticas y consecuentemente afecta la expresión de AMPAR en la membrana plasmática (FIGURA 11).

Cabe destacar que es necesario seguir experimentando con estas técnicas y aumentar el tamaño muestral para poder obtener resultados estadísticos que apoyen y respalden esta hipótesis, así como también es necesario complementar con otras técnicas y ahondar en el mecanismo molecular bajo el cual se sustenta este modelo y potencialmente extrapolar estos resultados a una población general de pacientes con MCN-AD.

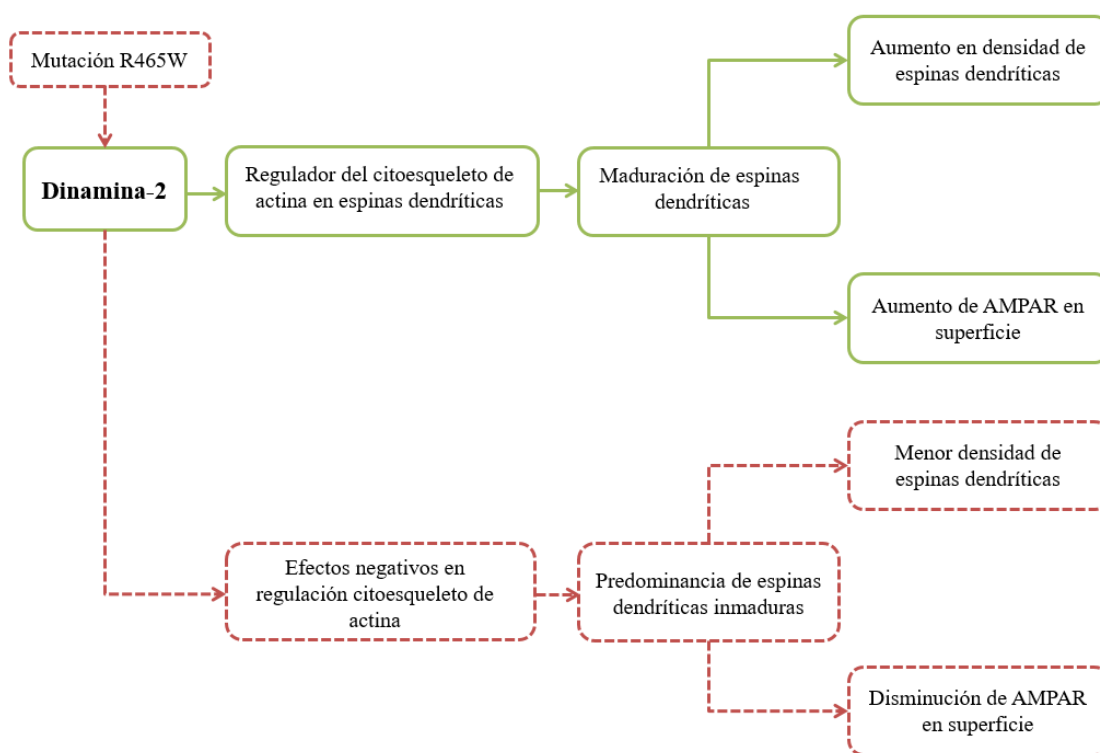


Figura 11. Modelo propuesto de mutación p.R465W en DNM-2 y su efecto en sinapsis estructural y funcional. Se propone que dinamina-2 es un regulador del citoesqueleto de actina, lo que a su vez contribuye con la maduración de espinas dendríticas, lo que provoca un aumento en la densidad de espinas dendríticas y aumento de AMPAR de superficie. En cambio, cuando se ve afectada la función sináptica de dinamina-2 por la mutación p.R465W estos mecanismos se ven afectados produciendo efectos negativos en la regulación del citoesqueleto de actina, lo que trae como consecuencia una predominancia de espinas dendríticas inmaduras, una menor densidad de espinas dendríticas y una disminución de AMPAR de superficie.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- La mutación p.R465W en DNM2, causante de más del 50% de los casos de MCN, provoca alteraciones a nivel de la morfología de las espinas dendríticas, afectando su madurez y, por ende, su eficacia en las sinapsis.
- Estos defectos también se reflejan en que las neuronas HTZ presenten una tendencia a una menor densidad de espinas dendríticas en comparación a neuronas WT, tanto en condición basal como en respuesta a la inducción de ch-LTP.
- El tráfico de AMPAR también se ve afectado, presentándose una tendencia en neuronas HTZ a tener menor cantidad de eventos de exocitosis de AMPAR en comparación con su contraparte WT. También se pudo observar una tendencia a que éstos eventos de exocitosis de AMPAR tengan una menor duración, lo que sugiere que en el contexto de la MCN-AD los receptores AMPA exhiben menos tiempo de permanencia en la membrana plasmática en comparación a los eventos de exocitosis registrados en neuronas WT.
- Los resultados obtenidos sugieren una deficiencia en la transmisión sináptica excitatoria, lo que explicaría los defectos cognitivos observados en pacientes con MCN-AD.
- Se propone un modelo bajo el cual mutaciones en DNM2 causantes de MCN-AD, en este caso la mutación p.R465W, generan un defecto en la dinámica del citoesqueleto de actina, alterando la morfología de las espinas dendríticas y desencadenando que las dendritas presenten espinas con morfología predominantemente inmadura, alteraciones en la densidad de espinas, y en la exocitosis de AMPAR.

- Cabe recalcar la necesidad de seguir experimentando estos y otros métodos y aumentar el tamaño muestral con el fin de confirmar estos resultados y poder complementarlos con otros estudios y así poder acercarse a el mecanismo molecular bajo el cual ocurren estos efectos.

CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cassandrini D, Trovato R, Rubegni A, Lenzi S, Fiorillo C, Baldacci J, et al. Congenital myopathies: Clinical phenotypes and new diagnostic tools. *Ital J Pediatr.* 2017;43(1):1–16.
2. Erazo-torricelli R. Miopatías estructurales congénitas. 2013;57(Supl 1):53–64.
3. James NG, Digman MA, Ross JA, Barylko B, Wang L, Li J, et al. A mutation associated with centronuclear myopathy enhances the size and stability of dynamin 2 complexes in cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj [Internet].* 2014;1840(1):315–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.001>
4. Bitoun M, Maugendre S, Jeannet PY, Lacène E, Ferrer X, Laforêt P, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 2005;37(11):1207–9.
5. Bobadilla E, Nascimento A. ARTÍCULO ESPECIAL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS MIOPATÍAS CONGÉNITAS Características clínicas generales y diagnóstico Clasificación de las miopatías congénitas. 2019;79:82–6.
6. Jeannet PY, Bassez G, Eymard B, Laforêt P, Urtizberea JA, Rouche A, et al. Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. *Neurology.* 2004;62(9):1484–90.
7. Durieux AC, Vignaud A, Prudhon B, Viou MT, Beuvin M, Vassilopoulos S, et al. A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet.* 2010;19(24):4820–36.
8. Romero NB. Centronuclear myopathies: A widening concept. *Neuromuscul Disord [Internet].* 2010;20(4):223-2281. Romero NB. Centronuclear myopathies: A w. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2010.01.014>
9. Ferguson SM, De Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet].* 2012;13(2):75–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3266>
10. González-Jamett AM, Haro-Acuña V, Momboisse F, Caviedes P, Bevilacqua JA, Cárdenas AM. Dynamin-2 in nervous system disorders. *J Neurochem.* 2014;128(2):210–23.

11. Fischer D, Herasse M, Bitoun M, Barragán-Campos HM, Chiras J, Laforêt P, et al. Characterization of the muscle involvement in dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Brain*. 2006;129(6):1463–9.
12. Echaniz-Laguna A, Nicot AS, Carré S, Franques J, Tranchant C, Dondaine N, et al. Subtle central and peripheral nervous system abnormalities in a family with centronuclear myopathy and a novel dynamin 2 gene mutation. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(11–12):955–9.
13. Böhm J, Biancalana V, DeChene ET, Bitoun M, Pierson CR, Schaefer E, et al. Mutation spectrum in the large gtpase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat*. 2012;33(6):949–59.
14. González-Jamett AM, Baez-Matus X, Olivares MJ, Hinojosa F, Guerra-Fernández MJ, Vasquez-Navarrete J, et al. Dynamin-2 mutations linked to Centronuclear Myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–16.
15. Cao H, Garcia F, McNiven MA. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 1998;9(9):2595–609.
16. Tanifuji S, Funakoshi-Tago M, Uedas F, Kasaharas T, Mochida S. Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*. 2013;288(26):19050–9.
17. Carroll RC, Beattie EC, Xia H, Lüscher C, Altschuler Y, Nicoll RA, et al. Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):14112–7.
18. Arriagada-Diaz J, Prado-Vega L, Cárdenas Díaz AM, Ardiles AO, Gonzalez-Jamett AM. Dynamin Superfamily at Pre- and Postsynapses: Master Regulators of Synaptic Transmission and Plasticity in Health and Disease. *Neuroscientist*. 2020;
19. Raimondi A, Ferguson SM, Lou X, Armbruster M, Paradise S, Giovedi S, et al. Overlapping Role of Dynamin Isoforms in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neuron* [Internet]. 2011;70(6):1100–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.031>
20. Ferguson S, Raimondi A, Paradise S, Shen H, Mesaki K, Ferguson A, et al. Coordinated

- Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits. *Dev Cell* [Internet]. 2009;17(6):811–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.005>
21. Koutsopoulos OS, Koch C, Tosch V, Böhm J, North KN, Laporte J. Mild functional differences of dynamin 2 mutations associated to centronuclear myopathy and charcot-marie-tooth peripheral neuropathy. *PLoS One*. 2011;6(11).
 22. Anggono V, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2012;22(3):461–9.
 23. Jaskolski F, Mayo-Martin B, Jane D, Henley JM. Dynamin-dependent membrane drift recruits AMPA receptors to dendritic spines. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12491–503.
 24. Okamoto K, Bosch M, Hayashi Y. The roles of CaMKII and F-Actin in the structural plasticity of dendritic Spines: A potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology*. 2009;24(6):357–66.
 25. Ashby MC, De La Rue SA, Ralph GS, Uney J, Collingridge GL, Henley JM. Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *J Neurosci*. 2004;24(22):5172–6.
 26. Gipson CD, Olive MF. Structural and functional plasticity of dendritic spines – root or result of behavior? *Genes, Brain Behav*. 2017;16(1):101–17.
 27. von Bohlen und Halbach O. Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat* [Internet]. 2009;191(6):518–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2009.08.006>
 28. Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, Osborn T, Reiser J, Pollak M, et al. Direct dynaming-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* [Internet]. 2010;29(21):3593–606. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.249>
 29. Bragato C, Gaudenzi G, Blasevich F, Pavesi G, Maggi L, Giunta M, et al. Zebrafish as a Model to Investigate Dynamin 2-Related Diseases. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(February):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20466>

30. Gibbs EM, Clarke NF, Rose K, Oates EC, Webster R, Feldman EL, et al. Neuromuscular junction abnormalities in DNMT2-related centronuclear myopathy. *J Mol Med*. 2013;91(6):727–37.
31. Chin YH, Lee A, Kan HW, Laiman J, Chuang MC, Hsieh ST, et al. Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Hum Mol Genet*. 2015;24(19):5542–54.
32. Hanley JG. Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(November):1–8.
33. Beaudoin GMJ, Lee SH, Singh D, Yuan Y, Ng YG, Reichardt LF, et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc [Internet]*. 2012;7(9):1741–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.099>
34. Axelrod D. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Encycl Cell Biol*. 2016;2(2):62–9.
35. Risher WC, Ustunkaya T, Alvarado JS, Eroglu C. Rapid golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PLoS One*. 2014;9(9).
36. Martineau M, Somasundaram A, Grimm JB, Gruber TD, Choquet D, Taraska JW, et al. Semisynthetic fluorescent pH sensors for imaging exocytosis and endocytosis. *Nat Commun [Internet]*. 2017;8(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01752-5>
37. Molnár E. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(5):506–13.
38. Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science (80-)*. 2004;305(5692):1972–5.
39. Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci*. 2006;26(7):2000–9.
40. Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, et al. Arc/Arg3.1 Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Neuron*.

2006;52(3):445–59.

41. Lu T, Trussell LO. Development and elimination of endbulb synapses in the chick cochlear nucleus. *J Neurosci*. 2007;27(4):808–17.
42. Zheng N, Jeyifous O, Munro C, Montgomery JM, Green WN. Synaptic activity regulates AMPA receptor trafficking through different recycling pathways. *Elife*. 2015;4(MAY):1–20.
43. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):18–41.
44. Henley JM, Barker EA, Glebov OO. Routes , destinations and delays : recent advances in AMPA receptor trafficking Europe PMC Funders Author Manuscripts. *Trends Neurosci*. 2012;34(5):258–68.
45. Stefen H, Chaichim C, Power J, Fath T. Regulation of the Postsynaptic Compartment of Excitatory Synapses by the Actin Cytoskeleton in Health and Its Disruption in Disease. *Neural Plast*. 2016;2016.
46. Mooren OL, Kotova TI, Moore AJ, Schafer DA. Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(36):23995–4005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.024398>
47. Wang L, Barylko B, Byers C, Ross JA, Jameson DM, Albanesi JP. Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem*. 2010;285(30):22753–7.
48. Zhou Q, Xiao MY, Nicoll RA. Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):1261–6.

CAPÍTULO 9. ANEXOS

Anexo N° 1: Cultivo Primario de hipocampo de ratón

1. Cortar la cabeza de cada ratón con tijeras esterilizadas. Colocar la cabeza en una placa Petri de plástico de 60mm con Hank's a 4°C (en hielo).
2. Pinchar ojos con pinza fina. Cortar en la parte posterior de la cabeza, bajo el cerebro (visible). Presionar levemente desde la parte frontal con pinzas para que salgan los dos hemisferios con parte de tronco encefálico y colocarlos en placa nueva con Hank's a 4°C.
3. Separar los hemisferios con un corte bajo lupa.
4. Retirar meninges con pinza fina. Disectar hipocampos (tratar de que queden lo más limpios posible). Dejar los hipocampos en Hank's a 4°C (en hielo).
5. Los siguientes pasos se realizan bajo campana de cultivo:
6. Pasar los hipocampos con pipeta pasteur no flameada (p1000 punta azul) a un tubo de 15mL, cuidando que los hipocampos no se queden adheridos a la pared de la pipeta.
7. Dejar que los hipocampos decanten y después sacar el Hank's hasta cierto volumen para no tomar los hipocampos con la pipeta y agregar 3 mL de Hank's. Este lavado se repite tres veces.
8. Se prepara 5 mL de tripsina (500uL de tripsina (2.5%) + 4.5 mL de Hank's) y se agrega solo 3 mL de tripsina suave sobre los hipocampos en el tubo de 15mL (evitando que se muevan al agregar tripsina).
9. Se deja incubando por 15 min a 37°C en baño termo regulado.
10. Después de los 15 min retirar la tripsina lentamente sin tomar los hipocampos y agregar 3 mL de Hank's en forma lenta para que no se muevan los hipocampos. Este lavado se repite tres veces.
11. Agregar 5 mL de medio de adhesión al tubo.

12. Disgregar con pipeta pasteur (de la más gruesa a la más delgada), pasando el tejido 10 veces por cada pipeta.
13. Contar células con cámara de Neubauer y sembrar (P96 10.000 cells/well; cover de 12mm 30.000cells/cover para confocal; cover de 25 mm para TIRF; P6 800000 cells/well).
14. Luego de 3h cambiar a medio Neurobasal completo.
15. Una vez a la semana cambiar 1/3 del medio Neurobasal.

Preparación de medios:

- Preparación de medio Hanks (debe estar preparado con anterioridad): Añadir 800 mL de agua MiliQ en un recipiente adecuado. Añadir las siguientes cantidades: 8 g. de NaCl., 400 mg de KCl, 140 mg de CaCl₂, 100 mg de MgSO₄, 100 mg de MgCl₂, 60 mg de Na₂HPO₄, 60 mg de KH₂PO₄, 1 g de D-glucosa (dextrosa), 350 mg de NaHCO₃. Mezclar en agitación y ajustar a pH 7.4, luego aforar a 1000 mL y guardar refrigerado a 4°C.
- Medio Adhesión (100ml): 0,6% D-Glucose 100X, 10% Horse serum, Medio MEM (Gibco 61100061).
- Medio Neurobasal (50ml): 1X B27 Supplement, 1X Glutamax, 1XPen/Strep, Medio Neurobasal (Gibco 21103049).

Anexo N° 2: Inmunofluorescencia

1. Fijar neuronas en PFA 4% en Sacarosa 4% (diluir en PBS pH 7.4) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La solución debe estar precalentada a 37°C.
2. Lavado suave en PBS 1x durante 2 minutos
3. Permeabilización de la membrana con Tritón x100 0,1% en PBS, durante 10 minutos a TA.
4. Lavado suave en PBS 1X
5. Bloqueo de background con BSA 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Incubar con anticuerpo 1° en cámara húmeda durante toda la noche a temperatura ambiente.
7. Tres lavados en PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos c/u.
8. Incubar anticuerpo 2° conjugado con fluoróforo en BSA 5% durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Dos lavados en PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos c/u.
10. Incubar con DAPI durante 8-10 minutos (1uL DAPI en 1 ml PBS).
11. Lavado en PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Montaje en medio Dako (para IF antifade) (8 a 10 ul).
13. Sellar suavemente con esmalte de uñas transparente por los bordes.

- Preparación PBS 1X: Añadir 800 mL de agua MiliQ en un recipiente adecuado. Añadir las siguientes cantidades de reactivos: 8,011 g NaCL, 0,202 g KCl, 1,419 g Na₂HPO₄, 0,248 g KH₂PO₄. Mezclar en agitación y ajustar a pH 7.4, luego aforar a 1000 mL.

Anticuerpos Primarios Utilizados a concentración 1:100 (las diluciones se hacen en BSA 5%).

- Tau marca Abcam

- Map 2 marca Abcam
- PSD 95 marca Merck, by Millipore
- Faloidina-rodamina-B marca Sigma-Aldrich

Las diluciones de los anticuerpos secundarios es de 1:500 (las diluciones se hacen en BSA 5%). La marca de los anticuerpos secundarios es Invitrogen y se hizo uso de anticuerpos Anti-Goat, Anti-Chicken, Anti-Rabbit y Anti-Mouse.

Anexo N° 3: Transformación de Bacterias Competentes

Bacterias: E. Coli XL1 Blue

Constructo: GluR1-SEP (resistente a ampicilina)

1. Preparar: Caldo Luria Bertani o caldo LB. Para un litro: 10g peptona/triptona, 5g NaCl, 5g levadura. Ajustar a pH: 7. Preparar LB + agar (placas). Agregar agar directo a la botella. Para un litro de LB agregar 15 g de agar.
2. Autoclavar la mezcla (0,5L + agar en una botella con tapa semipuesta de 1L para evitar derrame) con un agitador dentro.
3. Una vez autoclavado, agitar para que se enfríe (hasta que el calor sea tolerable al tocar) y se agregan los antibióticos correspondientes (en sala bacteriología)
 - Para Ampicilina: usar a 100 ug/ml. Stock se prepara a 30 mg/ml en agua estéril filtrada. Se alicuota y mantiene a -20°C. (Para 0,5 L 1,7 ml del stock).
4. Plaquear apenas agregado el antibiótico directo de la botella (a la mitad de la altura de la placa aprox) bajo mechero. Flamear burbujas (por encima suavemente).
5. Dejar placas bajo mechero cubierto de alusa foil (para proteger) hasta que gelifique el agar. Dejar las que se usarán y dejar las otras en parafilm en refrigerador en bacteriología a 4°C.
6. Por cada transformación usar 5 uL DNA en 50 uL de bacterias competentes (E. Coli XL1Blue) Las bacterias se mantienen en alícuotas de 200uL en glicerol que a -80°C. Descongelar en hielo.

7. Para cada transformación poner un eppendorf en hielo y agregar: 5uL DNA, 50uL bacterias. Control negativo agua 5uL agua MiliQ + 50uL bacterias Mantener en hielo por 30 minutos.
8. Producir shock térmico para ingreso de DNA: 42°C por 50 segundos (en el bloque de temperatura o en una manta con termómetro).
9. Mantener en hielo 2 minutos.
10. Agregar 950 uL de medio SOC e incubar en el shaker en bacteriología a 37°C a 220 rpm durante 1 h.

Preparación de SOC: Peptona 2%, 0,5% levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa. SOC debe estar a pH 7
11. Aumentar a 4000 rpm por 1 minuto TA (13 - 15°C).
12. Eliminar 800 uL del sobrenadante y resuspender el pellet (casi no se ve) en los 200 uL restantes suavemente bajo mechero.
13. Agregar la mezcla en 2 placas diferentes:
 - Agregar 50 uL de esa mezcla en una placa.
 - Agregar 150 uL de esa mezcla en una placa.
 - Agregar mezcla de Control negativo en una placa.
14. Sembrar (con el asa de vidrio flameada) esparciendo el líquido en el agar (girando la placa en porta placa).
15. Incubar a 37°C en sala de bacteriología (con lado de agar arriba para que agua evaporada no caiga en bacterias).

16. Después de 12 horas, picar 2 colonias aisladas (de cualquiera de las dos placas) suavemente con una punta pequeña (previamente flameada) e incubar (la punta) en 1 ml de LB + Ab. en una snap-cup todo el día incubando en shaker (pequeño) el inóculo (sobre 6 horas). Guardar placas con parafilm a 4°C en refrigerador de bacteriología hasta por 2 meses por si se debe extraer DNA nuevamente en el corto plazo.

17. En la tarde pasar el inóculo (todo) a un falcon de 50 con 25 ml de LB + Ab (de uno de los tubos, el otro guardar a 4°C por si acaso). Cerrar la tapa no completamente para afirmarlo con masking. Incubar toda la noche en shaker. El control - hasta aquí debe seguir usándose y asegurarse de que no crezca nada.

18. Aumentar por 5 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente.

19. Descartar sobrenadante y guardar pellet a -20°o hacer mini prep de inmediato.

Anexo N° 4: Extracción de DNA (E.Z.N.A Endo-Free Plasmid DNA Mini Kit Protocols)

1. Añadir 500 uL de Solución 1 y vortear hasta homogeneizar.
2. Traspasar contenido a un eppendorf de 2 ml.
3. Agregar 500 uL de solución 2. Mezclar suavemente (movimientos suaves de inversión) durante 2 o 3 minutos.
4. Agregar 250 uL de solución 3. Invertir hasta formar precipitado mucoso blanco.
5. Centrifugar 13000rpm durante 15 minutos a 10°C (sobrenadante no debe estar turbio, si lo está, centrifugar en tubo distinto).
6. Transferir sobrenadante a un eppendorf de 1,5 mL. Medir volumen del lisado clarificado transferido (es aproximadamente de 1,5 uL) y sacar 1 uL.
7. Agregar 1 uL de solución 4. Invertir tubo 10 veces para mezclar bien.
8. Insertar Hi Bind DNA mini (tubo de colección) en 2ml.
9. Agregar 100 uL de solución 5 a la columna. Centrifugar a 13000rpm durante 1 minuto. Descartar sobrenadante y rescatar el tubo de colección.
10. Transferir 650 uL del lisado del paso 7 en la columna HiBind
11. Centrifugar 13000rpm durante 1 minuto
12. Descartar sobrenadante y rescatar tubo
13. Repetir paso 10 al 12 hasta que todo el lisado se transfiera a la columna.
14. Agregar 500 uL solución 6.
15. Centrifugar a 13000rpm x 1 minuto.
16. Descartar sobrenadante y reutilizar tubo de colección.
17. Agregar 500 uL Solución 7 (tiende a formar precipitado, normal).
18. Centrifugar a 13000rpm x 1 min.
19. Descartar sobrenadante y reutilizar tubo de colección.

20. Agregar 680 uL de solución 8.
21. Centrifugar 13000rpm x 1 min.
22. Descartar sobrenadante y reutilizar tubo de colección.
23. Repetir pasos 20 al 22.
24. Centrifugar tubo vacío de HiBind DNA mini durante 2 minutos a 13000rpm para sacar la matriz de la columna. Secar matriz antes de la elusión, etanol residual podría interferir con aplicaciones posteriores.
25. Transferir columna HiBind DNA a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
26. Agregar 80 uL de solución 9 (ó puede ser agua estéril RNAsa free a pH 8.5) directamente al centro de la membrana de la columna.
27. Dejar reposar a TA por 5 min.
28. Centrifugar a 13000rpm durante 1 minuto.
29. Evaluar pureza y concentración de DNA en espectrofotómetro.
30. Guardar DNA a -20°C.

Anexo N° 5: Transfección de Neuronas Hipocampales

- Mezclar 1 uL Lipofectamina + 25 uL de medio neurobasal sin suplemento. Dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar 1 ug de DNA + 25 uL de medio neurobasal sin suplemento. Dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar ambas soluciones suavemente. Solución de Lipofectamina sobre DNA. Esperar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar a covers. Agitar suavemente. Los covers deben tener un excedente de medio de cultivo (no extraerlo todo).
- Guardar en incubadora y dejar reposar aproximadamente 48 horas (óptimo). A las 24 horas se debe cambiar el medio de cultivo por uno nuevo.

Anexo N°6: Protocolo de Genotipificación

Muestra desde donde se extraerá DNA se almacena a -20°C hasta su digestión. Antes del protocolo dejar tubos con muestra a temperatura ambiente al menos 30 min.

Trabajar en zona “RNAasa free” (previo al protocolo limpiar mesón y material de trabajo, primero con etanol 70% y luego con solución anti-RNAasa). Material exclusivo, puntas con filtro.

1. Agregar 500 uL buffer Tel + 10 uL proteinasa K (alícuotas -20°C). Vortear.
2. Digerir por 1-2 horas a 55°C agitación (vortear cada 10 minutos si no se cuenta con agitador). En caso excepcional puede quedar a temperatura ambiente toda la noche digiriendo.
3. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C .
4. Trasvasar sobrenadante a un eppendorf estéril con 750 uL etanol puro (Merck). Se forma un halo blanco sobre el alcohol. Invertir 4 veces (mezcla).
5. Centrifugar por 25 minutos a 13.000 rpm a 16°C y eliminar sobrenadante volteando el tubo (no por succión). El precipitado casi no se ve.
6. Agregar al precipitado 500 uL de etanol 70% (Merck).
7. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm y eliminar sobrenadante volteando el tubo.
8. Secar muestra con tubo invertido sobre papel por 45 minutos. El precipitado podría guardarse a 4°C toda la noche.
9. Disolver el precipitado en 150 uL de buffer TE a 50°C por 2 horas (podría ser 1 ½ hora),
vortear cada 10 minutos.

PCR (Kit -20°C)

- Master Mix (verde) 12,5 uL (5) → Agregar al último

- Primer Reverse (10uM) 2,5 uL (2) *Stock y diluciones en H₂O grado Biomed
- Primer Forward (10uM) 2,5 uL (3) *Stock y diluciones en H₂O grado Biomed
- DNA 1,5 uL (4)
- Agua DNAasa free 6 uL (1)
- Agua RNAasa 6 uL

TOTAL (Reactivos): 25 uL → Preparar a temperatura ambiente

- Termociclador (BIORAD)
- Muestras pueden quedar a 4°C en tubos de PCR (1 - 2 días)
- Después correr en gel con gels-tar (GIBCO) de agarosa al 2% se corre a 70 volt 30 minutos-1 hora en cámara de electroforesis, en buffer Tae. Alelo mutante pesa 533pb y el WT 445 pb.

Anexo N° 7: Inducción de ch-LTP para cultivo neuronal

1. Retirar medio neurobasal.
2. Pre estimular las neuronas con 500 uL de Tyrode sin Mg²⁺ a 37°C en incubador durante 20 minutos.
3. Retirar solución anterior e inducir ch-LTP con 500uL de una solución de Tyrode sin Mg²⁺, Glicina 600uM, Picrotoxina 50uM y Estricnina 3uM a 37°C en incubador durante 20 minutos.
4. Dejar que las neuronas realicen plasticidad estructural en solución de Tyrode normal durante 30-45 minutos.
5. Fijar neuronas en PFA 4% en sacarosa 4%.

Preparación buffer Tyrode:

- 133 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 2 mM CaCl₂
- 2,3 mM MgCl₂ *
- 10 mM HEPES
- 10 mM glucosa

pH: 7.2 – 7.3

(*Variante sin Mg²⁺ no lleva MgCl₂)