

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIAS.**

**IMPACTO DE UNA MUTACIÓN CAUSANTE
DE MIOPATÍA CENTRONUCLEAR EN EL ROL
DE DINAMINA-2 EN LA MORFOLOGÍA
SINÁPTICA Y EN LA EXPRESIÓN DE
RECEPTORES AMPA EN SINAPSIS
EXCITATORIAS.**

Lorena Prado Vega
Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencias

Directora de Tesis

Dra. Arlek González Jamett

Co-director de Tesis

Dr. Álvaro Ardiles Araya

Índice General

1. Introducción.....	5
1.1 Dinaminas.....	5
1.2 Miopatía centronuclear (MCM).....	6
1.3 Estudios en tejido humano y en modelos animales de MCM.	9
1.4 Rol de dinamina-2 en sinapsis centrales	10
1.5 Función de las espinas dendríticas en las sinapsis excitatorias.....	13
1.6 Espinas Dendríticas y su relación con neuropatologías.	18
2. Hipótesis.	20
3. Objetivos.....	21
3.1 Objetivo General	21
3.2 Objetivos Específicos:.....	21
4. Metodología.....	22
4.1. Animales de experimentación.	22
4.2. Tinción de Golgi.	22
4.3. Analisis morfometrico de las espinas dendriticas	23
4.4. Evaluación de la expresión de AMPA en sinaptonerosomas	23
4.5. Analisis estadisticos	24
5. Resultados	26
5.1. Cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas en neuronas de ratones HTZ	26
5.2. Disponibilidad de AMPAR en fracciones enriquecidas en sinapto-neurosomas.....	36
6. Discusión.....	39
7. Conclusiones.	47
8. Anexos.	48
8.1 Clasificación de Espinas Dendríticas de acuerdo a sus dimensiones	48
8.2. Valores de clasificación de Espinas dendríticas de acuerdo a longitudes y diámetros.	49
9. Bibliografía.....	50

Índice de Figuras

Figura 1: Dominios y organización estructural de las dinaminas	8
Figura 2: Rutas del tráfico de AMPAR en la densidad postsináptica	12
Figura 3: Estructura y composición proteica de una espina sináptica madura.....	15
Figura 4: Tipos de espinas según sus morfologías.	17
Figura 5: 7 Neuronas piramidales de corteza (capa 3-5) de cerebros WT y HTZ.....	26
Figura 6: Neuronas hipocampales HTZ exhiben una menor densidad de espinas dendríticas que las neuronas WT en condición de reposo.	27
Figura 7: Las neuronas HTZ exhiben una menor densidad de espinas dendríticas que las neuronas WT en respuesta a la inducción química de LTP.....	28
Figura 8: Imágenes representativas de protrusiones dendríticas	¡Error! Marcador no definido.
Figura 9: Neuronas HTZ hipocampales exhiben menor proporción de protrusiones filopoidales que las WT en condición de reposo.	30
Figura 10: Neuronas HTZ corticales exhiben menor proporción de protrusiones filopoidales que las WT en condición de reposo.	31
Figura 11: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas hipocampales WT y HTZ en reposo.	32
Figura 12: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas hipocampales WT y HTZ sometidas a chLTP.	34
Figura 13: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas corticales WT y HTZ en reposo.	34
Figura 14: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas corticales WT y HTZ sometidas a chLTP.	35
Figura 15: Ultraestructura de Sinaptoneurosomas vista por microscopia electrónica.	36
Figura 16: La expresión de AMPAR en sinaptoneurosomas de cerebros WT y HTZ no cambia en condiciones de reposo.....	37
Figura 17: Neuronas HTZ hipocampales en cultivo exhiben una menor densidad de F-actina en las espinas dendríticas y menor razón cabeza/espina que su contraparte WT.....	44

Índice de Anexos

Figura A 1: Criterios para asignar morfología a las espinas dendríticas de acuerdo a sus dimensiones.....	48
Figura A 2: Tipos comunes de espinas dendríticas que se encuentran en la corteza.....	49

RESUMEN

Dinamina-2 es una mecano-enzima con actividad GTP-asa que se expresa ubicuamente en distintos tejidos y participa en múltiples funciones tales como endocitosis, exocitosis y tráfico de proteínas de membrana. Dinamina-2 también es un importante regulador de la organización y remodelamiento del citoesqueleto de actina. Mutaciones en el gen que codifica dinamina-2 (DNM2) son causantes de miopatía centronuclear (MCN), una enfermedad muscular hereditaria que se caracteriza por debilidad y atrofia progresiva de la musculatura esquelética. Algunos reportes clínicos informan que pacientes con MCN también exhiben defectos cognitivos, aunque los mecanismos asociados nunca han sido reportados. En la presente tesis de magister se buscó entender el rol de dinamina-2 en dos aspectos claves para la consolidación del aprendizaje y la memoria como son: la estructura sináptica y la expresión superficial de receptores glutamatérgicos en sinapsis excitatorias. Específicamente evaluamos el número y morfología de espinas dendríticas en neuronas piramidales y la densidad de receptores AMPA en sinaptoneurosomas provenientes de hipocampo y corteza de un ratón knock-in (KI) portador de la mutación heterocigota p.R465W en el gen DNM2 (HTZ), que es la mutación que más comúnmente se asocia con MCN. Nuestros resultados demostraron que la cantidad total de receptores AMPAR disponibles en sinaptoneurosomas del cerebro de ratones HTZ en condiciones basales no fue diferente de lo observado en cerebros de ratones silvestres (WT). Sin embargo, la densidad de espinas dendríticas disminuyó de manera significativa en neuronas hipocámpales y corticales de ratones HTZ comparados con la condición silvestre. Lo anterior sugiere que en el contexto de la MCN podría ocurrir una pérdida de sinapsis funcionales explicando, al menos en parte, los defectos cognitivos descritos en pacientes.

ABREVIATURAS

- AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
- AMPAR: Receptor Tipo AMPA
- EMC: Endocitosis Mediada por Clatrina.
- MCN: Miopatía Centro Nuclear
- CMT: Charcot-Marie-Tooth
- DNM1: gen codificante de dinamina-1
- DNM2: gen codificante de dinamina-2
- DNM3: gen codificante de dinamina-3
- GED: dominio efector GTPasa
- PH: homología a pleckstrin
- PRD: dominio rico en prolinas
- DPS: Densidades Post Sinápticas

1. Introducción.

1.1 Dinaminas.

La súper familia de las dinaminas (SFD) es un grupo de grandes GTP-asas que actúan como mecano-enzimas capaces de remodelar membranas de un modo dependiente de la hidrólisis de GTP (González-Jamett et al. , 2013; González-Jamett et al. , 2014). La actividad GTP-asa de los miembros de la SFD se ve favorecida por su auto-ensamblaje, formando estructuras de alto orden como hélices y anillos alrededor de las membranas que remodela (Ferguson et De Camilli, 2012). Las dinaminas a través de su actividad GTP-asa participan en múltiples funciones celulares tales como endocitosis, exocitosis, reciclaje y tráfico de membranas (Ferguson et De Camilli, 2012) además de modular la organización y el remodelamiento del citoesqueleto de actina (Gonzalez-Jamett et al. , 2017). La SFD está compuesta por proteínas tipo dinamina y por dinaminas clásicas (Arriagada-Diaz et al., 2020). Dentro de las dinaminas clásicas se han descrito 3 isoformas en mamíferos codificadas por los genes DNM1, DNM2 y DNM3 las que se expresan diferencialmente en distintos tejidos: dinamina-1 en sistema nervioso, dinamina-3 en corazón, pulmones, cerebro y testículos y dinamina-2 que se expresa ubicuamente en distintos tejidos (Cao et al. , 1998, González-Jamett et al., 2013; González-Jamett et al. , 2014)

Todas las isoformas de dinamina clásicas comparten 5 dominios característicos y altamente conservados: un dominio GTPasa amino-terminal, un dominio medio estructural (Gu et al. , 2010), un dominio PH que interactúa con fosfoinosítidos como el fosfoinositol-4, 5-difosfato (PI (4, 5) P2), un dominio efector de la actividad GTPasa de dinamina (GED) (Tanabe et al., Takei, 2012) y un dominio rico en prolina y argininas (PRD) capaz de interactuar con moléculas con dominio SH3 (Cao et al. , 1998). Estos dominios se organizan en 3 regiones: un elemento de “empaquetamiento” o BSE (del inglés “bundle signaling element”) compuesto por hélices del dominio GTP-asa y del GED; un tallo o “stalk” compuesto por hélices del dominio medio y del GED y el PH que actúa como un “pie” que se inserta en las membranas (Chappie et al., 2009; Chappie et al., 2009; Faelber et al., 2011; Ford et al.,

2011; Kong et al., 2018). En respuesta a la unión de GTP el BSE transmite cambios conformacionales desde el dominio GTP-asa hacia el “stalk” favoreciendo la oligomerización de las dinaminas en estructuras anulares y helicoidales que aumentan su actividad GTP-asa (Antonny et al., 2016). El auto-ensamblaje de las dinaminas además de aumentar su actividad catalítica también favorece la polimerización y el empaquetamiento de los filamentos de actina (Gu et al., 2014; Shiffer et al., 2015; Zhang et al., 2020; Lin et al., 2020). **(figura 1).**

Las distintas isoformas de dinamina clásicas parecen realizar funciones similares en los tejidos en donde se expresan. Investigaciones como las de Raimondi y colaboradores en el 2011, exponen que frente a la falta de una de las isoformas de dinamina, las otras pueden compensar sus funciones (Raimondi et al., 2011). Sin embargo, y a pesar de que las tres isoformas son relevantes, dinamina-2 parece ejercer funciones esenciales que no pueden ser compensadas por las otras isoformas. Tal como mostraron Ferguson y colaboradores en el 2009 la delección de dinamina-2 en ratones knock-out (K.O) para el gen DNM2 resulta en la muerte temprana embrionaria, entre los días 8 y 12 de gestación (Ferguson et al., 2009) haciendo evidente la importancia de dinamina-2 para el desarrollo y la viabilidad animal. Congruentemente, diversas mutaciones en el gen DNM2 se relacionan con patologías humanas como la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT) que afecta el sistema nervioso periférico (Tanabe et Takei, 2012) y la miopatía centronuclear (MCN) que afecta principalmente a la musculatura esquelética.

1.2 Miopatía centronuclear (MCM)

La MCN es una patología muscular hereditaria que mayoritariamente se transmite de manera autosómica dominante (González- Jamett et al ., 2018). Clínicamente se manifiesta por una debilidad muscular progresiva y atrofia de los músculos esqueléticos, los músculos utilizados para el movimiento voluntario (Frontera et Ochala, 2015). La severidad con que se manifiesta la MCN puede variar de individuo en individuo, aun en miembros de la misma familia. Los pacientes con MCN, comienzan a experimentar debilidad muscular en cualquier

momento desde el nacimiento hasta la etapa adulta temprana. Esta debilidad progresa en el tiempo y puede llegar a provocar un deterioro en el desarrollo de las habilidades motoras, como gatear, caminar o moverse. Algunos pacientes con esta patología manifiestan dificultades en la respiración, debilidad de los músculos oculares (caída de párpados), pueden presentar anomalías en los pies (*pie cavo*) y una curvatura anormal de lado a lado de la columna vertebral (escoliosis) (Romero 2010, Ceyhan et al., 2013; Jungbluth et al., 2014). Histológicamente, las biopsias musculares de pacientes con MCN se caracterizan por un gran número de miofibras con núcleos centrales, en lugar de su localización normal que es periférica (Agrawal et al , 2014).

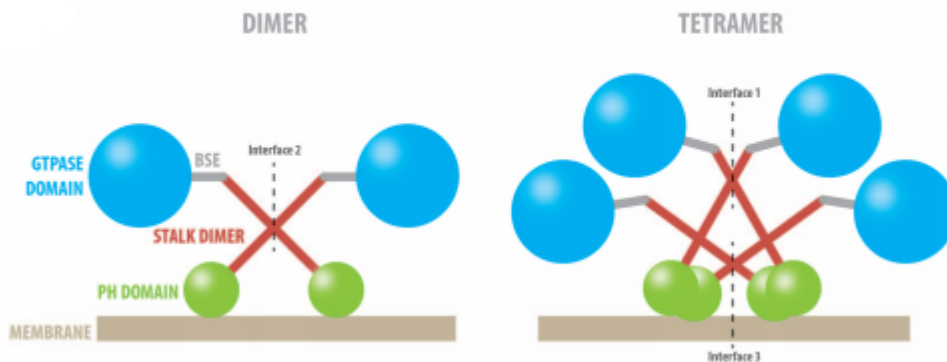
Varias mutaciones en DNM2 se han descrito como causantes de MCN, la mayoría de ellas son formas autosómicas dominantes de la enfermedad en adultos (González-Jamett et al . , 2013; González-Jamett et al., 2014). Mutaciones en DNM2 también pueden causar casos más severos de inicio neonatal. La mayoría de las mutaciones en DNM2 causantes de MCN se distribuyen en los dominio medio y PH de dinamina-2 (González-Jamett et al. , 2013) .Varios estudios *in vitro* sugieren que tales mutaciones aumentan la actividad GTP-asa basal de dinamina-2 y su capacidad de oligomerización (Wang et al., 2010; Kenniston et Lemmon, 2010), lo que sugiere que las mutaciones DNM2-MCN podrían inducir una ganancia de función. Sin embargo, esta proposición no se ha demostrado en células de modelos animales y/o en pacientes (Buono et al., 2018).

Hasta la fecha, los informes epidemiológicos sobre MCN proporcionan datos de incidencia y prevalencia que son limitados. Según Vandermissen y colaboradores (2018), quienes publicaron un modelo estadístico predictivo para estimar la incidencia/prevalencia de la MCN, la incidencia de nuevos casos de MCN según la causa genética alcanza un 45% para los casos asociados a mutaciones en el gen MTM1, 15% para los casos asociados a mutaciones en DNM2 ; aproximadamente entre un 10-15% causado por mutaciones en RYR1, menos del 5% para los casos asociados a mutaciones en BIN1 y 20% de mutaciones no identificadas (Vandermissen et al., 2018).

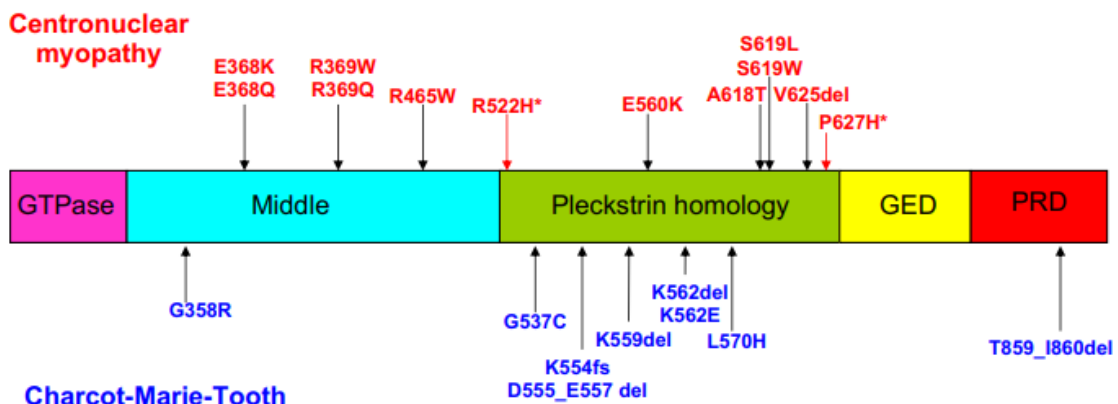
DE acuerdo al estudio de Böhm y colaboradores en el 2020, la incidencia de MCN expresada como recién nacidos afectados por cada millón (millones) de nacidos (en baso a los datos obtenidos para EE.UU, Europa, Australia y Japón) alcanza los siguientes valores.

17 por millón para la MCN asociada a mutaciones en MTM1 , 2 por millón para la MCN ligada a mutaciones en DNM2, 1 por millón relacionada con mutaciones BIN1 y 2 por millón para la MCN ligada a mutaciones en RYR1. Un 25% del total de mutaciones causantes de MCN ligada a DNM2 corresponde a la mutación p. R465W (Böhm et al.; 202)

A



B



(A) **Figura 1: Dominios y organización estructural de las dinaminas** Representaciones esquemáticas de dímeros y tetrameros de dinaminas que muestran las interfaces necesarias para su auto-ensamblaje

(Arriagada et al. , 2020). **(B)** Esquema de la estructura primaria de dinamina-2 destacando la ubicación de las mutaciones reportadas asociadas con la miopatía centronuclear (arriba) y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (abajo). La proteína consta de cinco dominios. En el extremo amino-terminal se encuentra el dominio GTPasa responsable de la hidrólisis de GTP. El dominio medio es esencial para la localización centrosomal de dinamina-2 el cual también está involucrado en el autoensamblaje de dinamina. El dominio de homología de pleckstrina (PH) es un sitio de unión de lípidos, donde se une con fosfolípidos específicos y, por lo tanto, media las interacciones de dinamina con las membranas. El dominio efector de la actividad GTPasa (GED) participa en las interacciones proteína-proteína, es un regulador positivo de la actividad GTPasa y también es esencial para el autoensamblaje de dinamina. El dominio rico en prolina en el extremo Carboxilo-terminal (PRD) media las interacciones con muchas proteínas efectoras, incluidas proteínas endocíticas (como anifisina) y el citoesqueleto de actina. También se comporta como un regulador positivo del autoensamblaje de dinamina y de la hidrólisis de GTP (Susman et al., 2010).

1.3 Estudios en tejido humano y en modelos animales de MCN.

Se ha demostrado que las mutaciones en DNM2 causantes de MCN producen desorganización del sarcómero, la unidad funcional de las fibras musculares donde ocurre la contracción (González-Jamett et al. , 2018). Mutaciones ligadas a MCN también producen alteraciones en la organización de la unión neuromuscular en ratón (Tinelli et al. , 2013) y en músculos esqueléticos del pez cebra (Bragato et al., 2016) así como fragmentación de los túbulos transversales en los músculos de *Drosophila melanogaster* (Chin et al. , 2015) lo que sugiere que estas mutaciones afectan procesos que son dependientes del remodelamiento de membranas.

González y colaboradores en el 2017 demostraron que la actividad GTPasa de dinamina-2 promueve la polimerización *de novo* y regula la organización del citoesqueleto de actina en células musculares. En este trabajo demostraron además que la actividad GTP-asa de dinamina-2 es necesaria para promover la inserción del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana plasmática de células musculares (Gonzalez-Jamett et al, 2017). Ambas funciones se vieron afectadas en células musculares que expresaban mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN, lo que sugiere que **defectos en la dinámica de actina y en el tráfico de proteínas de membrana** son mecanismos patológicos de la enfermedad. De

ser así, en todos los tejidos donde se expresa dinamina-2 estos procesos podrían estar afectados.

Si bien MCN se ha descrito como una patología intrínsecamente muscular, distintos reportes de casos clínicos muestran que pacientes con MCN exhiben, además del daño muscular, **defectos cognitivos que se manifiestan con problemas de aprendizaje en la niñez** (Fisher et al ., 2006; Jeannet et al ., 2004), **coeficiente intelectual limitado** (Bohm et al., 2012) e **incluso “retardo mental”** en algunos casos (Echaniz-Laguna et others , 2007). Esto sugiere que las mutaciones en DNM2 son capaces de causar defectos sinápticos aunque los mecanismos asociados nunca han sido estudiados.

1.4 Rol de dinamina-2 en sinapsis centrales

En el sistema Nervioso Central de mamíferos se encuentran las 3 isoformas de dinamina clásicas. Dinamina-1 y 2 se encuentran principalmente en amígdala, núcleo caudado, cerebelo, córtex cingulado, globo pálido, hipocampo, hipotálamo, médula oblongada, lóbulo occipital, lóbulo parietal, día pineal, noche pineal, pons, corteza prefrontal, médula espinal, núcleo subtalámico, lóbulo temporal y tálamo (Romeu et Arola, 2014). Dinamina-1 al parecer se encuentra principalmente de manera pre-sináptica, enriquecida en terminales nerviosos presinápticos del sistema nervioso central (Ferguson et al., , 2007), mientras que dinamina-3 juega un papel predominante de manera post sináptica (Raimondi et al., 2011) y dinamina-2 se ha encontrado tanto de manera pre sináptica como post sináptica, aunque en la post-sinapsis su expresión está enriquecida (Okamoto et al ., 2001)

En la pre-sinapsis dinamina-2 participa en el reciclaje de vesículas sinápticas (Tanifuji et al 2013), así como en la regulación del proceso de neurosecreción (Wong et al., 2015, Gonzalez-Jamett et al., 2013). En la post-sinapsis dinamina-2 podría ser un regulador relevante del número de receptores de membrana disponibles para los procesos de señalización, controlando principalmente la internalización de receptores vía endocitosis dependiente de clatrina (EDC). De hecho, la endocitosis se vincula directamente con el

control del número de receptores disponibles para su activación en las células donde se expresan (Sorkin et Von Zastrow, 2009) y consecuentemente se ha relacionado la actividad GTP-asa de dinamina-2 con la modulación de la internalización de distintos receptores (McMahon et Boucrot 2011).

Debido a que dinamina-2 se encuentra enriquecida en la densidad post-sináptica (Okamoto et al., 2001) su actividad GTP-asa es un potencial regulador del recambio de receptores de membrana en la post-sinapsis, tal como se ha visto para receptores dopaminérgicos (Kabbani and others ., 2004), receptores de cannabinoides (McFaland et al ., 2008) y receptores glutamatérgicos tipo AMPA (Carroll et al., 1999). Respecto a éstos últimos, Carroll y colaboradores en el año 1999 evaluaron el rol de dinamina-2 en la internalización de receptores AMPA (AMPA) en neuronas hipocámpales en cultivo. Los autores demostraron que la expresión de una mutante de dinamina-2 que es incapaz de unir e hidrolizar GTP (K44A) disminuye la endocitosis de AMPAR lo que sugiere un rol relevante de dinamina-2 en la transmisión sináptica excitatoria al controlar la disponibilidad de AMPAR en la post-sinapsis. Trabajos posteriores a los de Carroll en 1999 también apoyan esta idea. Jaskolski y colaboradores en el año 2009 demostraron que dinamina-2 está involucrada en la inserción de AMPAR en las densidades post-sinápticas (DPSs) al promover su difusión lateral desde el eje dendrítico hacia la espina (Jaskolski et al., 2009) y que también participa del reciclaje endocítico de AMPAR desde las zonas endocíticas (EZs) adyacentes de vuelta a las DPSs en respuesta a cambios en la actividad neuronal (Zheng et al., 2015). Al parecer, dinamina-2 es un importante regulador de la disponibilidad de AMPAR en las sinapsis excitatorias al participar en distintas etapas del tráfico del receptor hacia y desde las DPSs. A este respecto, los AMPAR son los principales mediadores de la neurotransmisión excitatoria rápida en el cerebro de los mamíferos y transducen la unión del glutamato, de liberación presináptica, a la apertura de un canal catiónico transmembrana dentro de la DPS (Chen et al; 2017) la cual gatilla cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} que son el sustrato molecular para el almacenamiento de información, aprendizaje y para la consolidación de la memoria (Huganir et Nicoll, 2013). Por lo tanto, la regulación del tráfico

de AMPAR (**figura 2**) y de su densidad en las DPSs es un mecanismo clave para la función sináptica y los procesos cognitivos. Si es que el tráfico de AMPAR en sinapsis excitatorias es un mecanismo afectado en cerebros donde se expresan mutaciones en DNM2 esto podría explicar algunos de los defectos cognitivos descritos en pacientes con MCN (Jeannet et al., 2004; Fisher et al., 2006; Echaniz-Laguna et al., 2007; Bohm et al., 2012).

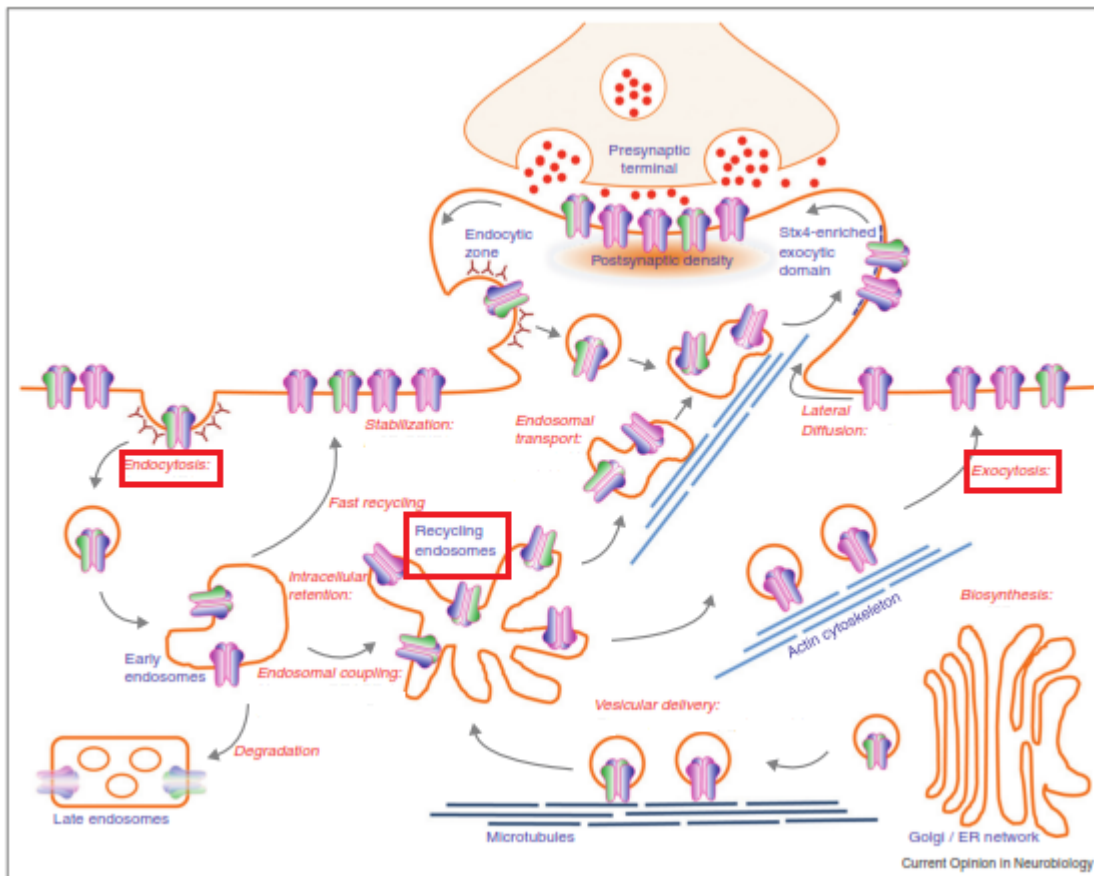


Figura 2: Rutas del tráfico de AMPAR en la densidad postsináptica. Los AMPAR se ensamblan en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en el soma (y dendritas) y trafican hacia la espina y la densidad postsináptica de un modo dependiente de la red de microtubulos y del citoesqueleto de actina. Una vez allí los AMPAR están sujetos a un reciclaje constitutivo vía endosomas. La internalización de los receptores mediante endocitosis mediada por clatrina requiere de la actividad GTP-asa de dinamina. Una vez endocitados los AMPAR pueden volver a la membrana plasmática a través de los endosomas de reciclaje o ser enviados a degradación lisosomal via endosomas tardíos. En todos estos estadios podría participar dinamina-2 y son potenciales puntos defectuosos en tejidos donde se expresan las mutaciones causantes de MCN. Un tráfico de AMPAR aberrante podría causar defectos en la transmisión y plasticidad sináptica y consecuentemente en el aprendizaje y consolidación de la memoria. Los procesos destacados en los rectángulos rojos son potenciales sitios de acción de dinamina 2 que podrían verse afectados por las mutaciones causantes de MCN impactando finalmente en la densidad de los receptores en las densidades post-sinápticas (Figura adaptada de Anggono y Huganir, 2012).

Otro aspecto fundamental para la estructura y función sináptica en el que dinamina-2 está potencialmente involucrada es la organización y el remodelamiento de actina. Aspectos tan relevantes como la morfología neuronal, así como el tamaño y la densidad de las espinas dendríticas en la post-sinapsis excitatoria son procesos críticamente dependientes de la integridad del citoesqueleto de actina (Fortin et al., 2012; Hanley 2014) y son moduladores directos de la función sináptica excitatoria (Yan et al., 2016). Más aún, la red de actina en la densidad post-sináptica modula el tráfico de AMPAR (Hanley, 2014). Considerando el rol fundamental que tiene dinamina-2 en el remodelamiento de actina en distintos tejidos y considerando que mutaciones en DNM2 causantes de MCN producen alteraciones en la dinámica de actina (Gonzalez-Jamett et al., 2017) es posible suponer que la organización de actina y los procesos que dependen de ésta en los tejidos sinápticos también se ven afectados en el contexto de la MCN lo que podría asociarse con los defectos cognitivos descritos en pacientes.

1.5 Función de las espinas dendríticas en las sinapsis excitatorias

Las espinas dendríticas son proyecciones enriquecidas en actina las cuales reciben entradas desde los terminales nerviosos de las neuronas pre-sinápticas (Adrian et al, 2017). Según Rochefort en el 2012 “las espinas dendríticas son pequeñas proyecciones del eje dendrítico de varios tipos de neuronas que reciben entradas excitatorias de varios axones”. (Rochefort et al 2012). El descubrimiento y nombre de las espinas dendríticas se debe al neurocientífico español Santiago Ramón y Cajal, utilizando la tinción de Golgi para la visualización de células de Purkinje (Ramón et Cajal, 1888), aunque la evidencia más certera sobre su función sináptica no llegó sino hasta la existencia de la microscopía electrónica a mediados del 1900 (Gray,1959). Estas estructuras están compuestas de actina filamentosa (F-Actina) y el balance dinámico entre F-actina y los monómeros de actina globular (G-actina) es fundamental para los cambios estructurales (morfológicos), la maduración y la estabilidad de las espinas dendríticas. El crecimiento simple y la expansión del volumen de las espinas inmaduras puede explicarse por la polimerización y “empaquetamiento” de actina, donde los reguladores de la nucleación, polimerización y de-polimerización de actina

tienen un rol clave (Govek et al, 2005). Entre estos reguladores se encuentran pequeñas Rho-GTPasas como RhoA, Cdc42 y Rac-1 que regulan la dinámica de actina a través de múltiples efectores, incluidos NWASP, WAVE y la vía LIM quinasa-cofilina, los que son importantes reguladores de la formación de filopodios y del desarrollo del eje dendrítico (Govek et al, 2005)

Las espinas dendríticas son parte importante de la estructura post sináptica y su morfología es variada dependiendo del grado de maduración que tengan. La mayoría de las sinapsis excitatorias en los cerebros maduros de mamíferos ocurren en las espinas (Hering et Sheng, 2001). Por lo general, se forma una sola sinapsis glutamatérgica en la cabeza de la espina, aunque algunas pueden conectar con múltiples terminales presinápticos (Yuste, 2010). El citoesqueleto en las espinas está formado principalmente por F-actina que sirve tanto como marco estructural así como principal regulador del tráfico de proteínas sinápticas hacia y desde las DPSs (Bosch et Hayashi, 2012). La DPS se compone de múltiples proteínas que se unen entre sí a través de interacciones específicas dominio-dominio, formando una estructura en forma de malla organizada en capas consecutivas (**figura 3**). Estas proteínas incluyen receptores para neurotransmisores, proteínas de andamiaje que estabilizan esos receptores, moléculas de señalización, canales iónicos y componentes del citoesqueleto (Sheng et Hoogenraad, 2007). Las DPSs, a través de sus componentes, transmiten y procesan señales sinápticas y pueden sufrir cambios estructurales para codificar y almacenar información (Kennedy, 2000). Dos tipos de receptores ionotrópicos de glutamato, los receptores AMPA (AMPA) y los receptores NMDA (NMDAR) presentes en las DPSs (Kharazadia et Weinberg, 1997) median casi toda la transmisión sináptica excitatoria en el cerebro mamífero.

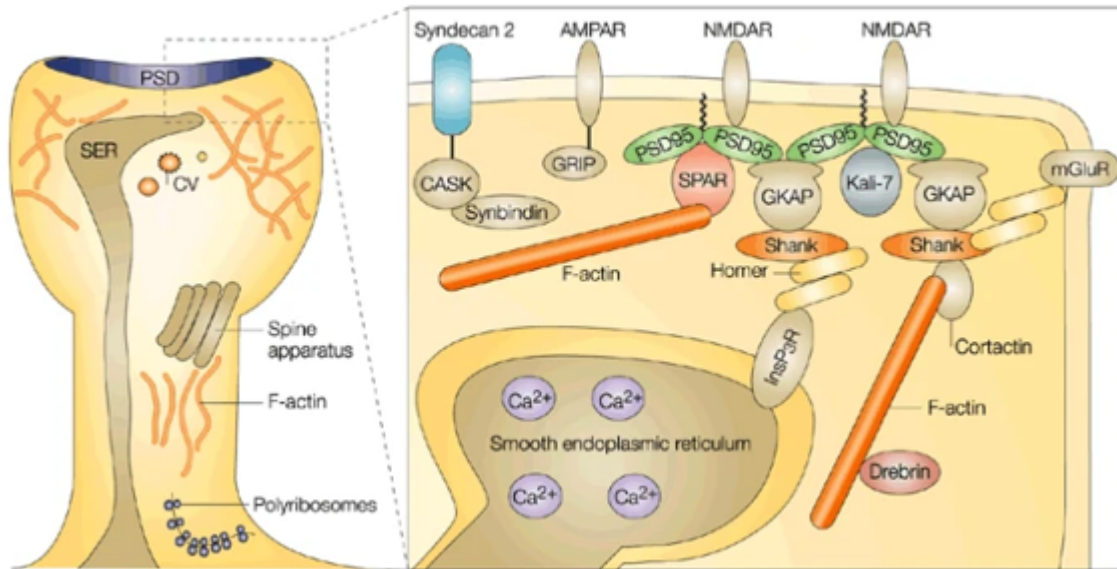


Figura 3: Estructura y composición proteica de una espina sináptica madura. En la figura se muestra una espina dendrítica madura con morfología tipo “mushroom”. En ella se puede observar que contiene organelos tales como Reticulo endoplasmático liso (SER) que se extiende hacia la espina desde el eje dendrítico. Este SER funciona como depósito de calcio intracelular, el que puede ser liberado en respuesta a alguna estimulación sináptica. Se expone también la DPS con proteínas de andamio tales como Shank, Homer y el receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3R) del SER.. Las vesículas recubiertas de clatrina (CV) se encuentran no solo dentro de la cabeza de la espina, sino también cerca o aparentemente fusionándose con la membrana sináptica. Se han detectado polirribosomas en ejes dendríticos, a menudo en la base de las espinas y ocasionalmente extendiéndose en las espinas, lo que indica que la traducción de proteínas podría ocurrir dentro del compartimento postsináptico. En la Caja lateral derecha, se ilustran proteínas específicas e interacciones proteína-proteína dentro de la DPS, tales como GRIP (proteína que interactúa con el receptor de glutamato) y CASK (serina proteína quinasa dependiente de calcio / calmodulina) y PSD-95 que se unen a AMPAR. F-actina, actina filamentososa; GKAP (proteína asociada a guanilato quinasa), Kali-7, Kalirin-7; mGluR (receptor metabotrópico de glutamato) y receptor de NMDA (adaptada de Hering et Sheng, 2001)

Existen diferentes formas de espinas dendríticas las cuales se han clasificado en: **thin, stubby, mushroom y forma de copa (figura 4)**, esta clasificación basada en la forma y longitud de sus cabezas y cuellos (Arellano et al, 2007). Para mayor detalle referirse al anexo 1. Las primeras protrusiones dendríticas en establecerse son los filopodios, que son estructuras inmaduras y relevantes ya que desde éstas emergen las espinas dendríticas, siendo la espina mushroom la espina madura por excelencia, que juega un rol importante en la sinapsis y en la mantención de receptores en la DPS (Bosch et Hayashi, 2012). Los estudios de imágenes de células vivas muestran claramente que las espinas son muy diferentes y experimentan una transformación reversible entre sus morfologías,

transitando desde estructuras filopoidales hasta formas tipo mushroom en una escala de tiempo de minutos a horas (Ebrahimi et Okabe, 2014). El volumen de la cabeza de la espina está correlacionado con la composición general de la DPS y con el número de vesículas sinápticas en la pre-sinápsis (Rochefort et al 2012). La morfología de las espinas es un determinante de la fuerza, estabilidad y transmisión sináptica al controlar variables como señales de Ca^{2+} (Bloodgood et Sabatini, 2007) la cantidad de receptores disponibles en la DPS y la capacidad de cambiar su forma y tamaño en el tiempo (Sala et Segal, 2014).

El crecimiento y desarrollo de las espinas dendríticas, y por lo tanto la formación de las sinapsis, son mecanismos directamente dependientes de la actividad neuronal. Las espinas dendríticas son las estructuras físicas donde tienen lugar algunos de los procesos moleculares que facilitan el aprendizaje y la memoria (Phillip et Pozo, 2015).

Los cambios físicos y funcionales que experimentan las sinapsis en respuesta a los cambios en la actividad neuronal se conocen como **plasticidad sináptica** (Basu et Lamprecht, 2018). Las formas más estudiadas de plasticidad sináptica son la **potenciación a largo plazo (LTP)** y la **depresión a largo plazo (LTD)** de la fuerza sináptica (Basu et Lamprecht, 2018). Se ha descrito que durante la LTP las espinas dendríticas aumentan su tamaño en segundos, mientras que durante la LTD las espinas se retraen (Sala et Segal, 2014). Cuanto más estímulo y de mayor intensidad reciben las espinas, más grandes, más estables y longevas se vuelven (en contraste con las espinas inmaduras, que son más transitorias). Se cree que las espinas grandes, del tipo mushroom son uno de los correlatos físicos de la memoria. (McCann et Ross, 2017).

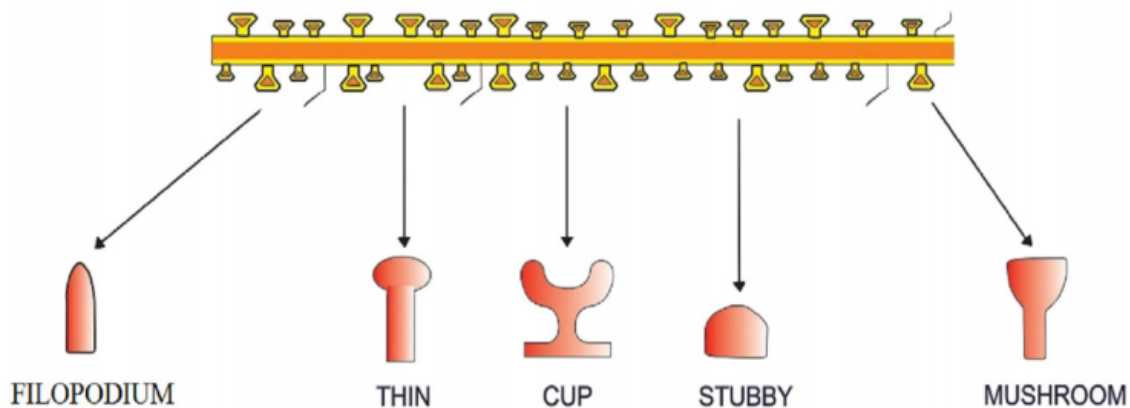


Figura 4: Tipos de espinas según sus morfologías (Extraído de Chidambaram et al 2019).

El citoesqueleto de actina está involucrado en la morfogénesis de las espinas dendríticas. Las espinas maduras contienen una mezcla de filamentos de actina ramificadas y lineales en su base, cuello y cabeza. El cuello de la espina contiene filamentos lineales y ramificados, mientras que la red ramificada de filamentos de actina es una característica dominante de la cabeza de la espina dendrítica (Korobova et Svitkina, 2010). El citoesqueleto de actina está íntimamente involucrado en la formación y eliminación, estabilidad, motilidad y morfología de las espinas dendríticas.

La ampliación en el ápice de una protrusión filopoideal puede ocurrir a través de la ramificación de filamentos de actina, dependiente del complejo nucleador de actina Arp2 / 3, lo que impulsaría la expansión de la cabeza (Ryu et al., 2006). El diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas sufre constantes cambios dependientes del remodelamiento de actina los que son regulados por cambios en la actividad neuronal (Tada et Sheng, 2006).

Ya que la organización, estabilización y remodelamiento de actina son finamente modulados por la actividad GTP-asa de las dinaminas (Mooren et al., 2009; Gu et al., 2010; Yamada et al., 2013; Yamada et al., 2016; González-Jamett et al., 2017; Zhang et al., 2020) **es probable que la morfología de las espinas dendríticas requiera de la correcta función de las dinaminas en las sinapsis, sin embargo, la importancia de dinamina-2 en este punto aún no ha sido demostrada.**

1.6 Espinas Dendríticas y su relación con neuropatologías.

Existen estudios que revelan una correlación entre defectos en la densidad y la clasificación morfológica de las espinas dendríticas con la aparición de neuropatologías en las que se afecta la conectividad, transmisión y plasticidad sináptica dando lugar a problemas de aprendizaje y memoria. Por ejemplo, en la patología neurodegenerativa del Alzheimer (EA), donde la sintomatología es demencia y pérdida de memoria, algunos estudios sugieren que la pérdida de espinas funcionales podría ser significativa y que contribuiría como un factor clave a la disfunción cognitiva en la enfermedad (Terry et al., 1991). Los estudios de Serrano-Pozo en el 2011 demostraron que existe una pérdida del 45% de las espinas dendríticas en hipocampo y neo-corteza en pacientes con EA en comparación con pacientes controles sanos de la misma edad (Serrano-Pozo, et al., 2011). Otras patologías del sistema nervioso tales como la esquizofrenia (Garey et al., 1998; Glantz y Lewis, 2001), epilepsia (Swann et other, 2000) y accidente vascular encefálico (Hori et Carpenter, 1994; Akulinin et others 1997) se asocian también con pérdida de espinas dendríticas y cambios en su morfología en hipocampo y corteza, áreas relevantes para el aprendizaje y memoria.

Claramente, las condiciones neuropatológicas que conducen a la pérdida de memoria y a deterioros cognitivos se correlacionan con cambios estructurales en las espinas dendríticas que pueden dar lugar a defectos en la transmisión y plasticidad sináptica. Considerando que la morfología de las espinas determina entre otras cosas el número de receptores que pueden estar disponibles en las DPSs (Sala et Segal, 2014), modificaciones en la densidad y morfología de las espinas dendríticas potencialmente modificaran la conexión y la fuerza sináptica pudiendo explicar defectos cognitivos. Ya que la estructura de la espina dendrítica depende de la dinámica del citoesqueleto de actina (Basu et Lampretch, 2018) y ya que la organización y el remodelamiento de actina es un proceso significativamente afectado en el contexto de la MCN causada por mutaciones en dinamina-2 (Gonzalez-Jamett et al., 2017) **es factible suponer que los defectos cognitivos descritos en pacientes con MCN ligada a DNM2 (Fisher et al ,2006; Jeannet et al, 2004; Bohm et al., 2012; Echaniz-Laguna et al**

2007) estén relacionados con cambios en la estructura y función sináptica. Sin embargo hasta la fecha esto no ha sido demostrado.

A la luz de los antecedentes aquí expuestos nos planteamos la siguiente hipótesis:

2. Hipótesis.

“Mutaciones causantes de MCN afectan la función sináptica de dinamina-2 produciendo defectos en la morfología y densidad de las espinas dendríticas y modificando la disponibilidad de AMPAR en las PSDs en neuronas piramidales del hipocampo y corteza de un modelo murino de la enfermedad”

Hipótesis nula (Ho): “Mutaciones causantes de MCN no afectan la función sináptica de dinamina-2 por lo que no modifican la disponibilidad de AMPAR en las PSDs, no producen defectos en la morfología y ni en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales del hipocampo y corteza **de un modelo murino de la enfermedad”**

En este trabajo se abordó el estudio de sinapsis excitatorias de hipocampo y corteza pre-frontal debido a que éstas constituyen circuitos relativamente bien entendidos en cuanto a su relación con los procesos de aprendizaje, adquisición y consolidación de la memoria (Citri et Malenka, 2008; Angonno et Hugarir, 2012).

El modelo experimental sobre el cuál se estudió el rol de dinamina-2 en estos procesos y el impacto de las mutaciones causantes de MCN es un ratón knock-in (KI) para la mutación p.R465W localizada en el dominio medio de dinamina-2 (**Figura 1**), la cual es la mutación más común en pacientes con MCN (González-Jamett et al 2018). El ratón heterocigoto (HTZ) para la mutación recapitula la mayoría de los signos de la enfermedad, mientras que ratones homocigotos para la mutación no son viables y mueren a las pocas horas o días de nacidos (Durieux et al, 2010; Durieux et al., 2012).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar el impacto de la mutación p.R465W en dinamina-2 sobre la densidad y la morfología de las espinas dendríticas y sobre la expresión de receptores AMPA en sinapsis excitatorias hipocampales y corticales de un modelo murino de MCN.

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1.- Evaluar la densidad y la morfología de las espinas dendríticas en neuronas hipocampales y corticales de un modelo murino de MCN y su contraparte silvestre (WT) utilizando la tinción de Golgi

3.2.2.- Evaluar la expresión de receptores AMPA en sinaptoneurosomas aislados a partir de tejido hipocampal y cortical de un modelo murino de MCN y su contraparte WT mediante densitometría por western blot.

4. Metodología

4.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron animales WT y heterocigotos (HTZ) para la mutación p.R465W de a lo menos 6 meses de edad debido a que a esta edad ya se ha descrito que los animales HTZ manifiestan la mayoría de los signos histopatológicos de la MCN (Durieux et al., 2010). Los animales fueron mantenidos en dependencias del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas, a temperatura constante de 22°C, comida y agua *ad libitum*. Todas las actividades de experimentación y de manipulación con los animales se realizaron en base y de acuerdo a los protocolos aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Valparaíso (CICUAL, Acta de Aprobación BEA 131-18).

4.2. Tinción de Golgi.

Para evaluar morfología neuronal y posibles modificaciones estructurales en densidad y tipo de espinas dendríticas se obtuvieron muestras de cerebros de ratones de 6 Meses HTZ y WT. Los cerebros se dividieron en dos hemisferios. Uno de los hemisferios se mantuvo en condiciones de reposo y el otro hemisferio fue estimulado químicamente para la inducción de LTP (chLTP). Para la condición reposo, los cerebros fueron mantenidos en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, mM: 124 429 NaCl, 26 NaHCO₃, 1.23 NaH₂PO₄, 10 D-glucosa, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl, 3 piruvato). Para la condición chLTP los cerebros fueron mantenidos por 20 min en ACSF y luego en ACSF sin Mg²⁺ (para pre-acondicionar receptores NMDAR) por 20 min. Posteriormente los cerebros fueron superfundidos con ACSF sin Mg²⁺ en presencia de 600 uM de Glicina (co-agonista de NMDAR), 50 uM de *picrotoxina* PTX (inhibidor de la transmisión inhibitoria) y 3 uM de estriquina (inhibidor de receptores glicinérgicos) por 20 minutos. Finalmente los cerebros sometidos a chLTP se mantuvieron en ACSF normal (solución de reposo) durante 1 hr para permitir la plasticidad sináptica estructural. Luego, los cerebros fueron teñidos con la tinción de Golgi, usando un

kit comercial (FD RAPID GOLGI STAIN TM, FD Neurotechnologies , Inc) siguiendo las indicaciones de los fabricantes del kit. Posteriormente los cerebros fueron seccionados en un criostato a -20°C en medio de congelamiento OCT obteniendo rebanadas de 150μ de espesor las que se montaron en porta-objetos tratados con gelatina. Los cortes teñidos y montados se visualizaron mediante un microscopio de campo claro y las neuronas impregnadas con la tinción de Golgi fueron fotografiadas usando un microscopio Leica DM 500 con un sistema de cámaras (ICC50W Leica) con un Objetivo de 63X (63x/1,40 de inmersión en aceite, HCPLApo, Leica), usando el software de adquisición Leica application Suite, Versión Las Ez. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ.

4.3. Análisis morfométrico de las espinas dendríticas

Las muestras analizadas se focalizaron en la búsqueda de neuronas en dos estructuras: corteza, principalmente se analizaron neuronas de la capa cortical 3 y 5 ya que ahí se encuentran los cuerpos neuronales de las neuronas piramidales (Kandel, 1997) e hipocampo, principalmente neuronas localizadas en CA1 y CA3 de esta estructura, esto ya que la sinapsis de estas neuronas se relacionan con los procesos de aprendizaje (Gruart et al., 2006). De cada neurona se fotografiaron al menos cuatro regiones de interés (ROIs) correspondientes a segmentos dendríticos apicales de entre 10 y 20μ de largo. En cada uno de los ROIs se midió el largo de las espinas y el diámetro de las cabezas y en base a esas mediciones las espinas fueron clasificadas manualmente según su morfología en “branched”(forma de copa), “mushroom”, “stubby”, “thin” o en protrusiones tipo “filopodio” siguiendo criterios reportados previamente (Harris et al., 1992; Risher et al., 2014) . Para mayor detalle ver anexo 1 . Todas las mediciones fueron realizadas en “ciego” para el genotipo de los animales desde los que se obtuvieron los cerebros.

4.4. Evaluación de la expresión de AMPA en Sinaptoneurosomas

Animales WT y HTZ de más de 6 meses de edad fueron sacrificados, sus cerebros aislados y divididos en 2 hemisferios para la obtención de sinaptoneurosomas siguiendo el protocolo

descrito por Villasana y colaboradores (Villasana et al., 2006). Uno de los hemisferios correspondió a la condición reposo y el otro hemisferio a la condición chLTP. Para inducir chLTP se utilizó el protocolo descrito anteriormente para la tinción de Golgi. Los cerebros en reposo se mantuvieron paralelamente en ACSF completo. Luego los cerebros fueron disectados para aislar hipocampo y corteza; luego fueron congelados con nitrógeno líquido, pulverizados en un mortero de porcelana y luego homogenizados en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Una porción de los homogenizados fue almacenada para analizarla como Fracción H (de homogenado). La solución restante fue filtrada a través de un filtro de poros de 100 μm de diametro (2 veces) y posteriormente a través de un filtro con poros de 5 μm de diametro. El filtrado resultante se resuspendió en Buffer Solution (0,32 M de sucrosa en 1mM NaHCO_3 , pH 7,4) y se obtuvo la fracción Sinaptoneuroma (fracción S). Las fracciones S fueron diluidas en buffer de carga (5X) con azul de bromofenol y sometidas a electroforesis SDS-PAGE en geles al 10% para el gel separador y 5% para el gel concentrador. Las proteínas electroforadas fueron transferidas a membranas de PVDF (0,45 μm), bloqueadas con BSA al 5% en PBS 1X (pH 7,4) o con leche descremada al 5% en TBS-T 0.05% (pH 7,4) Estas membranas fueron inmuno-marcadas con anticuerpos específicos contra AMPAR-total (GluR1), sinaptofisina, proteína enriquecida en vesículas sinápticas, la cual se utilizó como marcador de la fracción S y α -Tubulina como control de carga.

4.5. Análisis estadísticos

Todos los datos son mostrados como el promedio \pm error estándar (SEM). Los datos fueron sometidos a tests de normalidad (Kolmogorov-Smirnoff) utilizando el software Graph-Pad. Los datos normales fueron sometidos a tests parametricos para evaluar significancia (t-de student de 2 colas) mientras que los datos que no pasaron los test de normalidad fueron sometidos a test no parametricos para evaluar significancia (Kruskal-Walis). Se consideró diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas en neuronas de ratones HTZ

Para evaluar si existen diferencias en la densidad, tamaño y/o morfología de las espinas dendríticas entre neuronas piramidales de cerebros de ratones WT y HTZ los cerebros fueron teñidos mediante la tinción de Golgi. La figura 5 muestra fotografías típicas de neuronas corticales de cerebros de ratones adultos HTZ y WT teñidas con la tinción de Golgi.

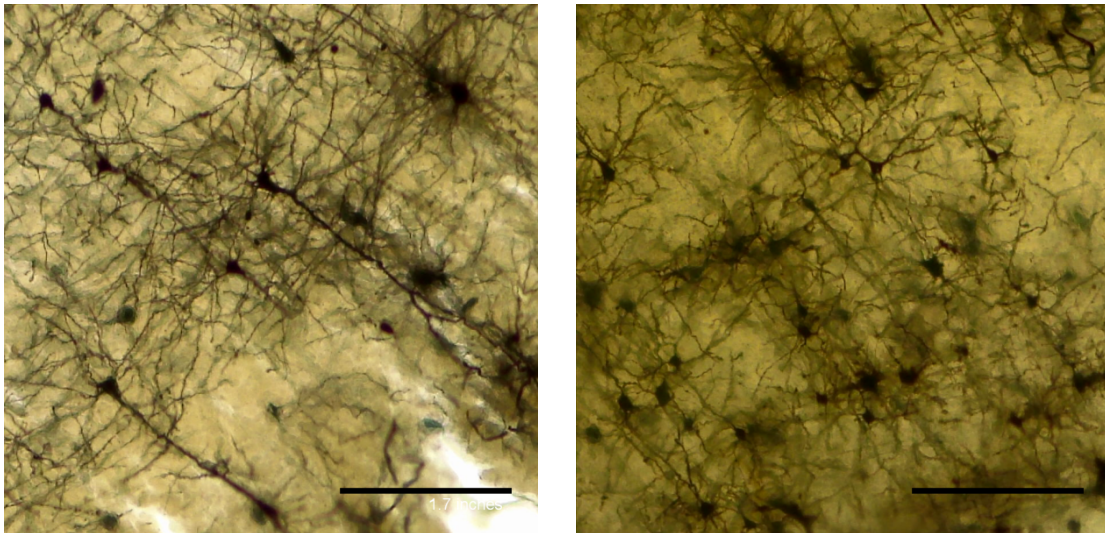


Figura 5: Neuronas piramidales de corteza (capa 3-5) de cerebros WT y HTZ de animales de 6 meses de edad teñidas con la tinción de Golgi (barra de escala = 20 μ m).

Para estimar la densidad de las espinas dendríticas en las distintas condiciones experimentales se fotografiaron segmentos de 10-20 μ m de largo en dendritas apicales de neuronas de hipocampo y corteza. El número de espinas por cada 1 μ m de eje dendrítico corresponde a la densidad de espinas analizada. La figura 6A muestra la densidad de espinas de neuronas hipocampales en reposo. La figura 6B muestra la densidad de espinas de neuronas corticales en reposo. Los resultados muestran que las neuronas hipocampales provenientes de cerebros de ratones HTZ en reposo presentan una reducción significativa

en la densidad de espinas dendríticas comparado con la condición WT reposo. Tal diferencia no se observa entre neuronas corticales en reposo.

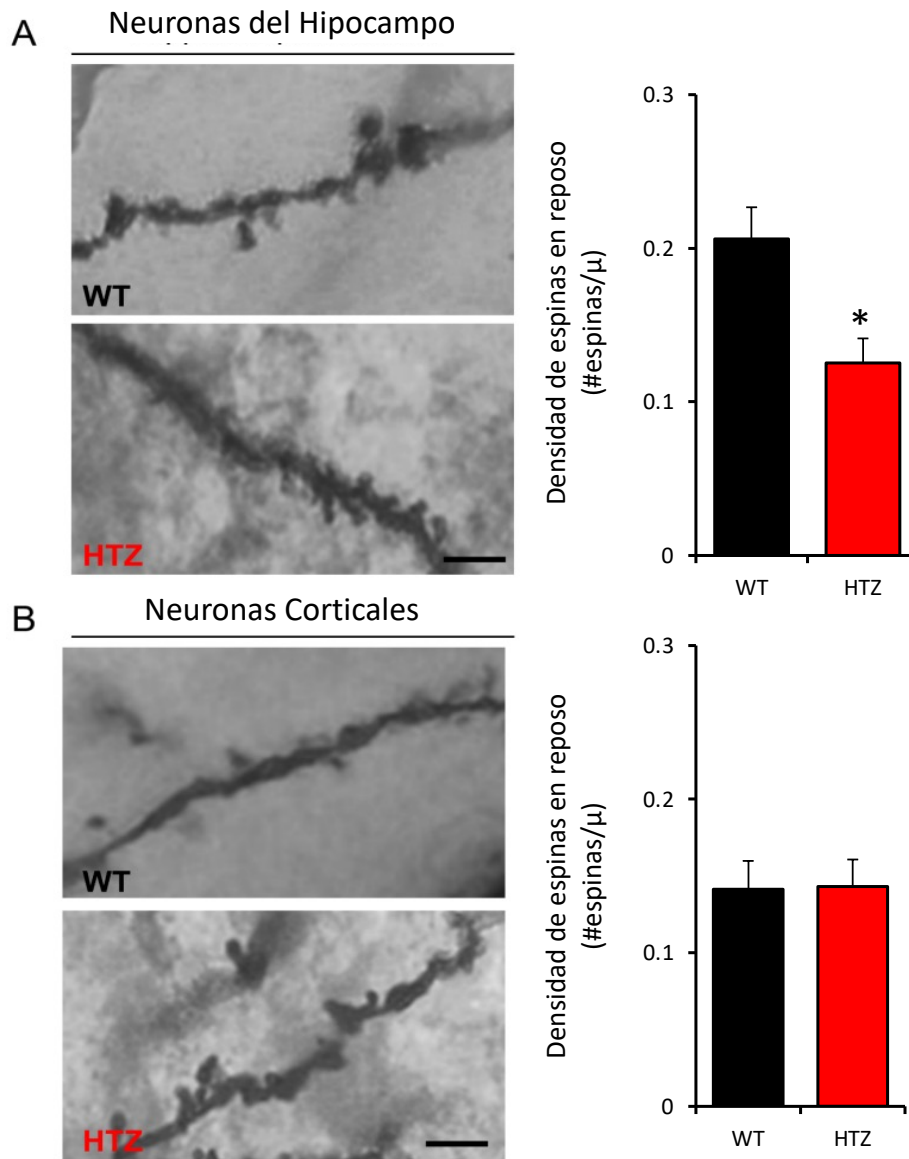


Figura 6: Neuronas hipocampales HTZ exhiben una menor densidad de espinas dendríticas que las neuronas WT en condición de reposo. Neuronas hipocampales (A) y corticales (B) teñidas con Golgi fueron analizadas para medir la densidad de espinas dendríticas en condición de reposo. A la izquierda se muestran segmentos dendríticos representativos. A la derecha se grafica la densidad de espinas como número de espinas promedio por cada 1μ de segmento dendrítico. Barra de escala = 2.5μ . Nótese que en neuronas hipocampales el genotipo HTZ produce una disminución significativa de la densidad de espinas. * $p < 0.05$ respecto a la condición WT.

Similarmente, Como se observa en la figura 7A, luego de realizarse el protocolo de estimulación química para la inducción de LTP, las neuronas piramidales hipocampales del animal HTZ también mostraron una densidad de espinas significativamente menor en comparación con la condición WT. Un resultado similar se observó al comparar neuronas corticales WT y HTZ sometidas a chLTP (figura 7B).

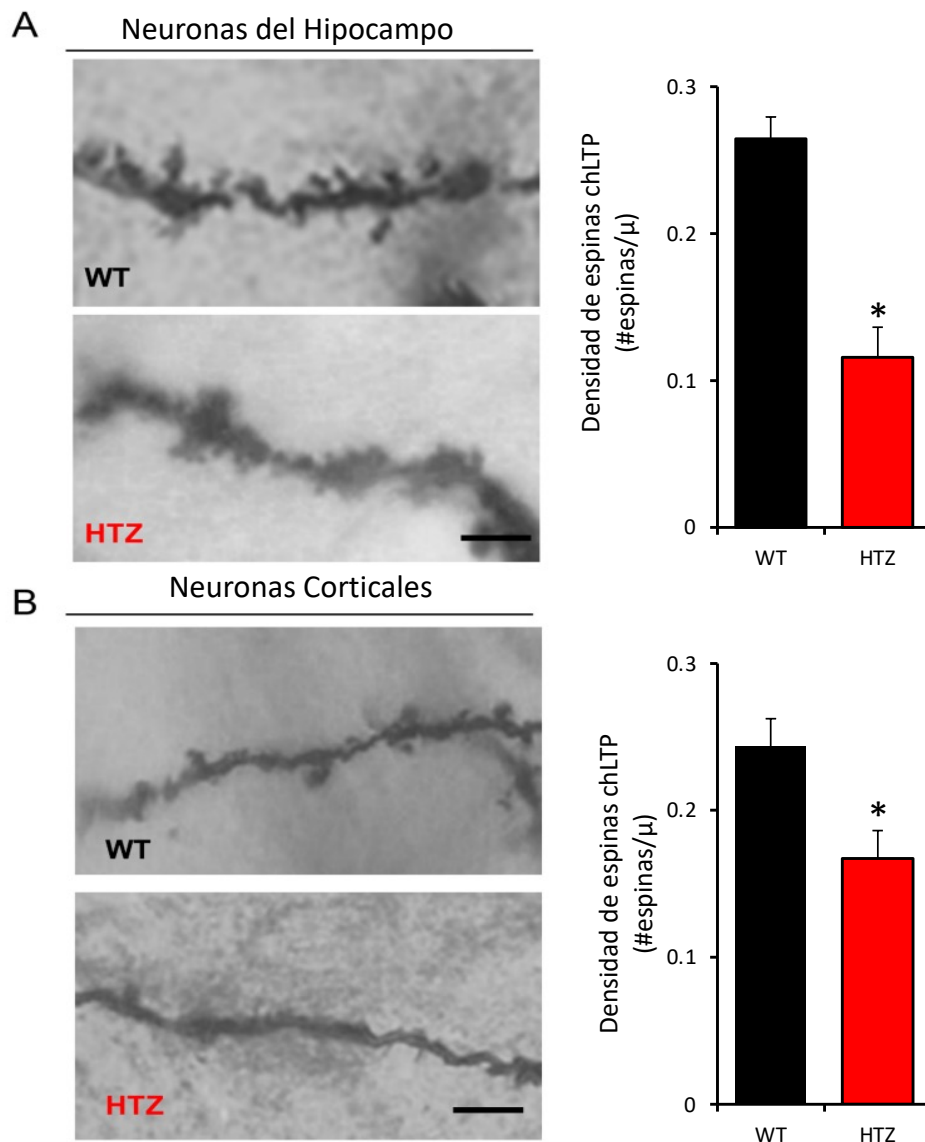


Figura 7: Las neuronas HTZ sometidas a inducción química de LTP exhiben una menor densidad de espinas dendríticas que las neuronas WT. Neuronas hipocampales (A) y corticales (B) teñidas con Golgi fueron analizadas para medir la densidad de espinas dendríticas luego de una inducción química de LTP. A la izquierda se muestran segmentos dendríticos representativos. A la derecha se grafica la densidad de espinas como numero de espinas promedio por cada 1μ de segmento dendrítico. Barra de escala = 2.5μ . Nótese que en

neuronas hipocampales y corticales el genotipo HTZ produce una disminución significativa de la densidad de espinas en respuesta a chLTP. * $p < 0.05$ respecto a la condición WT.

Posteriormente, evaluamos el tamaño y la morfología de las espinas dendríticas incluidas previamente en el análisis de densidad. Se midieron el largo de las espinas y el diámetro de sus cabezas y se cuantificó la razón cabeza/cuello. A partir de estos valores las espinas se clasificaron de forma manual según su morfología en branched (forma de copa), mushroom, stubby, thin o en protrusiones filopoidales siguiendo criterios descritos previamente (Risher et al., 2014). La figura 8 muestra protrusiones dendríticas representativas de cada morfología.

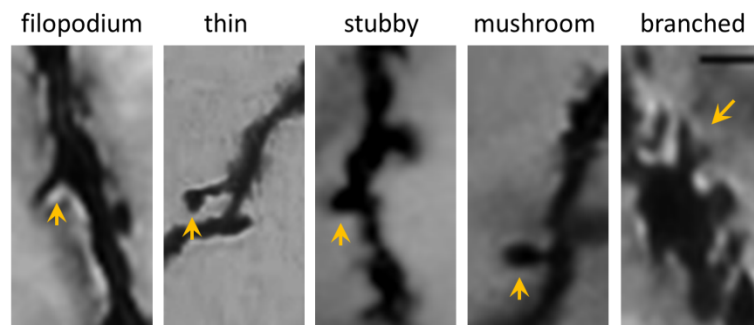


Figura 8: Imágenes representativas de protrusiones dendríticas de clasificación filopodio (largas sin cabeza), thin (largas con cabeza pequeña), stubby (cabeza sin cuello), mushroom (cuello corto y cabeza de gran diámetro) y branched (bifurcadas).

Tal como muestra la figura 9, en promedio no observamos una diferencia significativa en la morfología de las espinas dendríticas al comparar neuronas hipocampales de cerebros WT y HTZ en condición de reposo (9A) ni luego de la inducción química de LTP (9B). Sin embargo, en la condición reposo se observó una tendencia en las neuronas HTZ a presentar mayor proporción de espinas del tipo mushroom, stubby y thin y menor proporción de protrusiones filopoidales que en las neuronas WT. En la condición chLTP se observó una tendencia contraria; es decir, mayor proporción de filopodios y menor proporción de espinas tipo thin en neuronas HTZ comparado con las neuronas WT (Figura 9B).

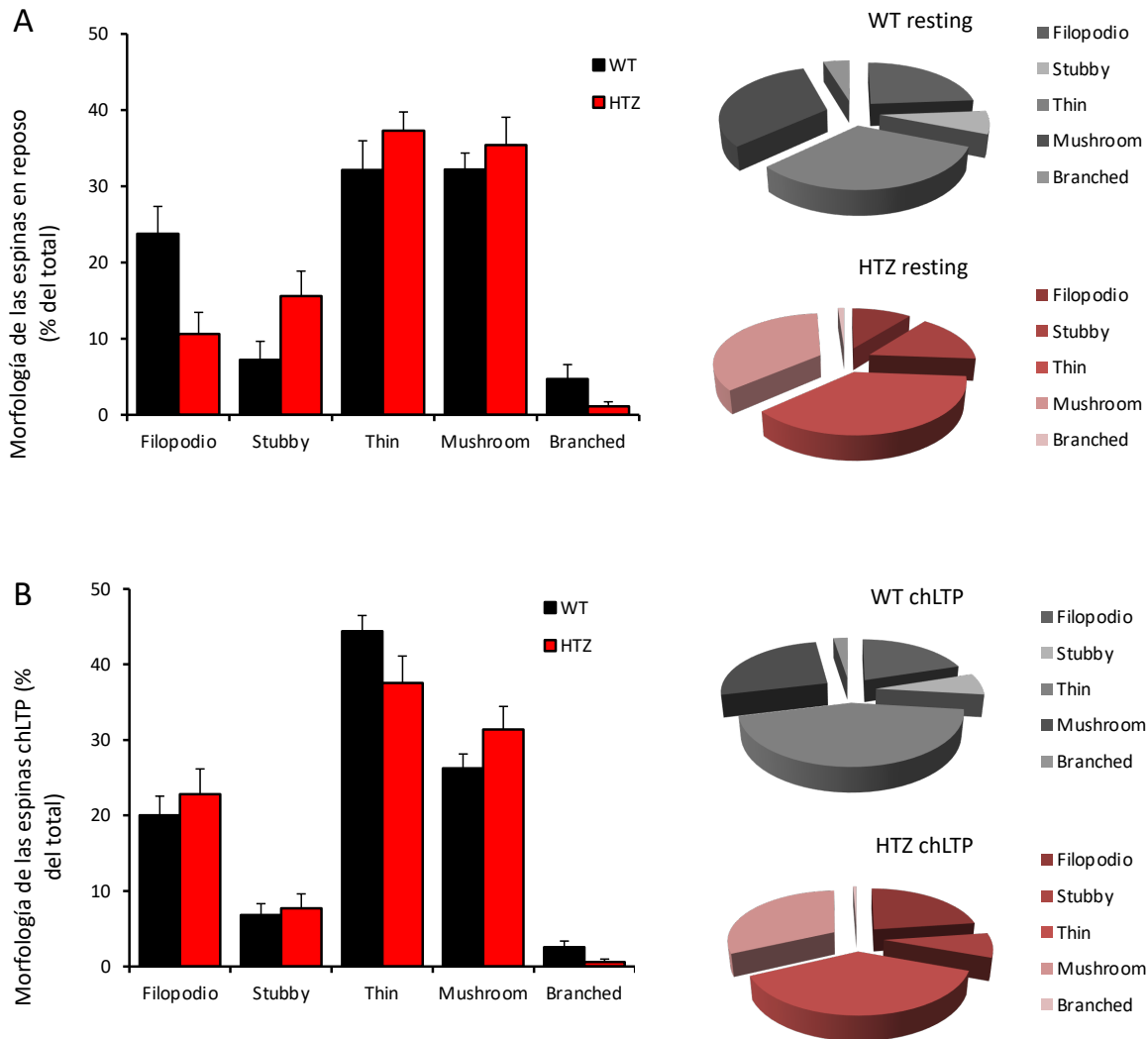


Figura 8: Neuronas HTZ hipocampales exhiben menor proporción de protrusiones filopoidales que las WT en condición de reposo. Se muestra en promedio la proporción de las distintas morfologías de espinas dendríticas analizadas en neuronas en condición de reposo (A) y en respuesta a chLTP (B). Nótese que tanto los gráficos de barra (izquierda) como los de torta (derecha) muestran que en neuronas HTZ existe una menor proporción de protrusiones filopoidales en comparación a las neuronas WT en reposo (A). Esta tendencia se “invierte” en la condición chLTP (B).

De igual manera, analizamos la morfología de las espinas dendríticas en neuronas corticales. Tal como muestra la figura 10, en promedio no observamos una diferencia significativa en la morfología de las espinas dendríticas al comparar neuronas corticales de cerebros WT y HTZ en condición de reposo (10A) ni luego de la inducción química de LTP (10B). Sin embargo, en la condición reposo se observó una tendencia en las neuronas HTZ a presentar

mayor proporción de espinas del tipo mushroom, stubby y thin y menor proporción de protrusiones filopoidales que en las neuronas WT. En la condición chLTP se observó una menor proporción de espinas tipo thin en neuronas HTZ comparado con las WT (Figura 10 B), mientras se mantuvo la mayor proporción de espinas mushroom en las neuronas HTZ comparadas con las WT.

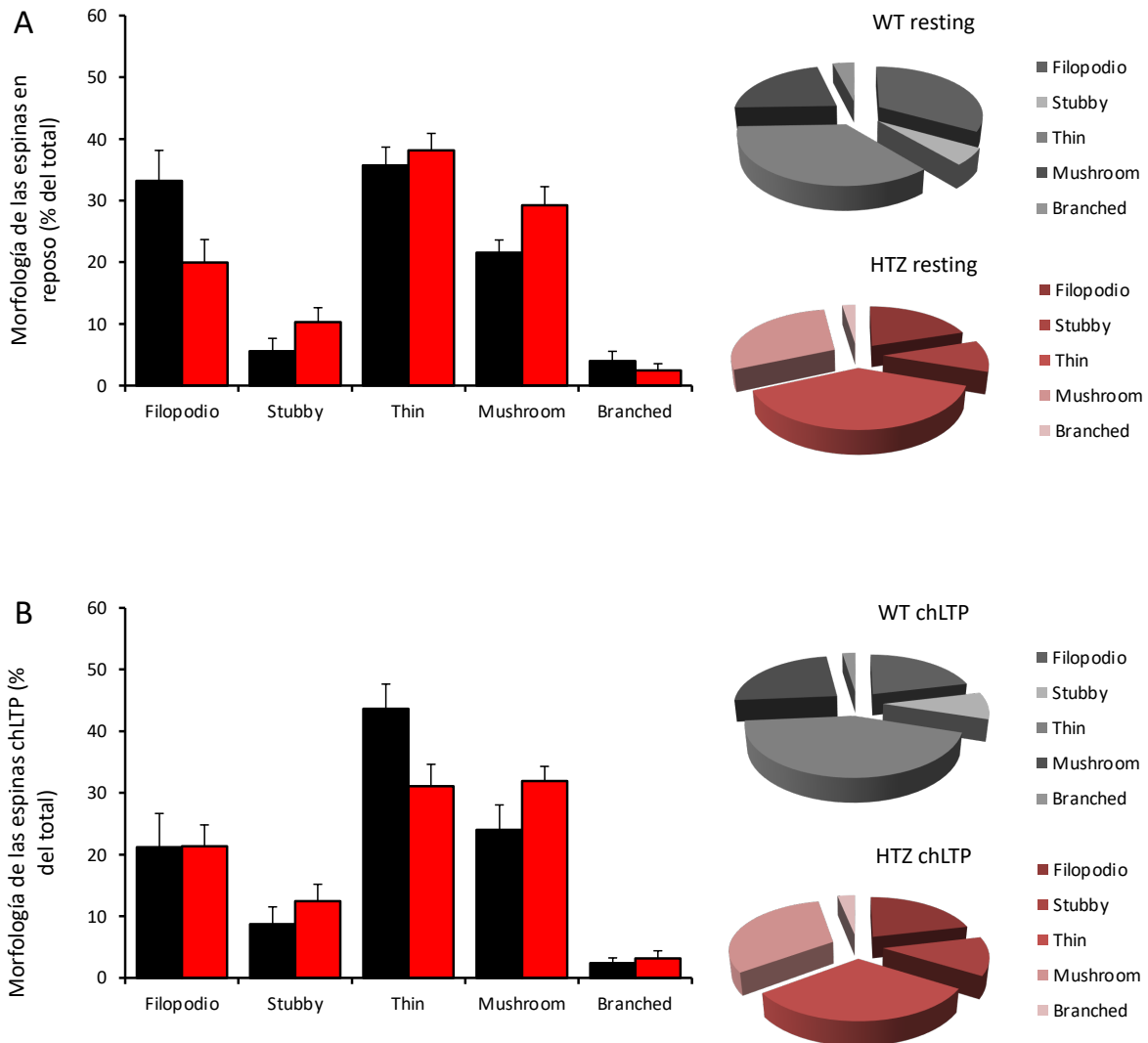


Figura 9: Neuronas HTZ corticales exhiben menor proporción de protrusiones filopoidales que las WT en condición de reposo. Se muestra en promedio la proporción de las distintas morfologías de espinas dendríticas analizadas en neuronas corticales en condición de reposo (A) y en respuesta a chLTP (B). Nótese que tanto los gráficos de barra (izquierda) como los de torta (derecha) muestran que en neuronas HTZ existe una menor proporción de protrusiones filopoidales en comparación a las neuronas WT en condición de reposo (A). Esta diferencia deja de observarse en la condición chLTP (B) donde la proporción de filopodios es la misma entre neuronas corticales WT y HTZ.

Para entender aún más los cambios asociados al genotipo HTZ en la morfología de las espinas dendríticas, comparamos las dimensiones de todas las espinas analizadas realizando gráficos de distribución acumulativa para el largo de las espinas, el diámetro de las cabezas y la razón **diámetro de cabeza/largo de espina**.

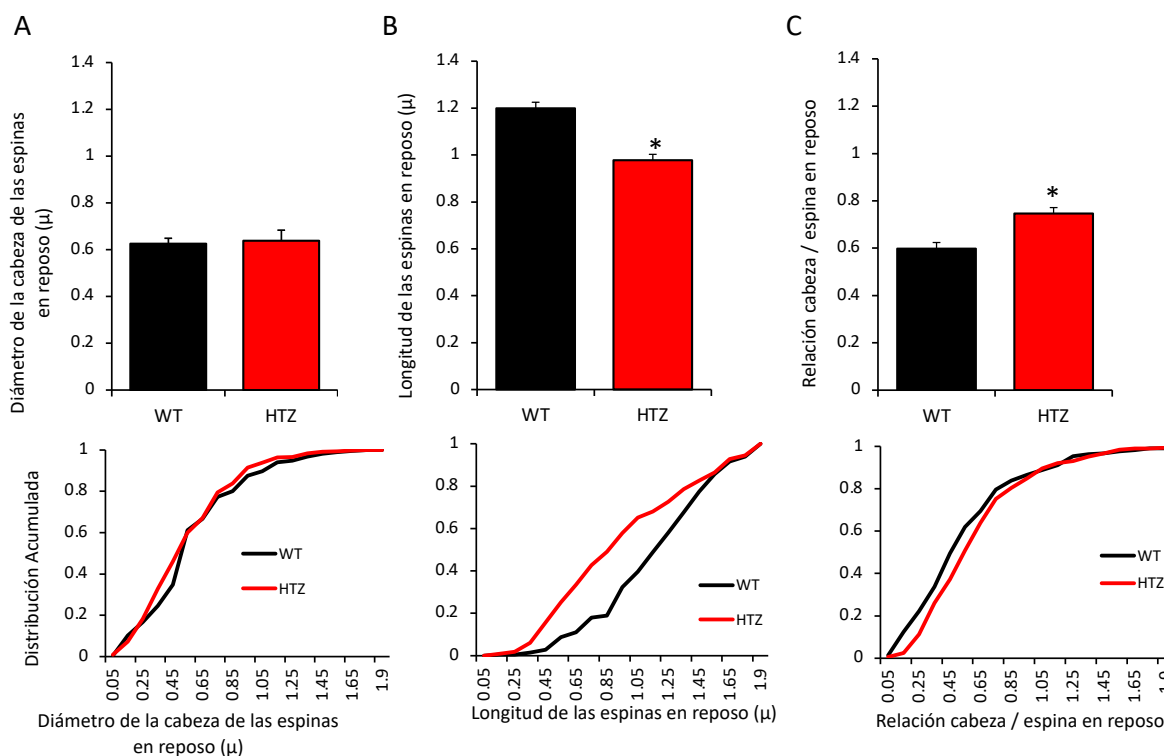


Figura 10: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas hipocampales WT y HTZ en reposo. (A) Arriba: valor promedio del diámetro de las cabezas de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los diámetros de las cabezas de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (B) Arriba: valor promedio del largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los largos de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (C) Arriba: valor promedio de la razón cabeza/largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de las razones cabeza/largo de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). Nótese que las espinas provenientes de neuronas hipocampales HTZ en reposo exhiben un largo significativamente menor y una razón cabeza/espina significativamente mayor a lo observado en neuronas hipocampales WT en reposo. * $p < 0.005$ comparado con WT.

Al analizar estos parámetros en las espinas provenientes de neuronas hipocampales en reposo observamos una disminución significativa en el largo de las espinas HTZ que se manifiesta como un “corrimiento hacia la izquierda” en la curva de distribución acumulativa en comparación a las espinas de neuronas hipocampales WT en reposo (Figura 11B). Aun

cuando el diámetro de las cabezas de espinas WT y HTZ no fue diferente (Figura 11A), debido a que las espinas HTZ de neuronas hipocampales en reposo eran más cortas la razón cabeza/espina fue significativamente mayor en espinas de neuronas hipocampales HTZ (Figura 11C).

El mismo análisis se realizó en las espinas dendríticas provenientes de neuronas hipocampales sometidas a una inducción química de LTP. Interesantemente, no observamos diferencias significativas ni en el largo de las espinas ni en el diámetro de las cabezas entre neuronas hipocampales WT y HTZ sometidas a chLTP (Figura 12).

Cuando analizamos las dimensiones de las espinas dendríticas provenientes de neuronas corticales en reposo observamos que las espinas de neuronas HTZ eran significativamente más cortas y sus cabezas de diámetro significativamente más pequeños que los medidos en neuronas corticales WT, causando un “corrimiento hacia la izquierda” en la distribución acumulativa de ambos parámetros (Figura 13A y 13B). Ya que tanto el largo de las espinas como el diámetro de sus cabezas disminuyeron en las neuronas corticales HTZ, la razón cabeza/espina no se vio afectada de modo significativo (Figura 13C).

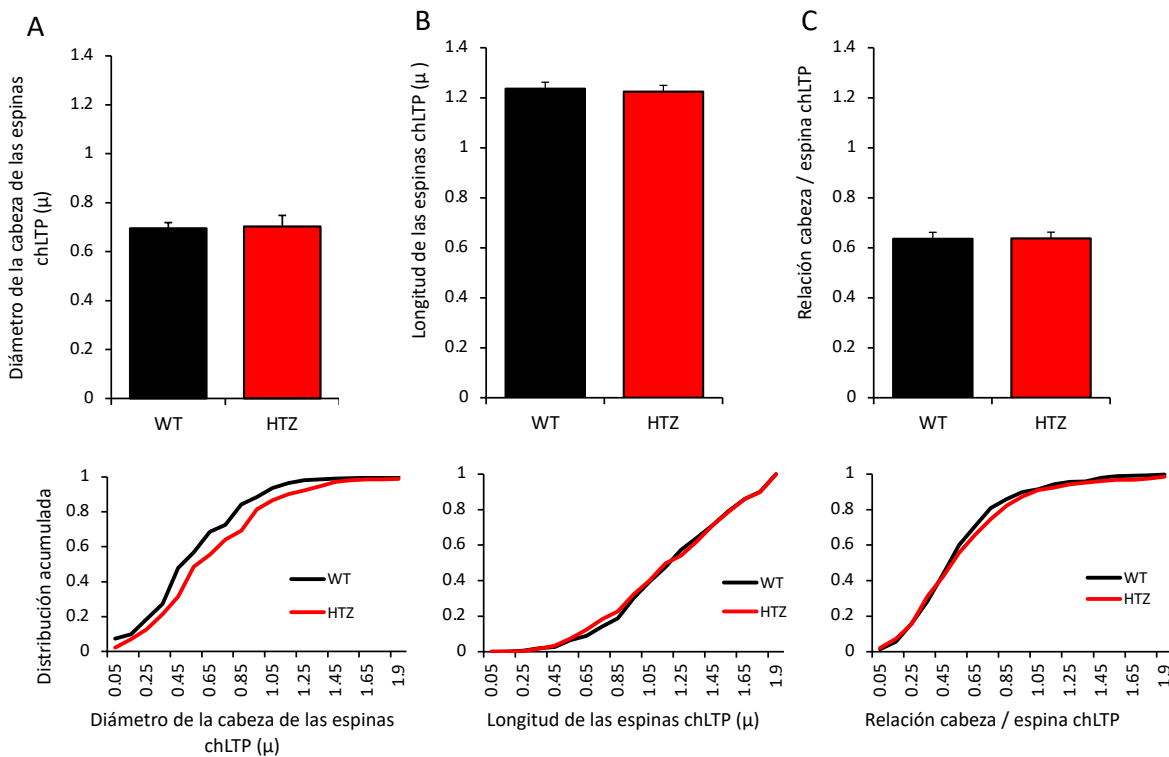


Figura 11: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas hipocampales WT y HTZ sometidas a chLTP. (A) Arriba: valor promedio del diámetro de las cabezas de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los diámetros de las cabezas de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (B) Arriba: valor promedio del largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los largos de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (C) (A) Arriba: valor promedio de la razón cabeza/largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de las razones cabeza/largo de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). No existen diferencias significativas en el largo de las espinas ni en el diámetro de las cabezas de las espinas provenientes de neuronas hipocampales WT y HTZ estimuladas químicamente para la inducción de LTP.

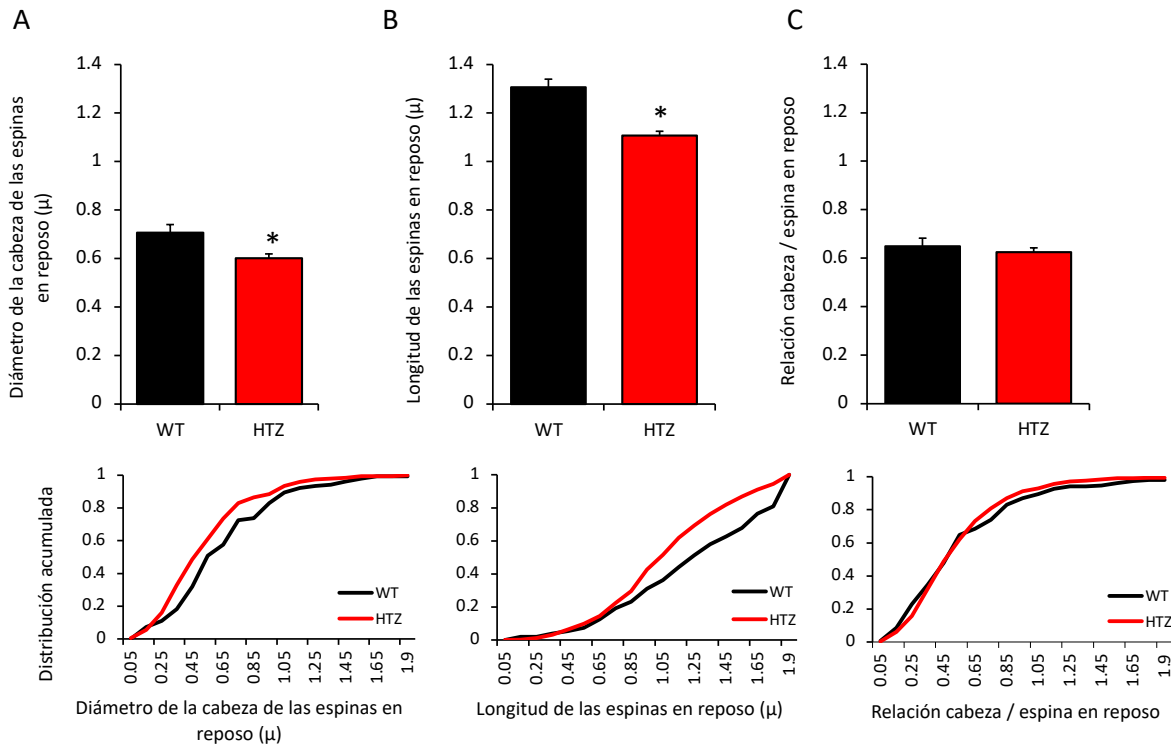


Figura 12: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas corticales WT y HTZ en reposo. (A) Arriba: valor promedio del diámetro de las cabezas de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los diámetros de las cabezas de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (B) Arriba: valor promedio del largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los largos de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (C) (A) Arriba: valor promedio de la razón cabeza/largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de las razones cabeza/largo de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). Nótese que las espinas provenientes de neuronas corticales HTZ en reposo exhiben un largo significativamente menor y un diámetro de las cabezas significativamente menor a los observados en neuronas corticales WT en reposo. * $p < 0.005$ comparado con WT.

Similarmente a lo observado en neuronas hipocampales sometidas a chLTP, cuando realizamos el mismo análisis en las espinas dendríticas provenientes de neuronas corticales

sometidas a una inducción química de LTP no observamos diferencias significativas ni en el largo de las espinas ni en el diámetro de las cabezas (Figura 14).

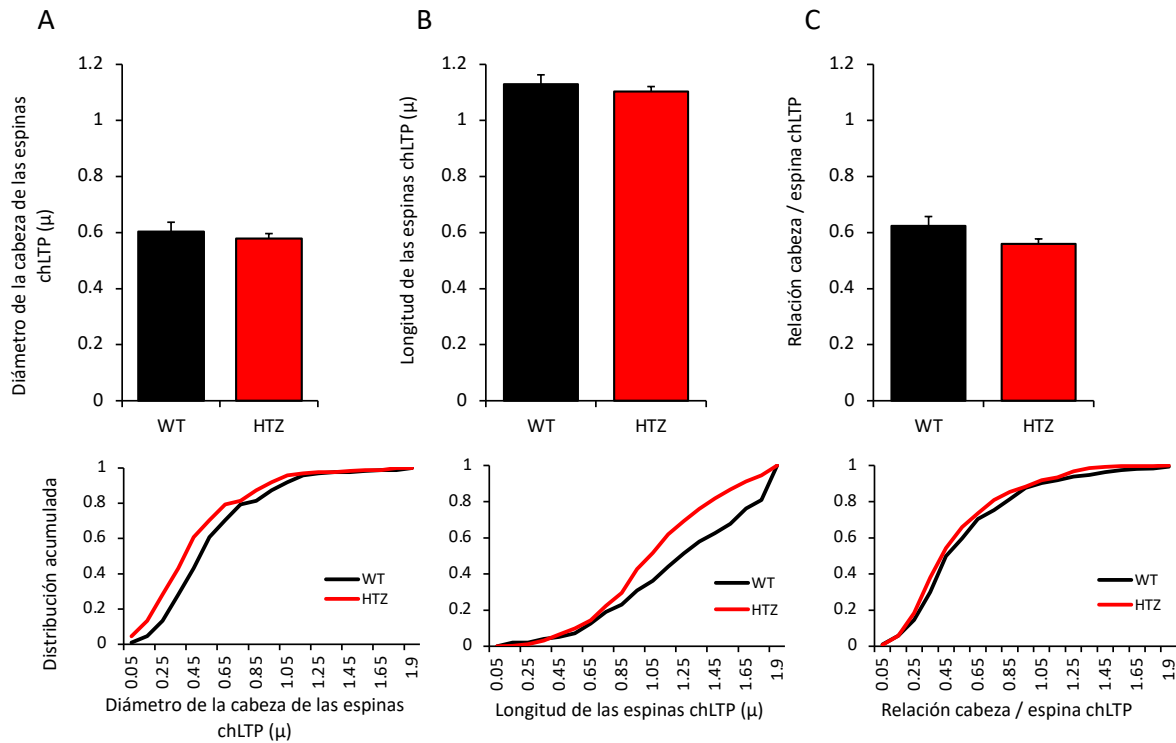


Figura 13: Comparación de la distribución acumulativa del diámetro de las cabezas, largo de las espinas y razón cabeza/espina entre neuronas corticales WT y HTZ sometidas a chLTP. (A) Arriba: valor promedio del diámetro de las cabezas de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los diámetros de las cabezas de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (B) Arriba: valor promedio del largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de los largos de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). (C) (A) Arriba: valor promedio de la razón cabeza/largo de las espinas WT (barra negra) y HTZ (barra roja). Abajo: distribución acumulativa de las razones cabeza/largo de las espinas WT (línea negra) y HTZ (línea roja). No existen diferencias significativas en el largo de las espinas ni en el diámetro de las cabezas de las espinas provenientes de neuronas corticales WT y HTZ estimuladas químicamente para la inducción de LTP.

En resumen, la densidad y el tamaño de las espinas dendríticas provenientes de neuronas que expresan la mutación p.R465W en dinamina-2 se ven basalmente modificados en comparación a su contraparte WT. Estas diferencias estructurales podrían conducir a defectos en la función sináptica excitatoria y explicar parte de los defectos cognitivos que se han descrito en el contexto de la MCN causada por mutaciones en dinamina-2.

5.2. Disponibilidad de AMPAR en fracciones enriquecidas en sinaptoneurosomas

Para evaluar si la densidad de receptores glutamatérgicos AMPA se ve afectada en el tejido sináptico de cerebros HTZ, purificamos fracciones enriquecidas en sinaptoneurosomas y evaluamos la expresión de AMPAR mediante western blot. Los sinaptoneurosomas son preparaciones enriquecidas en terminales presinápticos y en DPSs (Figura 15). Debido a que los receptores AMPAR se expresan solo en la post-sinapsis (Anggono y Huganir, 2012) su densidad en sinaptoneurosomas se correlaciona directamente con su expresión en las DPSs.

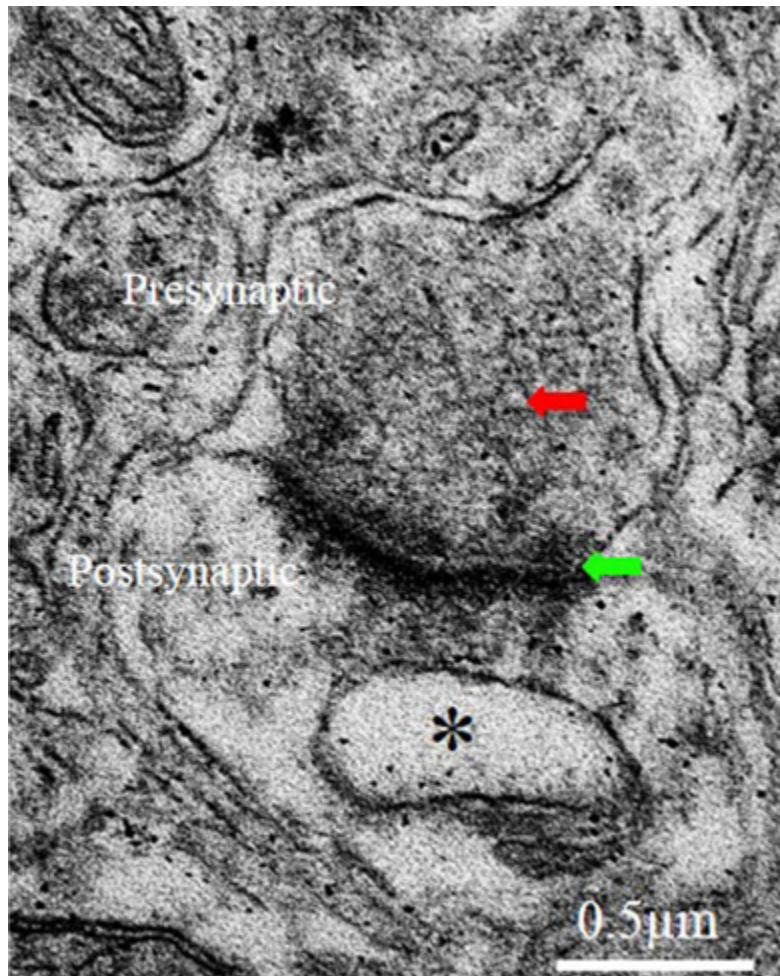


Figura 14: Ultraestructura de Sinaptoneurosomas vista por microscopía electrónica. Flecha roja: vesículas presinápticas; flecha verde: densidad postsináptica; asterisco: aparato (organelos especializados) de la espina dendrítica (extraído de Maiti et al., 2015)

En primer lugar se analizó la densidad de AMPAR en sinaptoneurosomas hipocampales y corticales en condición de reposo. Tal como se muestra en la figura 16A los niveles de expresión de AMPAR en sinaptoneurosomas de tejido hipocampal no fueron distintos entre cerebros WT y HTZ en condiciones de reposo. Los mismos resultados se obtuvieron en sinaptoneurosomas aislados desde corteza (Figura 16B)

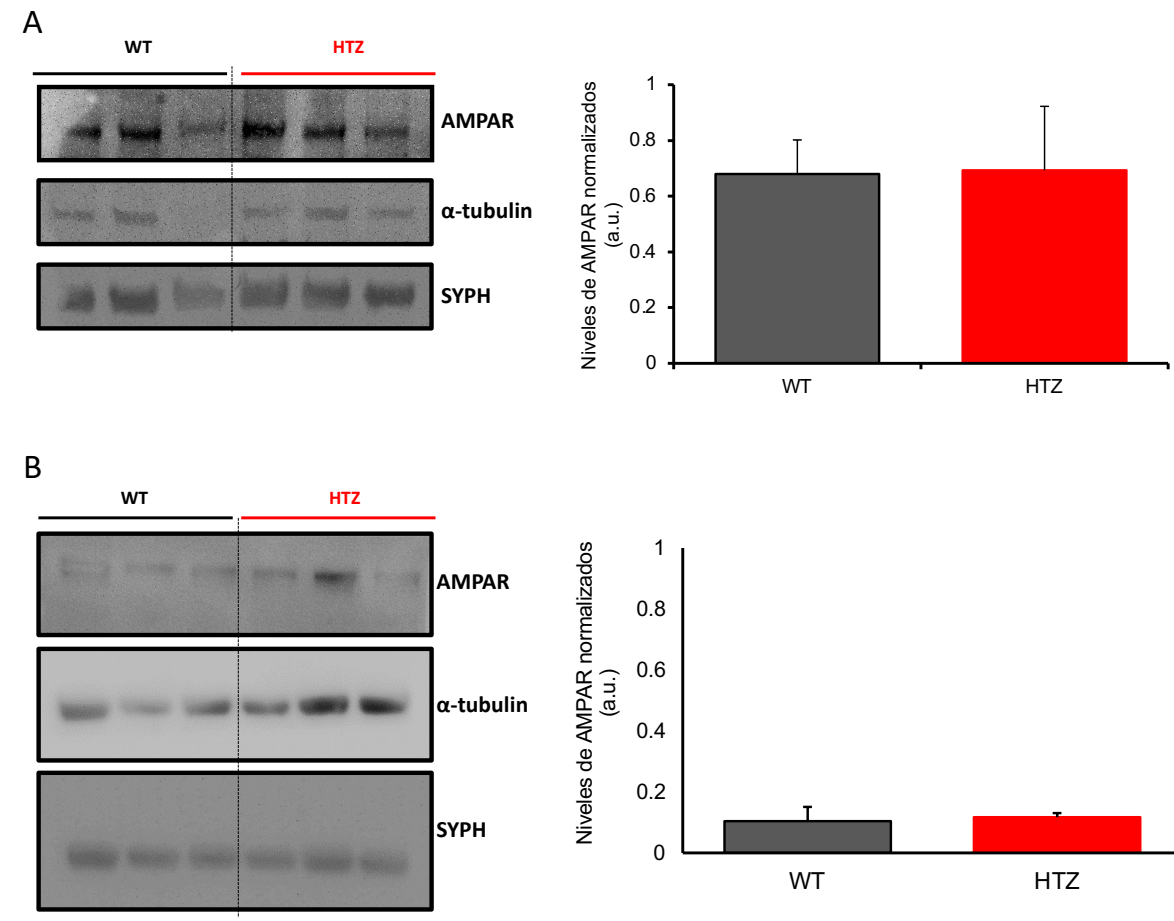


Figura 15: La expresión de AMPAR en sinaptoneurosomas de cerebros WT y HTZ no cambia en condiciones de reposo. (A) Densitometría en tejido hipocampal en reposo (B) Densitometría en tejido cortical en reposo. A la izquierda se muestran blots representativos para muestras de 3 cerebros WT y 3 cerebros HTZ de animales de 6 meses de edad. A la derecha los gráficos muestran el promedio de la densidad de AMPAR normalizada a α -tubulina para tejido WT (barra gris) y HTZ (barra roja). SYPH (sinaptofisina) se utilizó como marcador de la fracción enriquecida en sinaptoneurosomas.

Se realizó el mismo procedimiento experimento en la condición LTP para evaluar si es que la disponibilidad de AMPAR cambiaba entre sinaptoneurosomas WT y HTZ luego de inducir

plasticidad sináptica. Sin embargo, problemas experimentales no permitieron obtener bandas medibles para AMPAR . Este punto será abordado en futuros experimentos.

Los resultados de este trabajo de tesis sugieren fuertemente que la mutación p.R465W en dinamina-2 causante de MCN conduce a una disminución significativa en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales lo que podría explicar los defectos cognitivos descritos en pacientes con esta patología.

6. Discusión.

Dinamina-2 es una gran GTP-asa relevante para el remodelamiento del citoesqueleto de actina y para el tráfico de proteínas de membranas en distintos tejidos (Jakolski et al , 2009) Mutaciones en dinamina-2 causan miopatía centronuclear (MCN), una enfermedad neuromuscular hereditaria que produce atrofia progresiva de la musculatura esquelética distal. Estudios clínicos han demostrado que la MCN-ligada a mutaciones en dinamina-2 se manifiesta además con defectos cognitivos en los pacientes, aunque los mecanismos moleculares que conducen a estos defectos se desconocen. A lo largo de este trabajo de tesis evaluamos de qué manera la mutación p.R465W en dinamina-2, la más común causante de MCN, afecta la estructura y función sináptica en cerebros de un modelo murino de MCN. Específicamente evaluamos la densidad, tamaño y morfología de las espinas dendríticas en neuronas piramidales de ratones heterocigotos para la mutación (HTZ) y analizamos la disponibilidad del receptor glutamatérgico AMPA en fracciones enriquecidas en sinaptoneurosomas de cerebros de ratones HTZ comparando con su contraparte WT.

Para evaluar si la estructura sináptica se ve afectada por mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN, teñimos rebanadas de cerebro WT y HTZ con la tinción de Golgi y analizamos espinas en dendritas apicales de neuronas piramidales de hipocampo y corteza. Nuestros resultados mostraron que la densidad promedio de las espinas dendríticas es significativamente menor en neuronas hipocampales HTZ comparado con las WT en condición de reposo y luego de inducida LTP de manera química (Figuras 6 y 7). Ya que la densidad de espinas dendríticas está directamente relacionada con la densidad de sinapsis glutamatérgicas excitatorias disponibles (Tonnessen et al . , 2016) estos resultados sugieren que las neuronas hipocampales HTZ tienen una reducida probabilidad de generar contactos sinápticos excitatorios funcionales. Lo anterior podría significar que el rol de dinamina-2 en sinapsis hipocampales, es relevante para permitir fenómenos de plasticidad sináptica estructural.

Con respecto a las clasificaciones morfológicas, no observamos diferencias significativas entre neuronas piramidales WT y HTZ (Figuras 9-10), sin embargo, existen algunas

tendencias interesantes a considerar. En neuronas hipocampales en reposo las HTZ exhiben una mayor proporción de espinas dendríticas tipo stubby, tipo thin y tipo mushroom y menor proporción de protrusiones filopoidales que las neuronas WT en reposo (Figura 9A). Esto podría sugerir que las neuronas hipocampales de ratones HTZ básicamente poseen más espinas “maduras” y estables y menos filopodios capaces de generar espinas nuevas en respuesta a cambios en la actividad neuronal (Ebrahimi y Okabe, 2014; Chidambaram et al., 2019). De ser así, esto haría a las sinapsis excitatorias hipocampales de los cerebros HTZ “menos plásticas” que las de su contraparte WT. En acuerdo con esta idea, las neuronas hipocampales HTZ sometidas a una inducción química de LTP mostraron una mayor proporción de filopodios inmaduros y una menor proporción de espinas tipo thin (Figura 9B). Esto podría sugerir que las neuronas hipocampales de los ratones HTZ son deficientes en generar espinas dendríticas que transiten hacia el estado de “madurez” luego de un estímulo para inducir LTP dando soporte a la idea de que el cerebro de ratones HTZ tiene una tendencia a ser “menos plástico” que el de su contraparte WT.

En neuronas corticales en reposo las HTZ también exhiben una mayor proporción de espinas dendríticas tipo stubby y tipo mushroom y menor proporción de protrusiones filopoidales que las neuronas WT (Figura 10A), tendencias que se mantuvieron luego de la inducción química de LTP (Figura 10B). Lo anterior refuerza la idea de que las sinapsis excitatorias en el cerebro HTZ son “menos plásticas” pues tienden a presentar mayor número de espinas con morfología “madura” que se asocian a sinapsis más “estables”.

Como se ha descrito en el marco teórico de este trabajo, las espinas mushroom poseen DPSs más grandes, proporcional al diámetro de la cabeza de la espina (Bosch y Hayashi, 2012), mientras que las espinas stubby son espinas que se encuentran predominantemente en las etapas del desarrollo postnatal, así como las espinas tipo thin que son más dinámicas que las espinas tipo mushroom y se asocian con fenómenos de aprendizaje y memoria (Pchitskaya et Bezprozvanny, 2020). Esto podría sustentar que el animal HTZ, básicamente presente mayor proporción de espinas maduras como las mushroom y thin disminuyendo su capacidad de “remodelamiento” al tener menor cantidad de protrusiones “susceptibles de cambiar”.

El análisis de la distribución acumulativa de los tamaños de todas las espinas dendríticas en estudio mostró diferencias significativas entre neuronas WT y HTZ en condiciones basales. Un gran cuerpo de evidencia sugiere que el diámetro de las cabezas de las espinas se relaciona de manera directa con la madurez y funcionalidad de las espinas dendríticas (Bosch y Hayashi, 2012). Es así como espinas con una cabeza de mayor diámetro son capaces de contener una DPS de mayor área y ofrecer una mayor superficie de contacto con los terminales pre- sinápticos (Bosch y Hayashi, 2012). Cambios en el tamaño de las cabezas y por ende cambios en la razón cabeza/espina se correlacionan con cambios en la madurez y en la fuerza de la sinapsis excitatorias (Arellano, 2007). Además un largo de cuello de las espinas más pequeño supone menor dificultad para el transporte de moléculas sinápticas hacia las DPSs y su difusión lateral desde el eje dendrítico hacia la espina (Kusters et al., 2013). Se ha sugerido que las espinas pueden desempeñar un papel en la compartimentalización de las señales sinápticas. Dicha compartimentalización puede facilitar la plasticidad estructural específica de las espinas y, por lo tanto, regular la fuerza individual de las conexiones sinápticas (Holtmaat y Svoboda, 2009). De acuerdo a nuestros resultados obtenidos en espinas dendríticas de neuronas hipocampales WT y HTZ en estado de reposo observamos que las espinas de neuronas HTZ no muestran cambios en el diámetro de sus cabezas respecto a las neuronas WT pero sí presentan largos mayores, lo que determina una razón cabeza/espina significativamente mayor que su contraparte WT (Figura 11). Estos resultados suponen que basalmente, las neuronas hipocampales HTZ son más “maduras y estables” dando soporte a la idea de que esta condición podría hacer a estas sinapsis “menos plásticas”.

En el caso de los resultados obtenidos en espinas dendríticas de neuronas corticales WT y HTZ en estado de reposo observamos una disminución en el tamaño de las cabezas y en el largo de las espinas dendríticas de neuronas HTZ en comparación a su contraparte WT (Figura 13). Durante el desarrollo, las protrusiones dendríticas son alargadas y gradualmente transitan hacia una morfología tipo mushroom con una cabeza prominente y un cuello delgado. A medida que maduran, existe una correlación directa entre el volumen de la cabeza de la espina y el área de la DPS, el área de la zona activa post sináptica, el

número de receptores disponibles y la fuerza sináptica (Toni et al., 1999). Por lo tanto, las espinas dendríticas con menor diámetro en sus cabezas tienen menor superficie de contacto con la pre-sinapsis y por ende constituyen sinapsis menos eficientes para mediar la transmisión sináptica.

Nuestros datos sugieren cambios en el tamaño de las cabezas y en el largo de las espinas dendríticas en neuronas hipocampales y corticales del ratón HTZ, los cuales podrían asociarse a defectos en la transmisión sináptica y consecuentemente a déficit cognitivo en el contexto de la MCN. Respecto a esto, aunque la afección muscular es la expresión clínica más estudiada de la MCN-AD, se han expuesto ciertos reportes clínicos que sugieren que pacientes portadores de mutaciones en el gen DNM2 causantes de MCN-AD manifiestan también defectos cognitivos. En el año 2004, se informó que dentro de un estudio a 29 pacientes con MCN perteneciente a 3 familias distintas, 3 de estos pacientes presentaban MCN-AD con deterioro cognitivo evidenciado por el requerimiento de planes educacionales adaptados a sus necesidades (Jeannet et al., 2004). Sin embargo, el tipo de mutación en DNM2 que portaban estos pacientes no está especificado en el estudio. Del mismo modo, en el año 2012, Böhm y colaboradores reportaron que en muchos de los pacientes con MCN-AD portadores de mutaciones en DNM2 que forman parte de sus cohortes de estudio, es evidente un “coeficiente intelectual limitado” (Böhm et al., 2012), lo que sugiere que mutaciones en dinamina-2 pueden correlacionarse con limitaciones cognitivas.

Un reporte clínico publicado el año 2007 por Echaniz-Laguna y colaboradores, describió a un grupo de pacientes con MCN-AD que requirieron de educación adaptada debido a dificultades en el aprendizaje, las que incluso se describen por los autores como “retraso mental” leve desde la infancia (Echaniz-Laguna et al., 2007). Estos autores discuten respecto a los casos publicados por Jeannet *et al* en el 2004 en donde se describió defectos cognitivos asociados a la MCN-AD, argumentando que uno de ellos presentaba la mutación p.R465W. Un estudio publicado el año anterior por Fischer y colaboradores reportó defectos cognitivos en otro paciente con MCN-AD portador de la mutación p.R465W, el cual formó parte de una caracterización realizada a 10 pacientes entre 12 y 72 años (Fischer et al., 2006). Lo anterior sugiere que en particular la mutación p.R465W en DNM2 podría asociarse

con alteraciones cognitivas. En este sentido, datos no publicados de nuestro laboratorio demuestran que el ratón HTZ portador de la mutación p.R465W exhibe defectos significativos en el aprendizaje y memoria medidos por tests conductuales. Tales alteraciones se correlacionan con una disminución significativa en la transmisión sináptica excitatoria y en la plasticidad sináptica medida como LTP y LTD en rebanadas hipocampales de ratones HTZ adultos en comparación a su contraparte WT. Estos y otros resultados se encuentran actualmente disponibles como preprint en la plataforma BiorXiv (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.28.450172v2>). Lo anterior podría sugerir que la mutación p.R465W es causante de alteraciones en la función sináptica que conducen a defectos cognitivos, aunque aún se desconoce cuan prevalente podrían ser estos defectos. De ser así, ¿de qué manera una mutación en el dominio medio de dinamina-2 podría afectar su función en las estructuras sinápticas?

Existe mucha evidencia mostrando que dinamina-2 modula la dinámica de F-actina en distintos tipos celulares favoreciendo su polimerización y estabilización (Gu et al., 2010; Yamada et al., 2016; Zhang et al., 2020). Aunque a la fecha este mecanismo no ha sido demostrado en sinapsis excitatorias del sistema nervioso central (SNC) mamífero, nuestros datos sugieren que dinamina-2 también podría modular la dinámica de F-actina en las espinas dendríticas, afectando de ese modo la densidad y el tamaño de las espinas dendríticas en neuronas piramidales del ratón HTZ. El citoesqueleto de las espinas dendríticas está formado principalmente por filamentos de actina (F-actina), que sirven tanto como marco estructural, así como principal regulador del tráfico de proteínas sinápticas (Bosch et Hayashi, 2012), es por esta razón que el remodelamiento de actina está íntimamente relacionado con la formación de espinas dendríticas y con el reclutamiento de proteínas sinápticas a las DPSs. Cambios en el balance entre F- y G-actina son necesarios y suficientes para modificar la morfología de las espinas dendríticas (Miermans et al., 2017). En nuestro modelo murino de MCN (ratón HTZ), la dinámica de actina está afectada en el tejido muscular (Gonzalez-Jamett et al., 2017), por lo cual es factible que algo similar ocurra en el SNC. Interesantemente, trabajo no publicado de nuestro laboratorio sugiere que en neuronas hipocampales del ratón HTZ la cantidad de F-actina en las espinas dendríticas es

significativamente menor que en neuronas WT, lo que se correlaciona con una disminución significativa en la razón cabeza/espina (Figura 17).

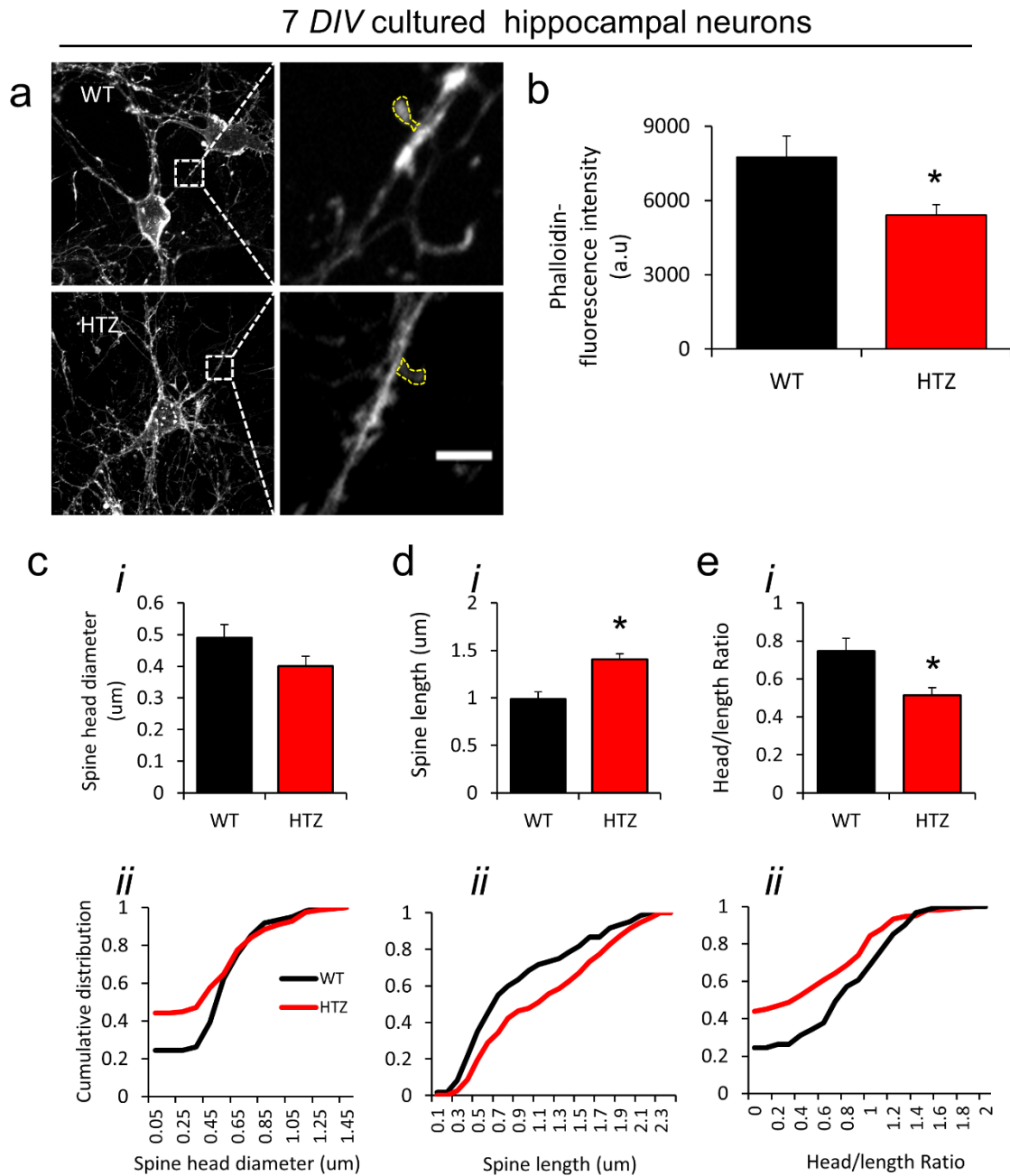


Figura 16: Neuronas HTZ hipocámpales en cultivo exhiben una menor densidad de F-actina en las espinas dendríticas y menor razón cabeza/espina que su contraparte WT. Neuronas hipocámpales fueron cultivadas desde ratones WT y HTZ neonatos (P0). A los 7 días in vitro fueron fijadas y teñidas con la toxina de unión a F-

actina faloidina-rodaminaB y se visualizaron mediante microscopía confocal (a) Neuronas teñidas con faloidina representativas y ejes dendríticos por genotipo. Barra de escala = 2.5 μm (b) Intensidad de fluorescencia de faloidina rodamina en espinas dendríticas de neuronas WT y HTZ. (c-e) Promedio (i) i distribución acumulativa (ii) del diámetro de las cabezas (c), largo de las espinas (d) y razón cabeza/Espina ϵ en neuronas hipocampales teñidas con faloidina-rodaminaB. Resultado extraído de Labraña y Mattar, 2021, trabajo de tesis titulado ““Exocitosis de AMPAR y organización del citoesqueleto de actina en cultivo de neuronas hipocampales en un modelo de miopatía centronuclear causada por mutaciones en dinamina-2”

Finalmente, cambios en el tamaño y cantidad de espinas dendríticas podría tener un efecto en la disponibilidad de proteínas sinápticas en las DPSs. En particular, la cantidad de AMPAR disponible en las sinapsis excitatorias está directamente relacionado con el tamaño de las DPSs. Por lo tanto, es factible suponer que una disminución en la densidad de espinas y en la razón cabeza/espina como las que observamos nosotros a lo largo de este trabajo podrían correlacionarse con un cambio en la densidad de AMPAR en las sinapsis. Para evaluar esta posibilidad aislamos fracciones de sinaptoneurosomas y medimos por western blot la cantidad de AMPAR disponible. Nuestros datos sugieren que en condiciones de reposo no existe un cambio significativo en la cantidad de AMPAR en sinaptoneurosomas de hipocampo o corteza de cerebros HTZ comparado con los WT (Figura 16). Existen diversos mecanismos que potencialmente podrían explicar ausencia de cambios en la disponibilidad de AMPAR en las DPSs aún cuando sí existen cambios en el número y tamaño de las espinas. Por ejemplo, el ratón HTZ podría estar compensando la disminución de la densidad de espinas dendríticas aumentando los niveles totales de AMPAR lo que se traduciría en una cantidad basal de receptores tipo AMPA en las DPSs comparable a la que se observa en la condición WT. La expresión de AMPAR total en las fracciones H (homogenado) de cerebros WT y HTZ deben ser analizadas para explorar esta posibilidad. Otra posibilidad es que otras sub-unidades distintas de GLUR1 (subunidad de AMPAR evaluada en esta tesis) modifiquen su expresión en las DPSs (GLUR2 por ejemplo). En futuros experimentos evaluaremos la disponibilidad de GLUR2, así como formas fosforiladas de GLUR1/GLUR2 en sinaptoneurosomas de cerebros WT y HTZ.

En resumen, los resultados obtenidos a partir de este trabajo de tesis sugieren que las neuronas excitatorias del modelo murino de MCN muestran una disminución significativa

de la densidad de espinas dendríticas y modificaciones en el tamaño de las espinas dendríticas comparado con su contraparte WT. Tales modificaciones no se correlacionan de manera directa con cambios en la disponibilidad de la subunidad GluR1 de AMPAR en las DPSs lo que podría ser consecuencia de mecanismos compensatorios. Los cambios observados en las espinas dendríticas podrían explicarse por modificaciones en la dinámica del citoesqueleto de actina que se encuentra afectada en el contexto de la MCN (Gonzalez-Jamett et al., 2017; Lin et al., 2020) y que constituye un evento clave para la espinogénesis. Esto podría relacionarse con los defectos cognitivos descritos en pacientes con MCN.

7. Conclusiones.

Los resultados de este estudio contribuyen a entender la importancia de dinamina-2 en las sinapsis excitatorias centrales y cómo sus funciones a este nivel parecen afectarse debido a mutaciones causantes de MCN. Al comparar neuronas piramidales de cerebros de ratones silvestres y heterocigotos para la mutación p.R465W en dinamina-2 podemos concluir que:

- La mutación causante de MCN se asocia con una disminución significativa de la densidad de espinas dendríticas pudiendo afectar la eficacia de las sinapsis excitatorias.
- Al poseer una menor proporción de proyecciones dendríticas del tipo filopoidales las sinapsis excitatorias de los cerebros de ratones modelo de MCN podrían ser “menos plásticas” que su contraparte silvestre.
- Lo anterior podría sugerir defectos en la transmisión sináptica excitatoria, lo que explicaría los defectos cognitivos reportados en pacientes con MCN.
- En cuanto a las proyecciones, esperamos continuar con las experimentaciones aumentando el número de animales en estudio para analizar la morfología de las proyecciones y espinas dendríticas así como en la disponibilidad de distintas subunidades de AMPAR (GLUR1/GLUR2) y su grado de fosforilación en sinaptoneurosomas de cerebros WT y HTZ .

8.2 Anexos.1 Clasificación de Espinas Dendríticas de acuerdo a sus dimensiones


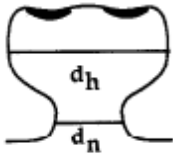
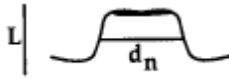

Category	Shape	Criteria
Thin		$d_n \lll L$ $d_n \leq d_h$
Mushroom		$d_n \lll d_h$
Stubby		$d_n \cong L$
Branched		> 1 head

Figura A 1: Criterios para asignar morfología a las espinas dendríticas de acuerdo a sus dimensiones. Las espinas se clasifican en thin si su longitud es mayor que el diámetro del cuello, y los diámetros de la cabeza y cuello son similares. Las espinas se clasifican en mushroom si el diámetro de la cabeza es mucho mayor que el diámetro del cuello. Las espinas se clasifican como stubby si el diámetro del cuello es similar a la longitud total de la espina. Las espinas se clasifican como branched (ramificada) si tienen más de una cabeza. Ocasionalmente, espinas en la categoría mushroom pueden superponerse como thin o stubby. (dn= Diámetro de cuello; Dh=Diámetro de cabeza; L= Largo) (Tomado de Harris et al., 1992)

8.2. Valores de clasificación de espinas dendríticas de acuerdo a longitudes y diámetros.

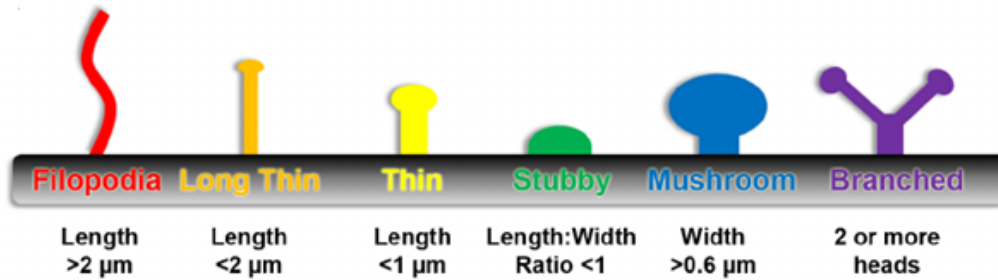


Figura A 2: Tipos comunes de espinas dendríticas que se encuentran en la corteza. La madurez de la espina progresa (de izquierda a derecha) desde estructuras largas y delgadas de tipo filopodio (rojo) hasta espinas en forma de hongo de cabeza ancha (azul) y la espina ramificada ocasional (violeta). (Risher et al., 2014).

8. Bibliografía.

Adesnik, H., Nicoll, R. A., & England, P. M. (2005). Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking. *Neuron*, 48(6), 977-985.

Adrian, M., Kusters, R., Storm, C., Hoogenraad, C. C., & Kapitein, L. C. (2017). Probing the interplay between dendritic spine morphology and membrane-bound diffusion. *Biophysical journal*, 113(10), 2261-2270.

Agrawal, P. B., Pierson, C. R., Joshi, M., Liu, X., Ravenscroft, G., Moghadaszadeh, B., ... & Talim, B. (2014). SPEG interacts with myotubularin, and its deficiency causes centronuclear myopathy with dilated cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 95(2), 218-226.

Akulinin, V. A., Stepanov, S. S., Semchenko, V. V., & Belichenko, P. V. (1997). Dendritic changes of the pyramidal neurons in layer V of sensory-motor cortex of the rat brain during the postresuscitation period. *Resuscitation*, 35(2), 157-164.

Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239–246. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>

Anggono, V.;Huganir .R.L (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology* . 22(3). 461-469.

Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., & Yuste, R. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in neuroscience*, 1, 10

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 Dec 10:1073858420974313. doi: 10.1177/1073858420974313.

Arriagada-Diaz J, Gómez 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 Dec 10:1073858420974313. doi: 10.1177/1073858420974313.

Basu, S., & Lamprecht, R. (2018). The role of actin cytoskeleton in dendritic spines in the maintenance of long-term memory. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 143.

Bloodgood, B. L., & Sabatini, B. L. (2007). Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*, 17(3), 345-351.

Böhm, J., Biancalana, V., DeChene, E. T., Bitoun, M., Pierson, C. R., Schaefer, E., ... & Kretz, C. (2012). Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype–phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Human mutation*, 33(6), 949–959.

Böhm, J.; Barthélémy, I.; Blot, S.; Tiret, L.; Laporte, J. A dog model for centronuclear myopathy carrying the most common DNM2 mutation. *Neuromuscul. Disord.* 2020, 30, S75. (Paper en preparación.)

Bosch, M., & Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*, 22(3), 383–388.

Bragato, C., Gaudenzi, G., Blasevich, F., Pavesi, G., Maggi, L., Giunta, M., ... & Mora, M. (2016). Zebrafish as a model to investigate dynamin 2-related diseases. *Scientific reports*, 6, 20466.

Bryant, N.J., Govers, R., and James, D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 267–277.

Buono, S., Ross, J. A., Tasfaout, H., Levy, Y., Kretz, C., Tayefeh, L., ... & Bitoun, M. (2018). Reducing dynamin 2 (DNM2) rescues DNM2-related dominant centronuclear myopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(43), 11066–11071.

Campbell JN, Register D, Churn SB. Traumatic brain injury causes an FK506-sensitive loss and an overgrowth of dendritic spines in rat forebrain. *J Neurotrauma.* 2012 Jan 20;29(2):201-17. doi: 10.1089/neu.2011.1761. PMID: 2151767

Cao, H., Garcia, F., & McNiven, M. A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 9(9), 2595–2609.

Carroll R. C., Beattie E. C., Xia H., Luscher C., Altschuler Y., Nicoll R. A., Malenka R. C. and Von Zastrow M. (1999) Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 14112–14117.

Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, Schmitz-Abe K, DeChene ET, Swanson LC, Soemedi R, Vasli N, Iannaccone ST, Shieh PB, Shur N, Dennison JM, Lawlor MW, Laporte J, Markianos K, Fairbrother WG, Granzier H, Beggs AH. Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology.* 2013 Oct 1;81(14):1205-14. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a6ca62. Epub 2013 Aug 23.

Chen, S., Zhao, Y., Wang, Y., Shekhar, M., Tajkhorshid, E., & Gouaux, E. (2017). Activation and desensitization mechanism of AMPA receptor-TARP complex by cryo-EM. *Cell*, 170(6), 1234–1246.

- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., ... & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92, 161-193.
- Clinton, R. W., Francy, C. A., Ramachandran, R., Qi, X., & Mears, J. A. (2016). Dynamin-related protein 1 oligomerization in solution impairs functional interactions with membrane-anchored mitochondrial fission factor. *Journal of Biological Chemistry*, 291(1), 478-492.
- Demonbreun, A. R., & McNally, E. M. (2014). Dynamin 2 the rescue for centronuclear myopathy. *The Journal of clinical investigation*, 124(3), 976-978
- Durieux, A. C., Vignaud, A., Prudhon, B., Viou, M. T., Beuvin, M., Vassilopoulos, S., ... & Guicheney, P. (2010). A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Human molecular genetics*, 19(24), 4820-4836
- Ebrahimi, S., & Okabe, S. (2014). Structural dynamics of dendritic spines: molecular composition, geometry and functional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(10), 2391-2398.
- Echaniz-Laguna, A., Nicot, A. S., Carré, S., Franques, J., Tranchant, C., Dondaine, N., ... & Laporte, J. (2007). Subtle central and peripheral nervous system abnormalities in a family with centronuclear myopathy and a novel dynamin 2 gene mutation. *Neuromuscular Disorders*, 17(11-12), 955-959.
- Ferguson S. M., Raimondi A., Paradise S., Shen H., Mesaki K., Ferguson A., Destaing O., Ko G., Takasaki J., Cremona O. et al.(2009). Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev. Cell* 17, 811–822 10.1016/j.devcel.2009.11.005.
- Ferguson, S. M., & De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 75.
- Ferguson, S. M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wölfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., ... & O'toole, E. (2007). A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, 316(5824), 570-574.
- 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.
- Frontera. W. R, Ochala J. (2015). Sejeletal muscle a brief review of structure and function. *Calcified tissue international* 93(3). 183-195.

Garey, L. J., Ong, W. Y., Patel, T. S., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A. M., ... & Hirsch, S. R. (1998). Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 65(4), 446-453.

Gasper R, Meyer S, Gotthardt K, Sirajuddin M, Wittinghofer A. It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2009; 10:423–9.

Gass, G. V., Lin, J. J., Scaife, R., & Wu, C. F. (1995). Two isoforms of *Drosophila* dynamin in wild-type and *shibire ts* neural tissue: Different subcellular localization and association mechanisms. *Journal of neurogenetics*, 10(3), 169-191.

Gerges, N. Z., Backos, D. S., Rupasinghe, C. N., Spaller, M. R., & Esteban, J. A. (2006). Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. *The EMBO journal*, 25(8), 1623-1634.

Glantz, L. A., & Lewis, D. A. (2001). Dendritic spine density in schizophrenia and depression. *Archives of general psychiatry*, 58(2), 203-203.

González-Jamett AM, Bevilacqua JA and Cárdenas Díaz AM (2018). Hereditary Myopathies, Muscle Cell and Tissue, Kunihiro Sakuma, IntechOpen. <https://www.intechopen.com/books/musclecell-and-tissue-current-status-of-research-field/hereditarymyopathies>

González-Jamett, A. M., Baez-Matus, X., Olivares, M. J., Hinostroza, F., Guerra-Fernández, M. J., Vasquez-Navarrete, J., ... & Cárdenas, A. M. (2017). Dynamin-2 mutations linked to Centronuclear Myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Scientific reports*, 7(1), 1-16.

Govek, E. E., Newey, S. E., & Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development*, 19(1), 1-49.

Gray, E. G. (1959). Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature*, 183(4675), 1592-1593.

Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., ... & Sever, S. (2010). Direct dynamin–actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO journal*, 29(21), 3593-3606. Harris, K. M. (1980). Relationships between dendrite and spine neck diameters in freeze-fractured rat hippocampal formation. In *Biological Bulletin* (Vol.159, No. 2, pp. 470-471). 7 MBL ST, WOODS HOLE, MA 02543: Marine Biological Laboratory.

Hanley, J. G. (2018). The regulation of AMPA receptor endocytosis by dynamic protein-protein interactions. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 362.

- Harris, K. M., Jensen, F. E., & Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in *J Neurosci* 1992 Aug; 12 (8): following table of contents]. *Journal of Neuroscience*, 12(7), 2685-2705.
- Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(12), 880-888.
- Heymann, J. A., & Hinshaw, J. E. (2009). Dynamin at a glance. *Journal of cell science*, 122(19), 3427-3431.
- Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647–658. doi: 10.1038/nrn2699
- Hori, N., & Carpenter, D. O. (1994). Functional and morphological changes induced by transient in vivo ischemia. *Experimental neurology*, 129(2), 279-289
- Huang, S., & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell metabolism*, 5(4), 237-252.
- Huganir, R., & Nicoll, R. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, 80(3), 704-717.
- Jaskolski, F., Mayo-Martin, B., Jane, D., & Henley, J. M. (2009). Dynamin-dependent membrane drift recruits AMPA receptors to dendritic spines. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12491-12503.
- Jeannet, P. Y., Bassez, G., Eymard, B., Laforet, P., Urtizberea, J. A., Rouche, A., ... & Romero, N. B. (2004). Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. *Neurology*, 62(9), 1484-1490.
- Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Sep 25;3:26. doi: 10.1186/1750-1172-3-26. Review.
- Kennedy, M. B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, 290(5492), 750-754.
- Kharazia, V. N., & Weinberg, R. J. (1997). Tangential synaptic distribution of NMDA and AMPA receptors in rat neocortex. *Neuroscience letters*, 238(1-2), 41-44
- Korobova, F., & Svitkina, T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Molecular biology of the cell*, 21(1), 165-176

Kusters, R., Kapitein, L. C., Hoogenraad, C. C., and Storm, C. (2013). Shape-induced asymmetric diffusion in dendritic spines allows efficient synaptic AMPA receptor trapping. *Biophys. J.* 105, 2743–2750. doi: 10.1016/j.bpj.2013.11.016

Labraña-Allende M y Matta-Araos (2021) "Exocitosis de AMPAR y organización del citoesqueleto de actina en cultivo de neuronas hipocampales en un modelo de miopatía centronuclear causada por mutaciones en dinamina-2" TESIS DE TECNOLOGIA MEDICA APROBADA.

Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C., & Voeltz, G. K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature*, 540(7631), 139-143.

Lin, S. S., Hsieh, T. L., Liou, G. G., Li, T. N., Lin, H. C., Chang, C. W., ... & Liu, Y. W. (2020). Dynamin-2 Regulates Postsynaptic Cytoskeleton Organization and Neuromuscular Junction Development. *Cell Reports*, 33(4), 108310.

Maiti P, Manna J, McDonald MP. Merging advanced technologies with classical methods to uncover dendritic spine dynamics: A hot spot of synaptic plasticity. *Neurosci Res.* 2015 Jul;96:1-13. doi: 10.1016/j.neures.2015.02.007. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25728560.

McCann, R. F., & Ross, D. A. (2017). A fragile balance: dendritic spines, learning, and memory. *Biological psychiatry*, 82(2), e11-e13.

McMahon H. T. and Boucrot E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517–533.

Miermans, C. A., Kusters, R. P. T., Hoogenraad, C. C., & Storm, C. (2017). Biophysical model of the role of actin remodeling on dendritic spine morphology. *PloS one*, 12(2), e0170113.

Multani, P., Myers, R. H., Blume, H. W., Schomer, D. L., & Sotrel, A. (1994). Neocortical dendritic pathology in human partial epilepsy: a quantitative Golgi study. *Epilepsia*, 35(4), 728-736.

Okamoto P. M., Gamby C., Fallon J., Vallee R. B. and Wells D. (2001) Dynamin isoform-specific interaction with the shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 276, 48458–48465.

Okamoto, P. M., Gamby, C., Wells, D., Fallon, J., & Vallee, R. B. (2001). Dynamin isoform-specific interaction with the shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48458-48465.

Park, Y. E., Choi, Y. C., Bae, J. S., Lee, C. H., Kim, H. S., Shin, J. H., & Kim, D. S. (2014). Clinical and pathological features of Korean patients with DNM2-related centronuclear myopathy. *Journal of clinical neurology*, 10(1), 24-31.

- Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 31.
- Phillips, M., & Pozzo-Miller, L. (2015). Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neuroscience letters*, 601, 30-40.
- Raimondi, A., Ferguson, S. M., Lou, X., Armbruster, M., Paradise, S., Giovedi, S., ... & O'Toole, E. (2011). Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, 70(6), 1100-1114.
- Risher, W. C., Ustunkaya, T., Alvarado, J. S., & Eroglu, C. (2014). Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PloS one*, 9(9), e107591.
- Rocheffort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports*, 13(8), 699-708
- Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord*. 2010 Apr;20(4): 223-8. doi: 10.1016/j.nmd.2010.01.014. Epub 2010 Feb 23. Review Sorkin A. and Von Zastrow M. (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 10, 609–622.
- Romeu, A., & Arola, L. 2014. Classical dynamin DNM1 and DNM3 genes attain maximum expression in the normal human central nervous system. *BMC research notes*, 7(1), 188.
- Ryu, Jubin, et al. "A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function." *Neuron* 49.2 (2006): 175-182.
- Sala C, Segal M. (2014) Dendritic spines: The locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*.94:141–188.
- Schafer DA (2004) Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic* 5: 463–469
- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β -protein: Impair synaptic plasticity and behavior. *Synaptic Plasticity and the Mechanism of Alzheimer's Disease*, 89-102.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189.
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 823-847.
- Singh, M., Jadhav, H. R., & Bhatt, T. (2017). Dynamin functions and ligands: classical mechanisms behind. *Molecular pharmacology*, 91(2), 123-134

- Susman, R. D., Quijano-Roy, S., Yang, N., Webster, R., Clarke, N. F., Dowling, J., ... & North, K. N. (2010). Expanding the clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. *Neuromuscular Disorders*, 20(4), 229-237.
- Swann, J. W., Al-Noori, S., Jiang, M., & Lee, C. L. (2000). Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus*, 10(5), 617-625.
- Tada, Tomoko, and Morgan Sheng. "Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis." *Current opinion in neurobiology* 16.1 (2006): 95-101.
- Tanabe, K., & Takei, K. (2012). Dynamin 2 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Med Okayama*, 66(3), 183-90.
- Tanifuji, S., Funakoshi-Tago, M., Ueda, F., Kasahara, T., & Mochida, S. (2013). Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling. *Journal of biological chemistry*, 288(26), 19050-19059.
- Tashiro, A., & Yuste, R. (2003). Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histology and histopathology*.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., ... & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 30(4), 572-580.
- Tinelli, E., Pereira, J. A., & Suter, U. (2013). Muscle-specific function of the centronuclear myopathy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy-associated dynamin 2 is required for proper lipid metabolism, mitochondria, muscle fibers, neuromuscular junctions and peripheral nerves. *Human molecular genetics*, 22(21), 4417-4429
- Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R., & Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature*, 402(6760), 421-425.
- Vandersmissen, I.; Biancalana, V.; Servais, L.; Dowling, J.J.; Vander Stichele, G.; Van Rooijen, S.; Thielemans, L. An integrated modelling methodology for estimating the prevalence of centronuclear myopathy. *Neuromuscul. Disord.* 2018, 28, 766–777.
- Villasana, L. E., Klann, E., & Tejada-Simon, M. V. (2006). Rapid isolation of synaptoneuroosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus. *Journal of neuroscience methods*, 158(1), 30-36.
- Wong, M. Y., Cavolo, S. L., & Levitan, E. S. (2015). Synaptic neuropeptide release by dynamin-dependent partial release from circulating vesicles. *Molecular biology of the cell*, 26(13), 2466-2474

y Cajal, S. R. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves.

Yudowski, G. A., Puthenveedu, M. A., Leonoudakis, D., Panicker, S., Thorn, K. S., Beattie, E. C., & von Zastrow, M. (2007). Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 27(41), 11112-11121.

Yuste, R. (2010). *Dendritic spines*. MIT press.

Zanoteli, E., Oliveira, A. S. B., Kiyomoto, B. H., Schmidt, B., & Gabbai, A. A. (1998). Centronuclear myopathy: histopathological aspects in ten patients with childhood onset. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 56(1), 01-08