

Índice general

Resumen	III
Índice general	XV
1 Introducción	1
1.1 Sistema nervioso periférico	1
1.1.1 Sistema nervioso somático (voluntario)	1
1.1.2 Sistema nervioso autónomo (involuntario)	2
1.1.3 Estructura de los ganglios de las raíces dorsales y tipos neuronales	2
1.2 El citoesqueleto neuronal	9
1.2.1 Filamentos de actina	11
1.2.2 Dinámica de los microtúbulos en el axón	16
1.3 El crecimiento axonal y el cono de crecimiento	19
1.3.1 Dinámica del citoesqueleto de actina en el cono de crecimiento	23
1.3.2 Dinámica del citoesqueleto de actina en el axón	25
1.3.3 Microtúbulos en el cono de crecimiento	27
1.4 Regeneración y degeneración axonal en el sistema nervioso periférico	30
1.4.1 Regeneración axonal	30
1.4.2 Degeneración axonal	35

1.5 Enfermedades del sistema nervioso periférico: la ataxia de Friedreich	40
1.5.1 Características clínicas y neuropatología de la enfermedad	42
1.5.2 Patogénesis molecular de la ataxia de Friedreich	44
1.6 Modelos murinos para el estudio de la ataxia de Friedreich	52
2 Hipótesis y Objetivos	57
2.1 Hipótesis	57
2.2 Objetivos	58
3 Materiales y métodos	61
3.1 Material Biológico	61
3.1.1 Animales	61
3.1.2 Sistema de cruces y alojamiento de la colonia	62
3.1.3 Sistema de genotipado	64
3.1.4 Anticuerpos y sondas	69
3.2 Métodos	74
3.2.1 Cultivo primario de las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (DRGs)	74
3.2.2 Procesamiento de las raíces dorsales de los DRGs lumbares para cortes en criostato	77
3.2.3 Procedimientos de inmunofluorescencia	77
3.2.4 Inmunofluorescencia en tejidos de las raíces dorsales del ganglio dorsal.	79
3.2.5 Ensayos <i>time lapse</i>	79
3.2.6 Análisis de la expresión de proteínas por Western blot.	80
3.2.7 Axotomía in vitro	81
3.2.8 Análisis de imagen para el estudio de la longitud de las neuritas y el área del cono	82
3.2.9 Análisis de número de conos y tipos de conos	83
3.2.10 Cuantificación de la fluorescencia de actina F y actina G	84
3.2.11 Medida de la intensidad de fluorescencia de las modificaciones post-traduccionales de tubulina	84
3.2.12 Análisis de los parámetros morfométricos del cono	85
3.2.13 Análisis manual del movimiento del cono	86
3.2.14 Estudio de la dinámica del cono de crecimiento mediante el Análisis de Com- ponentes Principales (PCA)	86
3.2.15 Análisis de los patrones de movimiento de los conos de crecimiento mediante tensores	89

3.2.16	Análisis del crecimiento y regeneración axonal en las cámaras microfluídicas	90
3.2.17	Análisis estadístico.	92
4	Resultados	95
4.1	Estudio in vitro de la dinámica del crecimiento axonal	95
4.1.1	Las neuronas del DRG del modelo YG8R presentan un menor número de conos de crecimiento y una morfología aberrante.	95
4.1.2	El déficit de frataxina afecta el área del cono de crecimiento y la longitud de las neuritas en las neuronas adultas del DRG.	99
4.1.3	El déficit de frataxina altera la dinámica de la actina en las neuronas sensitivas adultas	100
4.1.4	El déficit de frataxina altera la dinámica de los microtúbulos en las neuronas del DRG adultas	103
4.1.5	Activación de la cofilina en las neuronas del DRG y su influencia en la dinámica del citoesqueleto	111
4.1.6	Análisis del sistema de regulación de la Cofilina.	114
4.1.7	Regulación del proceso de desensamblaje de la actina	116
4.1.8	Estudio del perfil proteómico de los ganglios dorsales del ratón deficiente en frataxina YG8R: proteínas del citoesqueleto y el transporte axonal	117
4.2	Estudio in vivo de la dinámica del crecimiento axonal	128
4.2.1	El déficit de frataxina en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR altera la morfología de los conos de crecimiento	133
4.2.2	Los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR exhiben una dinámica aberrante.	137
4.2.3	Estudio de la dinámica de la morfología del cono de crecimiento mediante análisis de componentes principales (PCA) y cálculo tensorial.	140
4.3	Fenómeno de dying-back en la ataxia de Friedreich: estudio de cambios estructurales en el axón.	147
4.3.1	Regeneración axonal de las neuronas sensitivas adultas deficientes en frataxina	149
4.3.2	El déficit de frataxina en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR causa una reducción en su respuesta regenerativa	152
5	Discusión	157
5.1	Alteración del citoesqueleto en el cono de crecimiento de neuronas deficientes para frataxina.	158
5.2	El déficit de frataxina incrementa la actividad de cofilina y el complejo ARP2/3	164

5.3 El déficit de frataxina afecta la dinámica de los conos de crecimiento neuronales	168
5.3.1 Estudio de la dinámica del cono mediante parámetros morfométricos y rastreo manual	168
5.3.2 Estudio de la dinámica de la morfología del cono mediante métodos basados en ordenador	170
5.3.3 Metodología basada en ordenador de la dinámica de la morfología del cono. . .	172
5.4 El déficit de frataxina reduce el crecimiento y la regeneración axonal	173
6 Conclusiones	179
7 Conclusions	183
8 Anexos	187
Bibliografía	201

Índice de figuras

1.1. Estructura del sistema nervioso humano	3
1.2. Organización de la médula espinal	5
1.3. Células gliales en el ganglio de las raíces dorsales	6
1.4. Funciones de las células gliales en el DRG	8
1.5. Principales componentes del citoesqueleto neuronal	10
1.6. Polimerización de los filamentos de actina	12
1.7. Proteínas de unión a actina que regulan el ensamble y desensamble de los filamentos de actina	13
1.8. Inicio de las ramas de los filamentos de actina por el complejo ARP2/3	15
1.9. Ensamble de los microtúbulos	17
1.10. Modificaciones post-traduccionales de la α -tubulina.	19
1.11. Estructura del cono de crecimiento	21
1.12. Organización del citoesqueleto en el cono de crecimiento	22
1.13. Dinámica de actina en el cono de crecimiento	24
1.14. Ensamblajes del citoesqueleto de actina en el axón	27

1.15. Comportamiento de los microtúbulos durante las diferentes fases de la actividad del cono de crecimiento	29
1.16. Formación del cono de crecimiento o del bulbo de retracción . . .	32
1.17. Provisión del material necesario para la extensión axonal	34
1.18. Compartimentalización de las enzimas biosintéticas de NAD ⁺ en las neuronas.	36
1.19. Mecanismo molecular emergente para la degeneración Walleriana.	38
1.20. Degeneración axonal en el fenómeno de <i>dying back</i>	41
1.21. Zonas del sistema nervioso alteradas en ataxia de Friedreich (FRDA)	43
1.22. Gen que codifica para frataxina (FXN)	45
1.23. Estructura de frataxina	47
3.1. Esquema que muestra la estrategia de cruces para la obtención del modelo murino YG8R para la FRDA	63
3.2. Sitios de hibridación de las parejas de oligonucleótidos utilizados	65
3.3. Estrategia genética para aumentar las repeticiones GAA en el intrón 1 de la FXN humana para conseguir el YAC utilizado para generar el ratón transgénico YG8	66
3.4. Esquema representativo de una cámara microfluídica para cultivos neuronales (placas microfluídicas	76
3.5. Esquema utilizado para realizar la axotomía in vitro en las cámaras microfluídicas	82
3.6. Procesamiento de las imágenes de los experimentos <i>time lapse</i> .	88
3.7. Pasos para realizar las medidas del área axonal en las cámaras microfluídicas	91
4.1. El número de conos de crecimiento por neurona en el genotipo YG8R es menor que en el control C57BL/6J.	97

4.2. Imágenes confocales de las diferentes formas del cono de crecimiento en las neuronas del DRG.	98
4.3. Efecto del déficit de frataxina en el área y la morfología de los conos de crecimiento	99
4.4. Longitud de las neuritas en las neuronas del DRG del genotipo YG8R esta reducida	100
4.5. Expresión de la actina F/G en los conos de crecimiento de las neuronas de la raíz dorsal del ratón control C57BL/6J	101
4.6. Expresión de la actina F/G en los conos de crecimiento de las neuronas de la raíz dorsal del modelo YG8R	102
4.7. Efecto del déficit de frataxina en los niveles de actina F y actina G.	103
4.8. Distribución neuronal de los microtúbulos acetilados en las neuronas del DRG del genotipo control (C57BL/6J)	105
4.9. Distribución neuronal de los microtúbulos acetilados en las neuronas del DRG del genotipo YG8R	106
4.10. Distribución neuronal de los microtúbulos tirosinados en las neuronas del DRG del genotipo control (C57BL/6J)	107
4.11. Distribución neuronal de los microtúbulos tirosinados en las neuronas del DRG del genotipo YG8R	108
4.12. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los microtúbulos acetilados y tirosinados	109
4.13. Los niveles de expresión de la α -tubulina acetilada esta incrementada en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R.	110
4.14. El déficit de frataxina incrementa los niveles de de cofilina-1 en las raíces de los ganglios dorsales.	112
4.15. Análisis de la expresión Cofilina en el asta dorsal del ratón YG8R.	113
4.16. La actividad de proteínas que regulan la fosforilación de cofilina esta alterada en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R.	115
4.17. Niveles de ARP en las raíces del DRG	116

4.18. Diferencias del proteoma en el ganglio dorsal de los ratones deficientes en frataxina <i>YG8R</i>	118
4.19. Funciones moleculares de las proteínas expresadas diferencialmente en el ratón <i>YG8R</i> asociadas con el citoesqueleto y el transporte axonal	119
4.20. Mapa de la vía de regulación del citoesqueleto de actina en la base de datos KEGG.	122
4.21. Mapa de la vía de regulación de la guía axonal en la base de datos KEGG	125
4.22. Proteínas identificadas en el ciclo de vesículas sinápticas.	127
4.23. Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 2 meses de edad	131
4.24. Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 6 meses de edad	132
4.25. Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 9 meses de edad	133
4.26. La morfología de los conos de crecimiento varía en neuronas del DRG adultas de ratones <i>YG8sR</i> a los 2 y 6 meses de edad	135
4.27. La morfología de los conos de crecimiento varía en neuronas del DRG adultas de ratones <i>YG8sR</i> a los 9 meses de edad	136
4.28. Parámetros de medida para conos de crecimiento del ratón <i>YG8R</i> con 2, 6 y 9 meses	137
4.29. Secuencia de recuadros (1 min separados) de los experimentos <i>time lapse</i> de los conos de crecimiento de neuronas sensitivas adultas	138
4.30. La dinámica de los conos de crecimiento está alterada en las neuronas del DRG del ratón <i>YG8sR</i>	139
4.31. Gráfica de comparación de los componentes principales del movimiento $CP1 \perp CP2$ de los conos de crecimiento	143
4.32. Gráfica de los principales patrones de movimiento tensoriales de los conos de crecimiento	146

4.33. La capacidad de extensión axonal de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR esta reducida. 148

4.34. Las neuronas del DRG de ratón YG8sR logran formar nuevos conos de crecimiento pocas horas después de haber sido axotomizadas 151

4.35. La capacidad regenerativa axonal de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR esta reducida. 154

4.36. Respuesta regenerativa y la degeneración axonal en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR. 155

Índice de tablas

3.1. Oligonucleótidos empleados	67
3.2. Reactivos y volúmenes utilizados en las PCR	67
3.3. Programas del termociclador utilizados en las PCR	68
3.4. Reactivos y volúmenes utilizados en la PCR a tiempo real para la amplificación y cuantificación del transgén YG8	68
3.5. Programa del termociclador para la amplificación del transgén YG8 por PCR cuantitativa	68
3.6. Anticuerpos primarios empleados	70
3.7. Anticuerpos primarios empleados	71
3.8. Anticuerpos secundarios empleados	72
3.9. Sondas empleadas	73
4.1. Resumen experimentos Time Lapse de los conos de crecimiento	141
8.1. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	188

8.2. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	189
8.3. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	190
8.4. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	191
8.5. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	192
8.6. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	193
8.7. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	194
8.8. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	195
8.9. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con la guía axonal	196
8.10. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el transporte axonal	197
8.11. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el transporte axonal	198
8.12. Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el transporte axonal -continuación . .	199