

**ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DEL
COMPLEJO DE GOLGI EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS
NIGRALES Y ENTÉRICAS EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

MIREIA CARA ESTEBAN

Dirigida por:

DRA. MÓNICA TOMÁS CABALLERO

DRA. MARÍA DEL PILAR MARÍN MUELA

Doctorado en Neurociencias

Enero 2025



**VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA**



IIS La Fe
Health Research Institute

**ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DEL COMPLEJO
DE GOLGI EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS NIGRALES Y
ENTÉRICAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

MIREIA CARA ESTEBAN

Dirigida por:

DRA. MÓNICA TOMÁS CABALLERO

DRA. MARÍA DEL PILAR MARÍN MUELA



Dto. de Anatomía y Embriología Humana

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

Plataforma de Biología Celular

Instituto de Investigación Sanitaria

La Fe

Doctorado en Neurociencias

Enero 2025

Mireia Cara Esteban. Estudio morfológico y molecular del complejo de Golgi en neuronas dopaminérgicas nigrales y entéricas en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, © 2025.

Dirección de la tesis:

Dra. Mónica Tomás Caballero

Dra. María del Pilar Marín Muela

Valencia

Este trabajo ha sido financiado por los fondos de la Universidad de Valencia (referencia UV-INV-AE11-41831), la Generalitat Valenciana, a través de la Consellería de Cultura, Educación y Ciencia (referencia GV/2013/093) y la Unión Europea a través del programa fondo FEDER (European Regional Development Fund) de la Comunidad Valenciana 2014-2020.



UNIVERSITAT ID VALÈNCIA
Facultat de Medicina i Odontologia



Mónica Tomás Caballero, Doctora por la Universidad de Valencia, Profesora Titular y Secretaria del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

M^{re} del Pilar Marín Muela, Doctora por la Universidad de Valencia, Coordinadora de la Plataforma de Biología Celular del IIS La Fe de Valencia.

HACEN CONSTAR:

Que D^{ra} **Mireia Cara Esteban**, Graduada en Biología por la Universidad de Granada, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral **"Estudio morfológico y molecular del complejo de Golgi en neuronas dopaminérgicas nigrales y entéricas en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson"**. Habiendo revisado el trabajo consideramos que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el siguiente certificado.

En Valencia a 13 de enero del 2025.

MONICA|
TOMAS|
CABALLERO

Firmado digitalmente
por MONICA(TOMAS)|
CABALLERO
Fecha: 2025.01.13
12:36:36 +01'00'

Dra. Mónica Tomás Caballero

MARIA DEL
PILAR|MARIN|
MUELA

Firmado digitalmente
por MARIA DEL PILAR|
MARIN|MUELA
Fecha: 2025.01.13
12:25:43 +01'00'

Dra. M^{re} Pilar Marín Muela

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido una experiencia única, y en gran parte esto se debe a todas las personas que, de una forma u otra, han formado parte de este proceso. Espero no haberme dejado a nadie en el tintero y poder expresar mi gratitud como es debido.

En primer lugar, quiero dedicar mi más sincero agradecimiento a mis directoras, M.^a del Pilar Marín Muela y Mónica Tomás Caballero. Gracias por darme la oportunidad de adentrarme en el fascinante mundo que es la ciencia, por confiar en mí y acompañarme en este viaje de la mejor manera posible. Agradezco profundamente vuestro tiempo, esfuerzo, paciencia, apoyo constante y, por supuesto, el cariño con el que siempre me habéis guiado.

A mis compañeras de laboratorio en el IIS La Fe. A Ángela Vinué, por ser la primera de ellas en “sufrirme”, por transmitirme su conocimiento y por todo el tiempo que me ha dedicado. A Marina Piqueras, Irene Cruz y Silvia López, ojalá haberos conocido antes, gracias por ese compañerismo en el laboratorio y por compartir conmigo el mundo de los cultivos celulares.

Gracias a mis compañeros del Dpto. de Anatomía y Embriología Humana de la Universitat de València. A Vicent Teruel y a Sergio Martínez, por su inestimable ayuda con el modelo animal de rata. A Ana Cervera por permitirme realizar mi primera estancia en su laboratorio de circuitos neuronales, a Hanna y Alicia por enseñarme parte de su trabajo en él. Finalmente, a Ana Barberá, por haberme acompañado y ayudado durante mis andaduras por la Facultad de Medicina.

A continuación, quisiera agradecer a José Ángel Martínez y a Emma Martínez brindame la oportunidad de realizar mi segunda estancia con ellos en la Universidad de Murcia. Gracias por enseñarme todo el trabajo que conlleva la microscopía electrónica, por la constante amabilidad y cercanía de los dos.

A nivel personal, quiero mencionar a mis compañeros de la Fe, en especial a Ana Bonora, Cristóbal Aguilar, M.^a Ángeles Tormo, Patricia Bernabé, Raquel Amigo...A mis compañeros predoctorales, en especial a Isaac, Lorena, Marilú y Júlía, a todos, por hacerme sentir que estás en casa fuera de casa.

No quiero olvidarme de mis amigos, tanto de Valencia como de Almería. A M.^a del Mar y Fran por ser los mejores compañeros de piso que podría haber tenido, y a Violeta, mi gran descubrimiento de Valencia. A mis amigos, Inma, Fer, Loli, Merche², Luisa y Emilio, por acompañarme, antes, durante y después de la elaboración de esta tesis...y siempre.

Por último, pero sin duda los más importantes, a mi familia. A Antonio y Mercedes, mis padres, por darme alas desde el primer momento en todo lo que me he propuesto, por ser mi apoyo incondicional y el refugio al que siempre quiero volver. Esta tesis no podría haber sido posible sin ellos. A mi hermano Antonio, por aguantar mi peor humor y estar ahí siempre, sin importar las circunstancias. Y a Sofí, mi perrita, ojalá fueses eterna. Os quiero.

A todos, gracias.

A mi familia.

“Si he logrado ver más lejos, es porque he subido a hombros de gigantes.”

- *Isaac Newton*

Índice

I.	Resumen	1
II.	Introducción	7
1.	Marco teórico y conceptual de la enfermedad de Parkinson	7
1.1.	Etiología de la enfermedad de Parkinson	7
1.1.1.	<i>Factores genéticos.....</i>	<i>7</i>
1.1.2.	<i>Factores ambientales</i>	<i>9</i>
1.2.	Sintomatología de la enfermedad de Parkinson.....	10
1.3.	Métodos de diagnóstico de la enfermedad de Parkinson	11
1.4.	Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.....	12
1.4.1.	<i>Aspectos generales de la dopamina en el contexto de la enfermedad de Parkinson.....</i>	<i>13</i>
1.4.2.	<i>Mecanismo fisiopatológico de la lesión dopaminérgica en el sistema nervioso central.....</i>	<i>14</i>
1.5.	Histopatología de la enfermedad de Parkinson.....	16
1.6.	Tratamiento en la enfermedad de Parkinson.....	17
1.6.1.	<i>Tratamiento farmacológico convencional para la sintomatología motora.....</i>	<i>17</i>
1.6.2.	<i>Tratamiento farmacológico para la sintomatología no motora</i>	<i>19</i>
1.6.3.	<i>Tratamiento quirúrgico para la enfermedad de Parkinson</i>	<i>19</i>
1.6.4.	<i>Terapias alternativas para la enfermedad de Parkinson.....</i>	<i>20</i>
2.	La α-sinucleína en la enfermedad de Parkinson.....	21
2.1.	Estructura de la α -sinucleína.....	22
2.2.	Papel fisiológico de la α -sinucleína	22
2.3.	Agregación de la α -sinucleína y formación de cuerpos de Lewy	24
2.4.	Citopatología de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson.....	26
2.4.1.	<i>Déficit en la actividad mitocondrial</i>	<i>26</i>
2.4.2.	<i>Estrés en el retículo endoplasmático</i>	<i>27</i>
2.4.3.	<i>Alteraciones en el transporte intracelular.....</i>	<i>27</i>
2.4.4.	<i>Estrés oxidativo por neuroinflamación.....</i>	<i>28</i>
2.5.	Agregación de la α -sinucleína fuera del sistema nervioso central	28
3.	El colon en la enfermedad de Parkinson.....	30
3.1.	Inervación intrínseca del colon: el sistema nervioso entérico.....	32
3.1.1.	<i>Distribución histológica del sistema nervioso entérico.....</i>	<i>32</i>
3.1.2.	<i>Tipos neuronales en el sistema nervioso entérico</i>	<i>33</i>

3.2.	Inervación extrínseca del colon.....	36
3.2.1.	<i>Inervación vegetativa parasimpática del colon</i>	36
3.2.2.	<i>Inervación vegetativa simpática del colon</i>	38
3.3.	Marco teórico del sistema nervioso entérico en la enfermedad de Parkinson: Teorías sobre el origen de la propagación de la α -sinucleína. Top-down vs Bottom up.....	38
4.	Modelos experimentales inducidos por neurotoxinas en la enfermedad de Parkinson .	40
4.1.	Modelo animal inducido por 6-hidroxidopamina	41
4.2.	Otros modelos animales inducidos por neurotoxinas.....	42
4.2.1.	<i>1-metil-4-fenil-6-tetrahidropirimidina</i>	43
4.2.2.	<i>Paraquat, rotenona y otras neurotoxinas</i>	43
5.	Organización estructural y funcional de la vía secretora y el complejo de Golgi en neuronas	44
5.1.	La vía secretora: Síntesis y plegamiento de proteínas.....	45
5.2.	El complejo de Golgi.....	47
5.2.1.	<i>El transporte bidireccional en el complejo de Golgi</i>	48
5.2.2.	<i>Clasificación y transporte en la red del Trans-Golgi</i>	48
5.2.3.	<i>Proteínas estructurales y de mantenimiento del complejo de Golgi</i>	49
5.3.	Exocitosis.....	51
5.3.1.	<i>Vesículas sinápticas</i>	51
5.3.2.	<i>Vesículas extracelulares: Exosomas</i>	52
6.	Maquinaria molecular del transporte intracelular.....	55
6.1.	Proteínas reguladoras del transporte: Rab GTPasas	55
6.2.	Proteínas de anclaje y fusión de membranas: SNAREs.....	59
6.2.	Citoesqueleto.....	62
7.	Alteraciones del tráfico intracelular en la neurodegeneración	64
III.	Hipótesis y objetivos.....	69
1.	Justificación.....	69
2.	Hipótesis	70
3.	Objetivos	71
IV.	Material y métodos	77
1.	Anticuerpos y reactivos.....	77
2.	Modelo experimental.....	77
2.1.	Sujetos experimentales.....	77
2.2.	Procedimiento quirúrgico.....	78
2.3.	Sacrificio, perfusión y obtención de muestras biológicas	80
3.	Estudio morfológico y cuantitativo mediante microscopía óptica	82

3.1.	Análisis histológico	82
3.2.	Inmunofluorescencia	83
3.2.1.	<i>Procesado de muestras y obtención de cortes con criostato</i>	83
3.2.2.	<i>Inmunomarcaje</i>	84
3.3.	Microscopía de fluorescencia.....	85
3.4.	Microscopía confocal	85
3.5.	Análisis de datos	86
4.	Inmunodetección y cuantificación de proteínas por Western-blotting	86
4.1.	Extracción y determinación de proteínas.....	86
4.2.	Técnicas electroforéticas.....	87
4.2.1.	<i>Electroforesis</i>	87
4.2.2.	<i>Transferencia a membrana</i>	88
4.3.	Métodos de detección de proteínas	88
4.3.1.	<i>Tinción con azul de coomasie</i>	88
4.3.2.	<i>Inmunodetección de proteínas electrotransferidas</i>	89
4.4.	Cuantificación y análisis estadístico	90
5.	Microscopía electrónica de transmisión	90
5.1.	Análisis ultraestructural.....	90
5.1.1.	<i>Procesamiento de muestras</i>	90
5.1.2.	<i>Obtención y tinción de secciones semifinas y ultrafinas</i>	91
5.1.3.	<i>Estudio ultraestructural y análisis estadístico de imágenes</i>	93
5.2.	Crio-microscopía electrónica	93
5.2.1.	<i>Procesamiento de muestras</i>	93
5.2.2.	<i>Crioultramicrotomía</i>	94
5.2.3.	<i>Crioimmunocitoquímica</i>	95
V.	Resultados	99
	<i>Capítulo 1: Análisis morfológico y molecular de la sustancia negra pars compacta</i>	99
1.1.	Evaluación del efecto inducido por la neurotoxina 6-hidroxidopamina.....	99
1.2.	Reactividad astrocitaria en la sustancia negra pars compacta	101
1.3.	Análisis de la distribución de la proteína α -sinucleína tras la lesión dopaminérgica.....	103
1.4.	Fragmentación del complejo de Golgi en las neuronas dopaminérgicas ..	105
1.5.	Análisis de la distribución de proteínas involucradas en la citoarquitectura del complejo de Golgi y en el tráfico intracelular de membranas.....	110
1.5.1.	<i>Sintarina-5</i>	110
1.5.2.	<i>Rab1a GTPasa</i>	111
1.5.3.	<i>Rab2a GTPasa, β-COP y GRASP65</i>	114

1.5.4.	<i>β-tubulina III, actina y neurofilamentos.....</i>	116
1.6.	Estudio ultraestructural en las neuronas dopaminérgicas	120
1.6.1.	<i>Análisis de la citoarquitectura del complejo de Golgi</i>	120
1.6.2.	<i>Identificación ultraestructural de cuerpos multivesiculares en las neuronas dopaminérgicas.....</i>	123
1.7.	Análisis morfológico de los cambios de distribución de proteínas marcadoras de exosomas en la sustancia negra pars compacta.....	124
1.7.1.	<i>Rab3a GTPasa.....</i>	125
1.7.2.	<i>Rab27a GTPasa.....</i>	127
1.7.3.	<i>CD63.....</i>	128
1.8.	Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas implicadas en la citoarquitectura del complejo de Golgi y en el tráfico de membranas.....	132
Capítulo 2:	<i>Análisis morfológico de las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso entérico en el colon.....</i>	134
2.1.	Identificación de los plexos de Auerbach y de Meissner en el colon	134
2.2.	Evaluación de la lesión dopaminérgica inducida por 6-hidroxidopamina en el sistema nervioso entérico	136
2.3.	Análisis morfológico de la población neuroglial.....	137
2.4.	Análisis morfológico de la distribución de la proteína α-sinucleína	142
2.5.	Fragmentación del complejo de Golgi en neuronas dopaminérgicas	144
2.6.	Estudio morfológico del complejo de Golgi en otros tipos neuronales.....	148
2.7.	Análisis de la distribución de proteínas involucradas en el tráfico de membranas en las neuronas dopaminérgicas.....	152
2.7.1.	<i>Syntaxina-5.....</i>	152
2.7.2.	<i>Rab1a GTPasa.....</i>	154
2.7.3.	<i>GRASP65.....</i>	156
2.7.4.	<i>β-tubulina III y neurofilamentos.....</i>	158
2.8.	Análisis de proteínas marcadoras de exosomas en neuronas dopaminérgicas.....	162
2.8.1.	<i>Rab3a GTPasa.....</i>	162
2.8.2.	<i>CD63.....</i>	164
2.8.3.	<i>Rab27a GTPasa.....</i>	166
VI.	Discusión	171
1.	La microinyección unilateral de 6-hidroxidopamina en la sustancia negra de rata como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson	171
2.	La proteína α-sinucleína en la sustancia negra pars compacta como indicador de la enfermedad de Parkinson	172

3.	La fragmentación del complejo de Golgi en las neuronas dopaminérgicas como sello citopatológico de la enfermedad de Parkinson.....	175
3.1.	¿Causa o consecuencia de la muerte celular?.....	175
3.2.	La alteración en la expresión de proteínas implicadas en el tráfico intracelular y el complejo de Golgi en la búsqueda de nuevas dianas moleculares.....	177
4.	El sistema nervioso entérico como nuevo tejido de estudio en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson: Nueva perspectiva holística	183
4.1.	La propagación de la α -sinucleína: Teoría del "bottom-up" vs "top-down".....	183
4.2.	La fragmentación del complejo de Golgi y alteraciones en el tráfico intracelular en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso entérico	187
5.	Posibles vías de transmisión de la enfermedad de Parkinson: Nuevas perspectivas futuras.....	190
5.1.	Vía nerviosa autónoma	190
5.2.	Exosomas	192
6.	El complejo de Golgi y el tráfico de membranas: Una nueva perspectiva en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson	195
VII.	Conclusiones.....	201
VIII.	Referencias	205
IX.	Anexos.....	243
Anexo I.	Listado de anticuerpos utilizados para el estudio morfológico, bioquímico y ultraestructural de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el SNE.....	243
Anexo II.	Principales reactivos utilizados para el desarrollo de técnicas para el estudio morfológico, bioquímico y ultraestructural.	244
Anexo III.	QR de los videos de la reconstrucción 3D del CG de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y del SNE.....	246

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Síntomas no motores en la EP.....	11
Figura 1. Vías dopaminérgicas en el SNC y efecto de la depleción de dopamina en los ganglios basales.....	15
Figura 2. Cuerpos de Lewy en neuronas dopaminérgicas de la SNpc.....	24
Figura 3. Citopatología de la oligomerización de la α -sinucleína.....	29
Figura 4. Representación gráfica de la innervación extrínseca eferente del colon.....	31
Figura 5. Representación gráfica de la disposición del SNE en el ser humano.....	32
Figura 6. Organización del sistema nervioso autónomo en el SNE.....	36
Figura 7. Detección por técnica de inmunohistoquímica de neuronas dopaminérgicas en la SNpc de rata tras la microinyección unilateral de 6-OHDA.....	42
Figura 8. Representación gráfica de la formación de vesículas extracelulares.....	53
Figura 9. Esquema de la vía secretora en neuronas.....	54
Figura 10. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la formación de exosomas en neurona.....	54
Figura 11. Esquema de fusión de membranas mediada por complejos SNARE.....	60
Figura 12. Esquema de la maquinaria molecular del transporte intracelular.....	62
Figura 13. Esquema de la implicación del transporte intracelular en la neurodegeneración.....	66
Figura 14. Imagen representativa del proceso de microinyección estereotáxica de la neurotoxina 6-OHDA en un hemisferio cerebral de rata en el marco estereotáxico.....	79
Figura 15. Esquema de la localización estereotáxica de la SNpc en rata modelo.....	80
Figura 16. Ilustración del procedimiento de inclusión de muestras post-fijadas y deshidratadas de SNpc en moldes para la obtención de bloques incluidos en resina Epon 812.....	93
Figura 17. Imágenes representativas de la distribución de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA por inmunofluorescencia de la proteína TH.....	100
Figura 18. Imágenes representativas de la distribución de células gliales de la SNpc en el hemisferio control y en el hemisferio inyectado con 6-OHDA detectadas por inmunofluorescencia de la proteína GFAP.....	102
Figura 19. Imágenes representativas de la distribución de la proteína α -sinucleína en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA por inmunofluorescencia.....	104
Figura 20. Imagen representativa de la citoarquitectura del CG, inmunomarcado con la proteína GM130, de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.....	106
Figura 21. Imágenes representativas de la reconstrucción 3D del CG, realizada con el software Imaris, de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA, inmunomarcado con GM130.....	107

Figura 22. Estudio cuantitativo de la citoarquitectura del CG mediante análisis de imagen con ImageJ.....	109
Figura 23. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de la proteína syntaxina-5 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA.....	112
Figura 24. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de Rab1a en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio lesionado con 6-OHDA.....	113
Figura 25. Imagen representativa de la inmunofluorescencia de Rab2a, β -COP y GRASP65 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc.....	118
Figura 26. Imágenes representativas de la distribución de proteínas marcadoras del citoesqueleto en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA.....	119
Figura 27. Imágenes representativas del CG, realizadas por microscopía electrónica de transmisión, de neuronas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio lesionado con 6-OHDA.....	121
Figura 28. Cuantificación de diferentes variables de análisis morfológico de la citoarquitectura del CG mediante análisis de imagen por ImageJ.....	123
Figura 29. Imagen representativa de endosoma tardío en neurona dopaminérgica de la SNpc.....	124
Figura 30. Imágenes representativas del inmunomarcaje de Rab3a en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA.....	126
Figura 31. Imágenes representativas del inmunomarcaje de Rab27a en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA.....	127
Figura 32. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de CD63 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA.....	130
Figura 33. Representación gráfica del análisis cuantitativo de la expresión de proteínas en la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA mediante Western-blot.....	133
Figura 34. Imágenes representativas de la identificación de los plexos nerviosos del SNE por microscopía óptica de campo claro, mediante tinción histológica con azul de toluidina de secciones de muestras de colon proximal.....	135
Figura 35. Imágenes representativas de la identificación de neuronas dopaminérgicas en los plexos mientérico y submucoso en muestras control de colon proximal, mediante microscopía óptica de fluorescencia convencional.....	136

Figura 36. Análisis morfológico de la distribución y cuantificación de las neuronas dopaminérgicas (TH positivas) de los plexos mientéricos de colon proximal y colon distal.....	139
Figura 37. Análisis morfológico de la distribución y cuantificación de las células gliales entéricas (GFAP positivas) y cuantificación de fluorescencia en el SNE, de muestras de colon proximal y colon distal.....	141
Figura 38. Análisis morfológico de la distribución y cuantificación de la fluorescencia de la proteína α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de plexos mientéricos de muestras de colon proximal y muestras de colon distal.....	143
Figura 39. Análisis morfológico de la citoarquitectura del CG mediante la inmunofluorescencia de GM130, en plexos mientéricos de muestras de colon proximal y distal.....	147
Figura 40. Reconstrucción 3D del CG y análisis cuantitativo de la dispersión del inmunomarcaje de la proteína GM130 en neuronas dopaminérgicas de los plexos del SNE de muestras de colon proximal y distal.....	149
Figura 41. Cuantificación de neuronas NOS y ChAt positivas en el SNE por inmunofluorescencia.....	150
Figura 42. Imágenes de microscopía confocal representativas del análisis morfológico mediante inmunofluorescencia, de la citoarquitectura del CG en diferentes tipos neuronales en plexos mientéricos de colon proximal por microscopía confocal	151
Figura 43. Análisis morfológico de la distribución y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la proteína syntaxina-5 en neuronas TH positivas por inmunofluorescencia en los plexos analizados del SNE de muestras de colon proximal, y colon distal.....	153
Figura 44. Análisis morfológico de la distribución y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la proteína GTPasa Rab1a en neuronas TH positivas por inmunofluorescencia en los plexos analizados del SNE de muestras de colon proximal, y colon distal.....	155
Figura 45. Análisis morfológico y cuantificación de la fluorescencia relativa de la proteína GRASP65 en las neuronas TH positivas por inmunofluorescencia en los plexos analizados del SNE de muestras de colon proximal, y colon distal.....	157
Figura 46. Análisis morfológico por inmunofluorescencia de la proteína β -tubulina III y cuantificación de la intensidad de fluorescencia por análisis de imagen en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon.....	159
Figura 47. Análisis morfológico por inmunofluorescencia de los neurofilamentos y cuantificación de la intensidad de fluorescencia por análisis de imagen en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal y muestras de colon distal.....	161
Figura 48. Inmunodetección mediante inmunofluorescencia y análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de la proteína Rab3a en neuronas TH positivas de plexos mientéricos de colon proximal y colon distal.....	163

Figura 49. Inmunofluorescencia y análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de la proteína CD63 en neuronas TH positivas de plexos mientéricos de colon proximal y distal en muestras controles y del modelo inducido por 6-OHDA.....	165
Figura 50. Inmunofluorescencia de la proteína Rab27a en neuronas TH positivas de plexos mientéricos de colon proximal y colon distal de muestras controles y del modelo inducido por 6-OHDA.....	167

ABREVIATURAS

Abreviaturas

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

AADC: Carboxilasa de aminoácidos aromáticos

ACh: Acetilcolina

APs: Complejos adaptadores de proteínas

AVT: Área ventral tegmental

BSA: Albúmina de suero bovino

CG: Complejo de Golgi

CGN: Red del cis-Golgi

ChAT: Acetiltransferasa de colina

CMV: Cuerpo multivesicular

COMT: Catecol-O-metil transferasa

COP: Proteínas de cubierta vesicular

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DOPAC: Ácido 3,4-hidroxifenilacético

DOPAL: 3,4-hidroxifenilacetaldehído

DTT: Diclorofeniltricloroetano

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EP: Enfermedad de Parkinson

EPC: Estimulación profunda del cerebro

ERAD: Degradación asociada al retículo endoplasmático

ERES: Lugares de salida del retículo endoplasmático

ERGIC: Compartimento intermedio

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GAPs: Proteínas activadoras de GTPasas

GBA: Glucocerebrosidasa

GDF: Factor de desplazamiento de GDI

GDI: Inhibidores de asociación con GDP

GDP: Guanosín difosfato

GI: Gastrointestinal

GP: Globo pálido

GPe: Globo pálido externo

GPI: Globo pálido interno

GTP: Guanosín trifosfato

HRP: Peroxidasa

IGLEs: Terminaciones intra-ganglionicas laminares

IPANs: Neuronas aferentes intrínsecas primarias

ISRS: Inhibidores de la recaptación de serotonina

L-DOPA: 1-dihidroxifenilalanina

LRRK2: *Leucine-rich repeat kinase 2*

MAO: Enzima monoaminoxidasa

MPP+: 1-metil-4-fenilpiridinio

MPTP: 1-metil-4-fenil-6-tetrahidropiridina

NA: Noradrenalina

NAc: Núcleo accumbens

NA-NC: No adrenérgico y no colinérgico

NF-H: Neurofilamento pesado

NOS: Óxido nítrico sintasa

NSF: Proteína de fusión al factor sensible de N-etilmaleimida

NST: Núcleo subtalámico

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SN: Sustancia negra

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNAP: Proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida

SNARE: Proteínas receptoras del factor sensible a N-etilmaleimida

SNC: Sistema nervioso central

SNE: Sistema nervioso entérico

SNP: Sistema nervioso periférico

SNpc: Sustancia negra pars compacta

SNpr: Sustancia negra pars reticulata

TBS-T: Tampón Tris salino

TGN: Red del trans-Golgi

TH: Tirosina hidroxilasa

V-MAT2: Transportador vesicular de monoaminas 2

VAMP2: Proteína de membrana asociada a vesículas sinápticas

I

RESUMEN

I. Resumen

La enfermedad de Parkinson es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer, afectando aproximadamente al 1% de la población mayor de 65 años. Se caracteriza por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta, siendo el sello citopatológico principal la aparición de agregados proteicos intracitoplasmáticos denominados cuerpos de Lewy. Estos agregados están compuestos principalmente por formas fibrilares de la proteína α -sinucleína, cuya acumulación se vincula a la disrupción de diversos mecanismos moleculares, como la producción de dopamina y el transporte intracelular. En el proceso de agregación de la α -sinucleína, se distinguen varias formas intermedias, incluyendo las formas oligoméricas y prefibrilares, que poseen propiedades estructurales, funcionales y de toxicidad distintas.

La agregación de α -sinucleína y la formación de cuerpos de Lewy no se limitan a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, sino que también se observan en otras regiones del sistema nervioso periférico, como el sistema nervioso entérico. Sin embargo, el valor diagnóstico de los agregados de α -sinucleína es limitado, ya que este marcador citopatológico también se ha observado en otras enfermedades neurodegenerativas y en muestras post-mortem de individuos sanos. Por tanto, dado que el examen post-mortem del cerebro sigue siendo la única prueba de diagnóstico definitivo de la enfermedad y que el diagnóstico se basa principalmente en aspectos sintomatológicos, existe la necesidad de identificar nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz de la enfermedad. Existen diversas teorías que intentan explicar la propagación de las formas fibrilares de α -sinucleína y la conexión bidireccional entre el sistema nervioso entérico y el sistema nervioso central, aunque aún persisten muchas incógnitas por esclarecer.

Estudios recientes han demostrado que, en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Parkinson, el complejo de Golgi se fragmenta y dispersa como resultado de alteraciones en el proceso del tráfico intracelular. Investigaciones previas de nuestro grupo, realizadas en un modelo celular de la enfermedad, demostraron alteraciones en la citoarquitectura del complejo de Golgi y en varias proteínas implicadas en diferentes etapas del tráfico de membranas, previas a la formación de cuerpos de Lewy.

El objetivo principal de esta tesis doctoral es profundizar en el estudio de las bases citopatológicas de la enfermedad de Parkinson, mediante el análisis morfológico de la citoarquitectura del complejo de Golgi y del tráfico intracelular en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta y del sistema nervioso entérico, utilizando un modelo experimental de rata hemiparkinsoniana inducido por la microinyección estereotáxica unilateral de 6-hidroxidopamina.

Los resultados de esta tesis, obtenidos mediante técnicas morfológicas convencionales y de alta resolución, combinadas con técnicas bioquímicas y de biología molecular en este modelo de rata hemiparkinsoniana, revelan que las neuronas dopaminérgicas de los plexos nerviosos del sistema nervioso entérico del colon presentan un comportamiento similar al de las neuronas de la sustancia negra pars compacta. El complejo de Golgi de las neuronas dopaminérgicas de ambas regiones aparece fragmentado, presentando una alteración en la distribución y niveles de expresión de proteínas implicadas en el mantenimiento de su citoarquitectura y en el transporte intracelular, como la GTPasa Rab1a y la SNARE syntaxina-5. Estas alteraciones no son consecuencia de la formación de cuerpos de Lewy, ya que estos están ausentes en este modelo, lo que sugiere que podrían representar eventos tempranos que preceden a la aparición de los cuerpos de Lewy en el desarrollo de la citopatología.

El estudio comparativo de las neuronas dopaminérgicas del colon proximal y del colon distal muestra resultados similares. Considerando que el nervio vago inerva principalmente la porción proximal del colon, estos hallazgos apuntan que el nervio vago podría no ser la única vía de transmisión de la citopatología. Por ello, se han analizado alteraciones de proteínas implicadas en la biogénesis de vesículas extracelulares, como la Rab3a GTPasa y la tetraspanina CD63, proponiendo a los exosomas como una posible vía alternativa de transmisión. Los resultados revelan una mayor presencia de estas proteínas en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central y del sistema nervioso entérico en este modelo experimental, lo que sugiere una posible sobreproducción de estas vesículas extracelulares o una acumulación intracitoplasmática provocada por la interrupción de su transporte intracelular en la enfermedad de Parkinson.

Nuestros resultados apoyan el estudio del complejo de Golgi y del tráfico intracelular como nuevas líneas de investigación orientadas al avance en el conocimiento de la citopatología de la enfermedad de Parkinson y proponen el uso de biopsias de colon como una nueva ventana de estudio para la búsqueda de biomarcadores que puedan mejorar el diagnóstico precoz.

II

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

1. Marco teórico y conceptual de la enfermedad de Parkinson

En 1817, James Parkinson describió una enfermedad que denominó “parálisis agitante” en un ensayo sobre seis pacientes que, según las propias palabras del autor, no pareció llamar la atención de los compañeros de profesión (Dorsey et al., 2018; Parkinson, 2002). Doscientos años después, la enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente, tras la enfermedad de Alzheimer, afectando a más de 6 millones de personas en todo el mundo. La prevalencia de esta enfermedad, que suele manifestarse principalmente en personas mayores de 65 años, está en constante aumento, estimándose aproximadamente 12 millones de casos en el año 2040 (Dorsey et al., 2018). Este incremento se debe en gran parte al envejecimiento poblacional, siendo la senectud, el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

En la actualidad, el diagnóstico de la EP sigue suponiendo un desafío, ya que se carece de biomarcadores de la enfermedad o de pruebas de diagnóstico específicas. En su lugar, este se basa principalmente en la evaluación de síntomas motores que también pueden estar presentes en otras enfermedades neurodegenerativas, lo que conlleva una tasa de error en el diagnóstico de hasta un 25% (Tolosa et al., 2021). Además, a pesar de la disponibilidad de una batería de tratamientos paliativos para la EP, esta sigue siendo hoy en día, una enfermedad sin cura.

1.1. Etiología de la enfermedad de Parkinson

La EP es un trastorno neurodegenerativo complejo, y su etiología sigue siendo objeto de investigación. Si bien, no se conoce completamente la causa exacta de la enfermedad, se cree que es el resultado de una combinación de factores genéticos y ambientales.

1.1.1. Factores genéticos

A pesar de que la mayoría de los casos de EP son de origen esporádico, se han identificado múltiples alteraciones genéticas que suponen una predisposición a

padecer la enfermedad, representando entre un 5 y un 10% de los casos totales (Simon et al., 2020).

Actualmente, se han descrito alteraciones vinculadas a la EP en hasta 28 genes distintos (Khan et al., 2019). Entre las mutaciones génicas más estudiadas, se encuentran las relativas al gen SNCA, el cual codifica la proteína α -sinucleína. Las mutaciones en este gen dan lugar a alteraciones en la síntesis y plegamiento de la proteína α -sinucleína, lo que termina provocando su acumulación y la consecuente formación de los cuerpos de Lewy, el principal sello histopatológico de la enfermedad (Raza et al., 2019). Las mutaciones más frecuentes en este gen son mutaciones de cambio de sentido (A53T, A30P, E46K, H50Q, A53E...), las cuales son de herencia autosómica dominante, tienen una alta penetrancia y se asocian con una EP de progreso rápido en personas de entre 40 y 50 años (Zhang et al., 2018).

A pesar de la importancia de la α -sinucleína en la EP, en el caso del Parkinson familiar, la principal causa viene dada por las mutaciones en el gen para la LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) o PARK8 por su relación con la EP (Khan et al., 2019; Zhang et al., 2018), representando hasta un 40% de los casos. Las mutaciones asociadas al gen de la LRRK2 (N1437H, R1441C/G/H, Y1699C, G2019S, I2020T...), se han vinculado con alteraciones en la dinámica de microtúbulos, el tráfico vesicular, la sinapsis neuronal, la alteración en la regulación de la dopamina o la acumulación de la α -sinucleína (Jeong y Lee, 2020).

Algunas mutaciones en otros genes como el GBA (enzima glucocerebrosidasa), VPS35 (proteína de clasificación vacuolar), Parkin, PINK1 o el DJ-1, también se han relacionado con la EP (Zhang et al., 2018). Sin embargo, a pesar de su vinculación directa con el desarrollo de la EP, las mutaciones mencionadas, no se encuentran en la mayor parte de los pacientes diagnosticados de la EP, y cuando aparecen, en la mayoría de los casos, son mutaciones con penetrancia incompleta, indicando que debe de haber otros factores ambientales o genéticos involucrados en el desarrollo de la enfermedad (Simon et al., 2020).

Alteraciones en el tráfico intracelular

Los recientes avances en genética y en modelos animales, indican que las alteraciones en el tráfico intracelular son un evento temprano en la patogénesis de la

EP y de otras enfermedades neurodegenerativas (Hasegawa et al., 2017). Varios de los genes implicados en la EP, como el **LRRK2**, tienen un papel relevante en la ruta de endocitosis y en el tráfico de vesículas sinápticas, regulando incluso, la función de proteínas implicadas en el mantenimiento del transporte intracelular como las Rab GTPasas (Sheehan y Yue, 2019).

1.1.2. Factores ambientales

La exposición a factores ambientales se ha considerado factor de riesgo para padecer la EP desde que accidentalmente Langston et al. en 1983, describiesen un síndrome parkinsoniano a raíz de la administración intravenosa de 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina (MPTP), un compuesto secundario que se forma a partir de la síntesis de meperidina, un opioide cuyo abuso podía provocar esta sobreexposición (Langston et al., 1983). En el caso del MPTP, posteriormente se descubrió que es un compuesto que atraviesa la barrera hematoencefálica y que tiene afinidad por los canales de dopamina, bloqueándolos y provocando daño neuronal (Yuan et al., 2021). Desde entonces, se han descrito una gran variedad de factores ambientales cuya exposición induce o predispone a padecer la EP.

Exposición química

Existen otros ejemplos de compuestos químicos cuya exposición continuada se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar la EP, como son los pesticidas como la rotenona, el paraquat, el dicloro difenil tricloroetano (DDT) o la dieldrina (Yuan et al., 2021; Huang et al., 2022). Mientras que algunos de estos compuestos han caído en desuso por su elevada toxicidad, existen nuevos factores de riesgo, como las partículas en suspensión debidas a la contaminación ambiental o el entorno laboral, las cuales provocan la acumulación de metales pesados en el organismo, como pueden ser el manganeso, el cobre, el hierro, el mercurio, el plomo, el aluminio o el bismuto entre otros (Bjorklund et al., 2018; Vellingiri et al., 2022).

Estos metales, pueden ser fagocitados por macrófagos o atravesar directamente la barrera hematoencefálica, llegando así a diversas áreas del sistema nervioso central (SNC), como la sustancia negra pars compacta (SNpc), lo que a su vez puede dar lugar a una lesión neuronal (Bjorklund et al., 2018).

Infección vírica

La relación entre las infecciones víricas y la EP se comienza a describir tras la pandemia de 1918, causada por el virus de la influenza H1N1 (Smeyne et al., 2021). Desde entonces, las infecciones causadas por ciertos virus se han relacionado con un mayor riesgo de padecer la EP, entre ellos, los virus de la hepatitis B y C, el virus del VIH, el virus del herpes simple (HSV-1) o el virus de la reciente COVID-19 (SARS-CoV-2) (Leta et al., 2022; Mysiris et al., 2022). Aunque el mecanismo molecular por el que causan esta mayor predisposición a padecer la EP no está claro, se ha descrito que estos virus pueden producir una cascada de citoquinas inflamatorias en el SNC que induciría la lesión dopaminérgica (Smeyne et al., 2021), además de estar relacionados con la agregación de la α -sinucleína (Yuan et al., 2021) o en el caso de virus neurotrópicos, pueden provocar daño neuronal directo.

Microbiota

Algunos estudios sostienen, que la alteración en la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal, puede ser un factor de riesgo para padecer la EP, debido a diferencias significativas encontradas en las poblaciones bacterianas de individuos sanos y pacientes de EP. En concreto, la sobrepoblación de las familias, Bifidobacterium, Lactobacillaceae o Streptococcaceae o la depleción de la familia de las Prevotellaceae (Scheperjans et al., 2015), se ha asociado a acumulación de α -sinucleína (Shen, 2020), inducción de citoquinas inflamatorias, aumento de la permeabilidad intestinal o liberación de neurotoxinas (Sun y Shen, 2018).

1.2. Sintomatología de la enfermedad de Parkinson

La variedad de síntomas que se asocian a la EP se origina por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en el mesencéfalo. Esta sintomatología se puede clasificar en síntomas motores y síntomas no motores (Reich y Savitt, 2019). Entre los síntomas motores más característicos se encuentran: bradicinesia (lentificación de los movimientos) o acinesia (ausencia de movimiento), tremor (movimiento involuntario), rigidez, amimia facial (pérdida de expresión facial), disminución del parpadeo y alteración en la postura, siendo el tremor el síntoma más reconocido de la enfermedad, presentándose en más del 70% de los pacientes (Beitz, 2014).

Sin embargo, estos síntomas motores se presentan cuando ya se ha producido una degeneración superior al 50% de las neuronas dopaminérgicas, con la consiguiente dificultad para realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad. Aunque son menos conocidos, los síntomas no motores de la EP se presentan en hasta el 90 % de los pacientes, previamente a los síntomas motores (Beitz, 2014). Entre los síntomas no motores, son destacables la anosmia (pérdida del olfato), alucinaciones, estreñimiento, trastorno del sueño REM, fatiga o depresión (Tabla 1) (Reich y Savitt, 2019; Reichmann, 2017).

Tabla 1. Síntomas no motores en la EP. Tabla de elaboración propia basada en Reich y Savitt, (2019).

Categoría	Síntoma
Neuropsiquiátrico	• Alucinaciones • Demencia • Fatiga • Apatía • Ansiedad • Depresión • Disfunción cognitiva
Autonómico	• Estreñimiento • Disfagia • Incontinencia fecal • Sialorrea • Hipotensión ortostática
Sensorial	• Anosmia • Visión borrosa • Dolor
Sueño	• Trastorno del sueño REM • Insomnio • Excesivo sueño diurno • Síndrome de piernas inquietas

1.3. Métodos de diagnóstico de la enfermedad de Parkinson

Como hemos comentado anteriormente, la EP es una enfermedad crónica, que afecta principalmente al sistema motor por el déficit de dopamina en la vía nigroestriatal, originando los síntomas motores en el 70% de los pacientes. Sin embargo, la sintomatología motora se presenta tras una degeneración de más del 50% de las neuronas dopaminérgicas en el SNC, por lo que realizar un diagnóstico de la EP en las primeras etapas de la patología, sigue siendo hoy en día un desafío y una necesidad médica.

El diagnóstico de la EP se realiza principalmente en base a la examinación clínica, considerándose normalmente la bradiquinesia y el tremor síntomas necesarios para diagnosticar la enfermedad (Kobylecki, 2020). Además de la evaluación neurológica, también es habitual el uso de técnicas de imagen, como la resonancia magnética, la tomografía computarizada por emisión de fotón único y la tomografía por emisión de positrones, para detectar alteraciones neuroquímicas en el cerebro (Bidesi et al., 2021).

Estas técnicas, suponen un apoyo en la identificación de la EP, pero a pesar de su utilidad, no proporcionan un diagnóstico definitivo, debido a la imposibilidad de diferenciar la EP de otras enfermedades neurodegenerativas que afectan a la sustancia negra (SN), como la demencia con cuerpos de Lewy (Tolosa et al., 2021).

Actualmente, existen estudios que apoyan el uso de fluidos corporales como la saliva, la sangre o el líquido cefalorraquídeo, para la búsqueda de biomarcadores de la EP, entre los que se incluyen la presencia de neurotoxinas endógenas, como las formas oligoméricas de la α -sinucleína, productos del estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias o anticuerpos. Aunque estas alteraciones se consideran potenciales biomarcadores de la EP, los resultados de estos estudios son contradictorios (Ugrumov, 2020). Finalmente, para un diagnóstico definitivo de la EP, se recurre a estudios post-mortem del encéfalo, los cuales muestran una precisión del 81% en el diagnóstico actual de la enfermedad, indicando la necesidad de reevaluar los métodos de diagnóstico clínico con regularidad (Bidesi et al., 2021; Kobylecki, 2020).

1.4. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La principal característica fisiopatológica en la EP es la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la SNpc en el mesencéfalo. La degeneración de estas neuronas, que forman parte del sistema extrapiramidal encargado de regular la función motora en el cuerpo estriado, origina un déficit en la producción de dopamina. Esta deficiencia, a su vez, desencadena una disfunción del sistema de los ganglios basales, dando lugar a los trastornos motores (Luo y Huang, 2016).

1.4.1. Aspectos generales de la dopamina en el contexto de la enfermedad de Parkinson

La dopamina es una feniletilamina que actúa como neurotransmisor en el SNC. La dopamina forma parte de un grupo de hormonas denominadas catecolaminas, cuya síntesis se origina a partir del aminoácido tiroxina en el citosol en dos pasos.

La primera reacción, es la oxidación catalizada por la tiroxina hidroxilasa (TH) de la tiroxina a 1-dihidroxifenilalanina (L-DOPA o levodopa) (Figura 1). Después, la segunda reacción consiste en la descarboxilación de la L-DOPA, catalizada por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), produciendo CO₂ y dopamina (Segura-Aguilar et al., 2014).

La síntesis de dopamina es un proceso altamente regulado, ya que en condiciones de exceso de dopamina y pH normal en el citosol (pH 7.4), esta se puede autooxidar formando dopamina-quinona o desaminarse por acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO), produciendo el 3,4-hidroxifenilacetaldehído (DOPAL), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y un grupo amonio (Masato et al., 2019). El DOPAL generado como resultado de la catálisis de la dopamina puede tener efectos perjudiciales para las neuronas dopaminérgicas, ya que es considerado una neurotoxina endógena (Masato et al., 2019). Además, la producción de H₂O₂ como subproducto de la deshidrogenación del DOPAL, contribuye al estrés oxidativo en estas neuronas. El estrés oxidativo es un fenómeno en el cual se acumulan cantidades dañinas de especies reactivas del oxígeno en las células, lo que puede llevar a la disfunción celular y contribuir a la patología de enfermedades como la EP.

Posteriormente, el DOPAL es metabolizado por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), un metabolito más neutro para la célula (Chakrabarti y Bisaglia, 2023). Además de la regulación enzimática, para evitar la acumulación de dopamina en la neurona, esta se transporta rápidamente tras su síntesis por la acción del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) y se almacena en vesículas sinápticas a un pH bajo (2.0-2.4) y en ausencia de MAO (Chakrabarti y Bisaglia, 2023; Segura-Aguilar et al., 2014).

En pacientes con EP, se han descrito alteraciones en estos sistemas de regulación, describiéndose niveles superiores de DOPAL en los pacientes con respecto a individuos sanos, lo que se ha asociado también a una menor actividad de VMAT-2 (Goldstein et al., 2011). Esto sugiere que el deterioro en el almacenamiento y liberación de la dopamina puede contribuir a la lesión dopaminérgica característica de la EP.

En el estudio llevado a cabo por Burbulla et al. (2017) en un modelo celular de la EP con neuronas derivadas de pacientes, identificaron que un elevado estrés oxidativo mitocondrial, originado por una posible deficiencia en el transporte lisosomal, producía una acumulación de dopamina y α -sinucleína. A su vez, el tratamiento con antioxidantes mitocondriales mitigó estos efectos, subrayando la relevancia de las intervenciones terapéuticas tempranas en el tratamiento de la EP.

1.4.2. Mecanismo fisiopatológico de la lesión dopaminérgica en el sistema nervioso central

Las neuronas dopaminérgicas en el SNC se localizan principalmente en la SNpc, la sustancia negra pars reticulata (SNpr) y el área ventral tegmental (AVT). Estos núcleos neuronales están anatómicamente y funcionalmente conectados con los ganglios basales, siendo la dopamina el principal neurotransmisor modulador de los ganglios basales (Huot y Parent, 2007). Los ganglios basales son núcleos subcorticales en el mesencéfalo, entre los que se incluyen el cuerpo estriado (que a su vez se compone de los núcleos caudado y putamen), el núcleo subtalámico (NST) y el globo pálido (GP) (externo (GPe) e interno (GPi)) (Blesa et al., 2022). Anatómicamente y funcionalmente, las neuronas dopaminérgicas en el SNC se encuentran vinculadas a los ganglios basales, proyectando conexiones en cuatro vías principales.

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc proyectan al cuerpo estriado, formando la vía nigroestriada, la cual regula el movimiento voluntario (Luo y Huang, 2016). Desde el AVT surgen proyecciones al núcleo accumbens (NAc) en la porción ventral del cuerpo estriado, la corteza prefrontal, la amígdala, el hipocampo y el bulbo olfatorio, formando las vías mesolímbica y mesocortical (Speranza et al., 2021), las cuales regulan el comportamiento emocional y cognitivo. Por último, una cuarta vía denominada vía tuberoinfundibular se origina a raíz de una población de neuronas dopaminérgicas en el NST que proyectan a la glándula pituitaria (Klein et al., 2019).

En la EP, la lesión dopaminérgica en la SNpc conduce a un déficit de dopamina en la vía nigroestriada. En las primeras etapas de la fisiopatología, este déficit provoca una respuesta compensatoria por parte del cuerpo estriado, el NST y el GP, que aumentan la producción y disponibilidad de dopamina, así como la sensibilidad de sus receptores de dopamina. A medida que progresa la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el SNpc, este mecanismo de compensación se vuelve insuficiente y se hiperactivan el GP y el NST, siendo en este momento, en el que se originan los primeros síntomas motores de la EP. El NST intensifica la vía excitatoria glutamatérgica hacia la SNpc para aumentar la producción de dopamina, mientras que el cuerpo estriado refuerza la vía inhibitoria hacia el GP produciendo el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA), favoreciendo la actividad de NST y al mismo tiempo produciendo la inhibición de la vía tálamo-corteza motora (Blesa et al., 2022), contribuyendo a la disfunción motora.

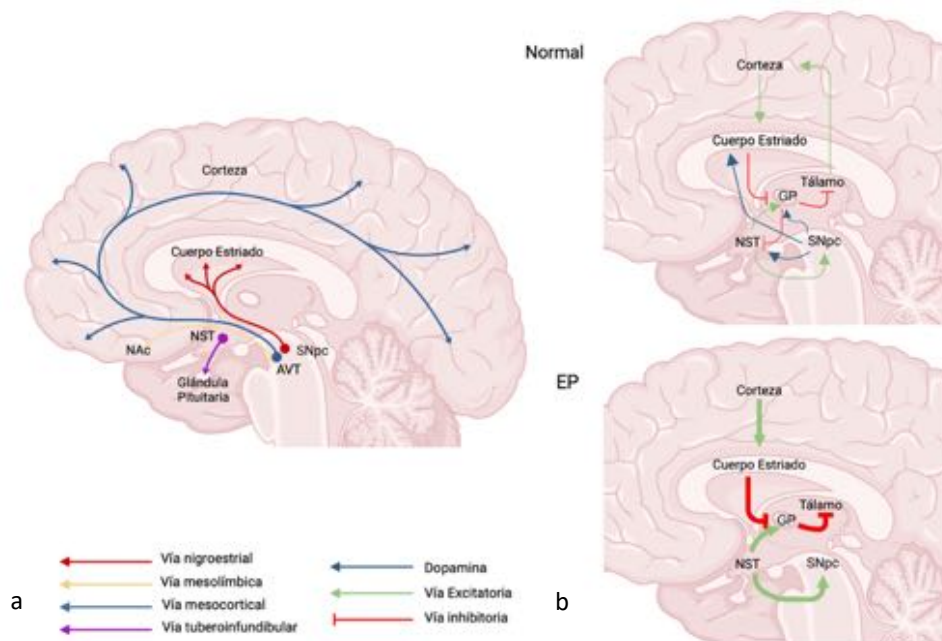


Figura 1. Vías dopaminérgicas en el SNC y efecto de la depleción de dopamina en los ganglios basales. a. Vías dopaminérgicas en el sistema nervioso central. Las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc al cuerpo estriado (caudal y putamen) originan la vía nigroestriada, mientras que las proyecciones del AVT al NAc y a la corteza, forman las vías mesolímbica y mesocortical respectivamente. Las neuronas dopaminérgicas del NST proyectan a la glándula pituitaria, originando la vía tuberoinfundibular. b. Vías de excitación e inhibición en los ganglios basales. En ausencia de dopamina, se activa la vía de inhibición gabaérgica en el cuerpo estriado en el GP, favoreciendo la hiperactividad del NST y la activación de la vía excitatoria glutamatérgica del NST sobre la SNpc, promoviendo la producción de dopamina. A su vez, la activación de la vía gabaérgica en el GB, también inhibe la vía talamocortical, contribuyendo a la disfunción motora en la EP. Figura de elaboración propia creada con BioRender.

1.5. Histopatología de la enfermedad de Parkinson

Actualmente, se desconoce la causa exacta de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Una de las principales características histopatológicas en la EP es la aparición de acúmulos intracelulares denominados cuerpos de Lewy (Surmeier, 2018). Estos acúmulos que se componen principalmente de formas oligoméricas y fibrilares de α -sinucleína, se han vinculado con la disrupción de diversos mecanismos intracelulares como la síntesis de dopamina, la dinámica de microtúbulos, el transporte intracelular, la sinapsis o la disfunción mitocondrial (Antony et al., 2013; Winner et al., 2008).

Sin embargo, se desconoce si esta oligomerización y agregación de la α -sinucleína es un evento patogénico de la enfermedad o un mecanismo de protección ante otras alteraciones (Stott et al., 2020). Entre estas alteraciones, la disfunción mitocondrial ha sido una de las más estudiadas en la patogénesis de la EP.

En muestras post-mortem de SNpc de pacientes, se ha detectado una deficiencia del complejo mitocondrial 1, el cual es vital en la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, esta deficiencia se ha vinculado además con la sobreexposición a neurotoxinas como el MTPT, el paraquat o la rotenona en modelos animales de la EP (Kouli et al., 2018). Esta alteración en el complejo mitocondrial 1, conllevaría la disfunción mitocondrial y un aumento de la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ROS), siendo la principal fuente de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas, provocando su degeneración (Subramaniam y Chesselet, 2013).

Además, existen evidencias de que la acumulación de proteínas como la α -sinucleína en la EP, podría ser debida a alteraciones en los sistemas de degradación de proteínas. Análisis genéticos y en muestras post-mortem humanas de EP, apuntan a una menor actividad catalítica del complejo ubiquitina-proteasoma y del sistema lisosomal de autofagia (Kouli et al., 2018). Las alteraciones en sistemas de transporte y degradación intracelular, genera agregación de proteínas, exceso de toxinas y compuestos que podrían acumularse hasta niveles nocivos para la célula, llevando a la muerte celular (Behl et al., 2022; Sheehan y Yue, 2019).

1.6. Tratamiento en la enfermedad de Parkinson

La EP permanece hoy en día como una enfermedad sin cura. A pesar de ello, en la actualidad, disponemos de una batería de tratamientos paliativos para el amplio espectro sintomatológico, tanto motor como no motor, que presenta esta enfermedad.

1.6.1. Tratamiento farmacológico convencional para la sintomatología motora

La degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNpc genera una depleción de dopamina sobre el cuerpo estriado, lo que conlleva una disrupción en la modulación de los ganglios basales y la aparición de los síntomas motores. Es por ello por lo que la principal diana terapéutica ha sido históricamente restablecer los niveles de dopamina en el SNC.

Levodopa

La dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que su administración directa carece de utilidad como tratamiento. No obstante, uno de los precursores metabólicos de la dopamina, la L-DOPA o levodopa, sí atraviesa esta barrera, siendo metabolizado posteriormente a dopamina en el SNC, demostrando ser un tratamiento efectivo para mitigar los síntomas motores en las primeras etapas de la EP (Church, 2021; Jankovic y Tan, 2020). La eficacia de la levodopa en las etapas iniciales de la sintomatología motora es tan notoria, que una respuesta positiva a este tratamiento suele ser indicativa para confirmar el diagnóstico de la enfermedad (Jankovic y Tan, 2020). Habitualmente, la levodopa se administra complementada con carbidopa, un inhibidor de la AADC. De esta forma, la carbidopa, que tampoco atraviesa la barrera hematoencefálica, previene que la levodopa se metabolice a dopamina en los tejidos periféricos (ver Figura 1) (Church, 2021).

A pesar de la buena respuesta inicial al uso de la levodopa, tras un periodo de cuatro años, el efecto se mitiga, volviendo a aparecer complicaciones motoras (Dong et al., 2016). Además, existen una serie de efectos secundarios producto del tratamiento con levodopa que incluyen náuseas, vómitos, hipotensión, confusión, alucinaciones e incluso disquinesia (movimiento anormal y/o involuntario) (Jankovic y Tan, 2020), por lo que el tratamiento exclusivo con este fármaco resulta insuficiente.

Otros fármacos

Además de la levodopa, existen diversos fármacos para el tratamiento paliativo de la sintomatología motora. Entre los que se incluyen inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (MAO), inhibidores de la catecol-O-metil transferasa (COMT), fármacos agonistas de la dopamina o fármacos anticolinérgicos (Tabla 2).

La inhibición de la enzima MAO, evita la degradación de dopamina endógena y la síntesis de DOPAL. La administración de este tipo de fármacos (selegilina, rasagilina o safinamida) junto con la levodopa reduce el efecto de la disquinesia y las complicaciones motoras en estadios más avanzados de la enfermedad (Jankovic y Tan, 2020).

La COMT es una enzima que metaboliza la levodopa a 3-O-metildopa inactivando su función. Es por ello por lo que junto con el tratamiento dual de levodopa y carbidopa, se suelen administrar fármacos inhibidores de la COMT (opicapona, entacapona o tolcapona). El efecto terapéutico principal de estos fármacos es una prolongación en la duración de la efectividad del tratamiento, teniendo un resultado similar a los inhibidores de la enzima MAO (Church, 2021).

Además del tratamiento de levodopa junto con otros fármacos, también ha surgido un tipo de monoterapia con fármacos agonistas de la dopamina (apomorfina, pramipexol, ropinirol, rotigotina) que se prescribe en estadios iniciales de la enfermedad. Estos fármacos estimulan los receptores de dopamina en las células facilitando la captación del neurotransmisor, mitigando la sintomatología motora inicial. Sin embargo, los agonistas de la dopamina también producen diversos efectos secundarios, como alucinaciones, hipotensión, náuseas, vómitos, insomnio, cambios comportamentales, hipersexualidad, psicosis, depresión o comportamientos adictivos (Alonso Cánovas et al., 2014), por lo que en los últimos años su uso se ha restringido a las primeras etapas de la patología de la EP. A menudo también se administran en conjunto con otros fármacos como la amantadina (inicialmente un antiviral), el cual reduce los síntomas secundarios originados por los agonistas de la dopamina (Dong et al., 2016). Otros fármacos utilizados convencionalmente son los anticolinérgicos como el trihexifenidilo o la benztropina, los cuales inhiben la acción excitatoria del neurotransmisor acetilcolina en el estriado, mitigando la sintomatología motora.

1.6.2. Tratamiento farmacológico para la sintomatología no motora

La variabilidad de síntomas no motores en la EP generalmente implica el uso de un amplio espectro de fármacos. La sintomatología neuropsiquiátrica suele ser habitual en la mayoría de los pacientes con EP, los antidepresivos y ansiolíticos más utilizados para paliar esta sintomatología suelen incluir inhibidores de la recaptación de serotonina (ISRS) (fluoxetina, sertralina), benzodiacepinas (diazepam, lorazepam, clonazepam, alprazolam) o antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina, nortriptilina).

Otros síntomas no motores incluyen alteraciones gastrointestinales como el estreñimiento, náuseas, vómitos o la sialorrea, para lo que se recomienda el uso de medicamentos como la atropina, la lubiprostona, el polietilenglicol o el ondansetrón (Church, 2021).

En estadios más avanzados de la patología, es habitual que los pacientes presenten una sintomatología más severa como la demencia o la psicosis, en estos casos, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (donepezilo, galantamina, rivastigmina) o los antipsicóticos atípicos (quetiapina, clozapina, pimavanserina), suelen ser los fármacos de elección.

1.6.3. Tratamiento quirúrgico para la enfermedad de Parkinson

Estimulación profunda del cerebro

En los estadios iniciales de la EP, el tratamiento farmacológico resulta efectivo para paliar los síntomas de la enfermedad, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, con la progresión crónica de la enfermedad, el tratamiento farmacológico resulta insuficiente, ya sea por los límites de su efectividad o por los efectos secundarios que conlleva.

En los últimos años, se han desarrollado alternativas quirúrgicas para pacientes cuya sintomatología no es posible controlar mediante tratamiento farmacológico. Entre estas alternativas, destaca la estimulación profunda del cerebro (EPC). La EPC consiste en la implantación de electrodos conectados a un neuroestimulador en núcleos neuronales de los ganglios basales, normalmente en el

GPI o en el NST (ver punto 1.4.2.). Estos núcleos suelen presentar una actividad neuronal por encima de lo normal (13-30 Hz) en la EP, indicando una sobreexcitación sobre la vía motora debida a la depleción de dopamina, lo que origina los síntomas motores como la bradiquinesia, la disquinesia o el tremor. Los electrodos estimulan a una alta frecuencia (<100 Hz) estos núcleos, provocando una lesión localizada en las zonas hiperactivas, que se traduce en una mejora de la sintomatología motora, especialmente sobre la rigidez y el tremor (Sharma et al., 2020).

A pesar de que la EPC se considera uno de los avances más significativos en el tratamiento de la EP tras la levodopa, por su elevada efectividad (Sharma et al., 2020), se trata de una técnica altamente invasiva, con un alto riesgo y efectos secundarios consecuencia de la lesión neuronal causada por los electrodos. Entre los efectos secundarios destacan confusión, depresión, psicosis, delirios, hemorragia, pérdida de movimiento, inestabilidad emocional y pérdida de visión o del equilibrio (Wagle y Okun, 2014).

Otras técnicas quirúrgicas

Desde el descubrimiento de la EPC, se han introducido otro tipo de técnicas quirúrgicas basadas en la lesión o destrucción de zonas del mesencéfalo afectadas por la patología de la EP. En estas técnicas se incluyen la lesión por radiofrecuencia, radiocirugía estereotáxica, ablación térmica con ultrasonidos de alta densidad guiada por resonancia magnética o la terapia térmica intersticial con láser (Lee et al., 2018; Wagle y Okun, 2014). Aunque estas técnicas son menos invasivas que la EPC, la efectividad del tratamiento es más limitada, por lo que la decisión del tipo de técnica a utilizar se realiza en base a las características individuales de cada paciente (Sharma et al., 2020).

1.6.4. Terapias alternativas para la enfermedad de Parkinson

Terapia génica

La terapia génica es una técnica novedosa que implica la introducción de un gen normal en células de interés a través de un vector que suele ser de tipo viral (principalmente adenovirus o lentivirus) para así corregir alguna anomalía genética o disfunción celular.

En la EP, se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos y en modelos animales para intentar aplicar esta técnica en el tratamiento de la enfermedad (Dong et al., 2016). Las principales vías terapéuticas de la terapia génica en la EP serían la inhibición de la vía motora a través de la síntesis de GABA, el aumento de la síntesis de dopamina y la regeneración de neuronas dopaminérgicas en la SNpc por medio de factores de crecimiento (Buttery y Barker, 2020).

Terapia celular

El principal interés de la terapia celular en la EP es restablecer la densidad de neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Los recientes avances en reprogramación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*), han dado lugar a diversos ensayos clínicos para detener o ralentizar la degeneración neuronal en la EP y otras enfermedades neurodegenerativas (Stoddard-Bennett y Pera, 2019).

Terapias complementarias

Las terapias complementarias engloban un amplio espectro de técnicas que suponen un apoyo al tratamiento farmacológico y/o quirúrgico de la EP. En este grupo de terapias se encuentran actividades como el ejercicio físico, la fisioterapia, la acupuntura, la terapia ocupacional, la hidroterapia o el uso terapéutico de cannabis (Deuel y Seeberger, 2020; Dong et al., 2016; Qureshi et al., 2021).

2. La α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson

El diagnóstico y tratamiento de la EP se realizan principalmente en base a la sintomatología, mientras que la confirmación de la enfermedad se realiza mediante examen histopatológico post-mortem del mesencéfalo de los pacientes (Atik et al., 2016). Además de la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, el principal sello histopatológico de la EP es la acumulación de α -sinucleína en el citoplasma formando los denominados cuerpos de Lewy.

2.1. Estructura de la α -sinucleína

La α -sinucleína es una pequeña proteína insoluble de 140 aminoácidos, codificada por el gen SNCA. Su estructura se encuentra dividida en tres regiones: una región electropositiva N-terminal rica en residuos de lisina, una región central hidrofóbica propensa a plegarse formando láminas- β y un dominio ácido C-terminal muy flexible rico en residuos de prolina (Vidović y Rikalovic, 2022).

La α -sinucleína citoplasmática se encuentra desplegada en su conformación nativa en el citoplasma, sin embargo, al unirse el dominio N-terminal a las regiones ácidas de los fosfolípidos presentes en las membranas, cambia su conformación adquiriendo una estructura secundaria en forma de α -hélice (Tofaris, 2022). Esta interacción con las membranas reduce las formas anómalas que puede adoptar la α -sinucleína como tetrámeros o formas fibrilares producto de la agregación de láminas β , que podrían ser tóxicas para la célula (Dehay et al., 2015), existiendo normalmente un equilibrio dinámico entre la forma nativa monomérica y la forma helicoidal unida a los terminales presinápticos y membranas vesiculares. Las mutaciones en el gen SNCA pueden causar una disrupción de este equilibrio, promoviendo la existencia de formas oligoméricas solubles que se han descrito como especies patogénicas en la EP (Rocha et al., 2018). Además, se ha detectado la presencia de α -sinucleína en el núcleo, el retículo endoplasmático (RE), el complejo de Golgi (CG) y en el sistema endolisosomal (Vidović y Rikalovic, 2022).

2.2. Papel fisiológico de la α -sinucleína

La α -sinucleína es una de las proteínas más abundantes en las neuronas, representando entre un 0.5 y un 1% del contenido proteico total en el mesencéfalo (Tofaris, 2022). Aunque la función fisiológica de la α -sinucleína en condiciones homeostáticas normales no se ha esclarecido por completo, se han descrito múltiples procesos celulares en los que se encuentra presente.

La α -sinucleína helicoidal es muy abundante en los terminales pre-sinápticos donde se une a la proteína SNARE de membrana asociada a vesículas sinápticas (VAMP2) y a fosfolípidos de membrana de las vesículas sinápticas (Sharma y Burré, 2023), actuando como chaperona regulando el transporte vesicular, participando en

la estabilización de filamentos de actina y teniendo un papel en el anclaje y fusión de membranas y en el reciclaje después de la exocitosis (Oliveira da Silva y Liz, 2020).

Experimentos en ratones deficientes para la síntesis de la α -sinucleína han mostrado una depleción en el número de sinapsis excitatorias, así como en el número de vesículas sinápticas (Sharma y Burré, 2023). Este papel en la regulación de la exocitosis no se limita a neuronas, sino que también regularía la vía secretora en otros tipos celulares, como en las células β -pancreáticas, donde la α -sinucleína interacciona con los canales de insulina, inhibiendo su liberación, teniendo una vinculación directa con la regulación de los niveles de glucosa (Geng et al., 2011).

Además de regular el transporte de vesículas sinápticas, la α -sinucleína también tendría un papel en la regulación de la apoptosis celular, inhibiendo la expresión de la proteína quinasa C, la cual activa una cascada apoptótica en las neuronas dopaminérgicas (Emamzadeh, 2016).

En los últimos años se ha descrito que esta proteína también tendría una función indirecta modulando la síntesis de dopamina en las neuronas dopaminérgicas (Butler et al., 2017). La α -sinucleína interactúa con la proteína fosfatasa 2A activándola, esta a su vez, defosforila los residuos de serina en la TH inactivando su función, por lo que se inhibiría la ruta de síntesis de la dopamina (Peng et al., 2005). Una menor expresión o agregación de la α -sinucleína, podría conllevar una mayor síntesis de dopamina y como consecuencia de su metabolismo, un estrés oxidativo dañino para la neurona.

Sin embargo, más de dos décadas de trabajo no han logrado determinar de manera concluyente el papel fisiológico de la α -sinucleína, a pesar de ser una proteína especialmente abundante en neuronas y participar en una amplia variedad de procesos celulares. Investigaciones recientes apuntan que un efecto antagonista de la α -sinucleína sobre las funciones secretoras del RE y del CG, parece influir simultáneamente en la función de los transportadores de dopamina, favoreciendo la acumulación de dopamina intracelular (Oaks y Sidhu, 2013).

2.3. Agregación de la α -sinucleína y formación de cuerpos de Lewy

El principal sello histopatológico de la EP es la agregación de las formas oligoméricas y fibrilares de la α -sinucleína y la consiguiente formación de acúmulos intracitoplasmáticos denominados cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy son inclusiones intracelulares filamentosas de naturaleza eosinófila, caracterizados por observarse en microscopía óptica como un núcleo denso y un halo periférico (Estaun-Panzano et al., 2023) (Figura 2). Estos agregados además de α -sinucleína contienen múltiples componentes del sistema ubiquitina-proteosoma, proteínas vinculadas con la fosforilación, el citoesqueleto, el ciclo celular o proteínas de señalización celular (Oliveira da Silva y Liz, 2020; Wakabayashi et al., 2007).

Estos agregados, también se encuentran presentes en otras enfermedades neurodegenerativas, originando el término de sinucleopatías para denominar al conjunto de enfermedades que presentan esta histopatología. En este grupo, se encuentran la demencia con cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica y la EP.

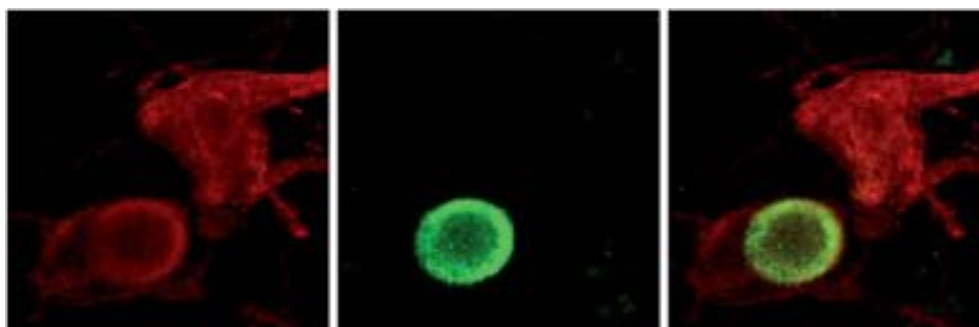


Figura 2. Cuerpos de Lewy en neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Doble inmunofluorescencia de la inmunodetección de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH)(rojo) y la α -sinucleína (verde). El inmunomarcaje de la TH permite detectar las neuronas dopaminérgicas en la SNpc, en las cuales se pueden identificar cuerpos de Lewy (verde) por su morfología intracitoplasmática esférica con un halo periférico. Imagen obtenida de Lanciego et al., 2012.

La α -sinucleína, en condiciones de pH fisiológico, presenta una estructura nativa monomérica en el citoplasma. En estudios in vitro en la EP, en las primeras etapas de la agregación de la α -sinucleína, esta se pliega formando una estructura globular intermediaria, considerada clave en el proceso de fibrilación en láminas β (Ghosh et al., 2017). Estos intermediarios son las denominadas formas oligoméricas de la α -sinucleína, las cuales son de naturaleza hidrofóbica en la superficie, e

interactúan entre ellos para captar más formas solubles de la proteína y conformar las formas fibrilares de la α -sinucleína amiloides similares a las que se encuentran en los cuerpos de Lewy (Estaun-Panzano et al., 2023).

La α -sinucleína monomérica nativa carece de naturaleza hidrofóbica, por lo que se teoriza que las mutaciones relativas al gen SNCA, como la A30P o la A53T, alteran las propiedades conformacionales de la proteína, favoreciendo la fibrilación (Ghosh et al., 2017). Otros eventos que pueden producir la fibrilación pueden ser la acidificación del pH intracelular, la presencia de factores microambientales (iones metálicos, poliaminas, proteoglicanos, ácidos nucleicos, ácidos grasos), las modificaciones postraduccionales de la α -sinucleína, o la interacción con otras proteínas (Heras-Garvin y Stefanova, 2020). Por ejemplo, las mutaciones en el gen GBA1 están asociadas a una mayor probabilidad de padecer la EP esporádica (Rocha et al., 2018). Los individuos con esta mutación presentan una depleción en los niveles de glucocerebrosidasa (GBA), una enzima lisosomal vinculada a la degradación de lípidos por vía lisosomal (Rocha et al., 2018). En este contexto, el sustrato principal de la GBA, la glucosilceramida, se acumula en el citosol e interactúa con la α -sinucleína, cambiando su conformación y adoptando las formas oligoméricas y fibrilares tóxicas.

Para dilucidar la toxicidad de las diferentes formas conformacionales de la α -sinucleína, en el estudio llevado a cabo por Winner et al. (2011) realizaron un modelo experimental animal de rata en el que administraron mediante microinyección unilateral en la SN, formas oligoméricas y fibrilares de la α -sinucleína. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que las formas oligoméricas prefibrilares de la α -sinucleína, inducían una mayor neurodegeneración que las formas fibrilares, debido a su capacidad para interactuar y alterar membranas celulares, provocar estrés celular y aumentar el flujo de calcio intracelular, lo que las hace especialmente dañinas para las neuronas dopaminérgicas.

Son múltiples las interacciones que la α -sinucleína realiza con otras moléculas (Bernal-Conde et al., 2020), por lo que actualmente elucidar las causas por las que se produce la fibrilación y agregación de la α -sinucleína y su relación con la patología de la EP supone un desafío, también debido a la naturaleza transitoria de su estructura (Heras-Garvin y Stefanova, 2020).

2.4. Citopatología de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson

En estudios en ratones deficientes para la síntesis de α -sinucleína, a pesar de que mostraron un déficit de actividad en la vía nigroestriatal, no se observaron diferencias significativas en la citoarquitectura de las neuronas ni de los terminales sinápticos (Mehra et al., 2019), indicando que, en la EP, la citotoxicidad producida por la α -sinucleína, podría ser debida a la alteración en su función y/o estructura, y no a la pérdida de esta. Aunque el papel de la α -sinucleína en la patología de la EP es controvertido, estudios recientes apuntan que las formas pre-fibrilares de la α -sinucleína podrían ser citotóxicas en las neuronas dopaminérgicas (Delenclos et al., 2019; Mehra et al., 2019).

En estudios con membranas artificiales, se ha observado que la α -sinucleína oligomérica penetra en la doble capa lipídica de las membranas, interactuando con los lípidos y facilitando el flujo de moléculas hidrofílicas, permeabilizando así la doble capa lipídica, aumentando los niveles de calcio y desregulando la transmisión sináptica (Villar-Piqué et al., 2016). Además, se ha descrito que la presencia de α -sinucleína oligomérica extracelular provoca la perforación de la membrana plasmática de neuronas hipocámpales en cultivo primario (Pacheco et al., 2015).

2.4.1. Déficit en la actividad mitocondrial

La α -sinucleína en conformación oligomérica induce la oxidación de la ATP sintasa y la peroxidación lipídica mitocondrial en el complejo I mitocondrial. Estos cambios en el complejo I alteran el potencial de membrana, inhibiendo la cadena transportadora de electrones, rompiendo la homeostasis del calcio y promoviendo la liberación del citocromo C, teniendo como consecuencia la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Du et al., 2020; Rocha et al., 2018). Además de producir alteraciones en la actividad del complejo I mitocondrial, estos oligómeros también inhiben el transporte mitocondrial en el axón de las neuronas dopaminérgicas, produciendo cambios subcelulares en proteínas reguladoras del transporte intracelular, induciendo así una pérdida de energía en estas células (Du et al., 2020).

2.4.2. Estrés en el retículo endoplasmático

El RE está involucrado en la síntesis, modificación y transporte de proteínas en la célula. Cuando esta actividad se satura, se produce un estrés en el RE. En la EP se han identificado diversos marcadores de estrés del RE en neuronas dopaminérgicas y en células gliales.

La colocalización de estos marcadores con la α -sinucleína indica que esta citopatología podría ser una respuesta en estadios tempranos de la EP y clave en el desarrollo de la sinucleopatías y una posible respuesta en estadios tempranos de la EP (Du et al., 2020). Además, en estudios en cerebros post-mortem de pacientes y en modelos animales de la EP se han descrito acumulaciones de α -sinucleína oligomérica en el RE, sugiriendo que estas formas de la α -sinucleína pueden estar relacionadas con la disfunción del RE. Finalmente, se ha observado que la inhibición farmacológica del estrés en el RE retrasa la aparición de la sintomatología y la reduce la acumulación de las formas oligoméricas de la α -sinucleína en la EP (Colla, Coune, et al., 2012; Colla, Jensen, et al., 2012; Villar-Piqué et al., 2016).

2.4.3. Alteraciones en el transporte intracelular

En modelos celulares de la EP se ha descrito que la α -sinucleína altera el tráfico entre el RE y el CG. En muestras post-mortem de humano y en modelos celulares con iPSCs, se ha observado la disrupción del transporte intracelular mediada por la asociación de la α -sinucleína a proteínas estructurales del CG como la GM130, o la inhibición del transporte intra RE-AG (Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021; Wong y Krainc, 2017). Esta alteración en el transporte RE-AG, puede participar en un bloqueo del tráfico de proteínas transmembrana implicadas en la autofagia, inhibiendo también la síntesis de fagosomas, impidiendo así la degradación de la α -sinucleína acumulada (Wong y Krainc, 2017).

La sobreexpresión de α -sinucleína también se ha vinculado con la fragmentación del CG en modelos celulares de la EP, planteándose la hipótesis de que esta fragmentación podría ser un medio de propagación de una señal de estrés mediada por la α -sinucleína. Estas alteraciones en el tráfico vesicular no solo interfieren con el transporte de proteínas esenciales, sino que también podrían facilitar la propagación intercelular de formas citopatológicas de la α -sinucleína como

oligómeros o formas fibrilares, que son capaces de inducir disfunción y muerte neuronal en las regiones cerebrales afectadas. Este mecanismo resalta la importancia del tráfico RE-CG en la fisiopatología de la EP y sugiere posibles dianas terapéuticas para mitigar estos efectos. (Furlong et al., 2020; Wang y Hay, 2015).

2.4.4. Estrés oxidativo por neuroinflamación

A diferencia de otros órganos, el cerebro es especialmente sensible al estrés oxidativo debido a la alta presencia de ácidos grasos poliinsaturados y a su baja capacidad antioxidante (Rocha et al., 2018). Otra vía de estrés oxidativo en la EP relacionada con la formación de estructuras oligoméricas de la α -sinucleína, es la activación de la neuroinflamación (Wang et al., 2016).

En modelos animales que sobreexpresan α -sinucleína con la mutación A53T, esta proteína es reconocida por la microglía como un factor exógeno en la matriz extracelular, lo que desencadena la activación de vías de señalización proinflamatorias como las mediadas por MAPK y NF- κ B. Esto no solo lleva a la producción de ROS sino también a la liberación de citocinas inflamatorias que exacerban la neurodegeneración, especialmente en las neuronas dopaminérgicas de la SN (Hoenen et al., 2016). Además, la acumulación de ROS resultante de estos procesos contribuye a un ciclo vicioso: el daño oxidativo promueve la formación y propagación de más oligómeros de α -sinucleína, perpetuando así el estrés celular y la inflamación neuronal. Esta dinámica subraya la importancia de estrategias terapéuticas dirigidas tanto a reducir el estrés oxidativo, como a mitigar la inflamación mediada por la oligomerización de la α -sinucleína en la EP (Figura 3) (Hoenen et al., 2016; Rocha et al., 2018) (Figura 3).

2.5. Agregación de la α -sinucleína fuera del sistema nervioso central

La agregación de la α -sinucleína y la formación de los cuerpos de Lewy no es una alteración exclusiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. En el artículo publicado por Braak et al. (2003), basándose en la examinación de cerebros post-mortem en distintas etapas de la patología de la EP, describieron una teoría sobre la distribución de la α -sinucleína en distintas áreas del sistema nervioso durante seis etapas. En la primera etapa, el bulbo olfatorio y el núcleo dorsal del nervio vago serían las primeras zonas del SNC afectadas por la patología de la α -sinucleína. En las

siguientes etapas la patología se distribuiría neurona a neurona hacia otros núcleos neuronales como el núcleo caudado, la SN y posteriormente la corteza cerebral.

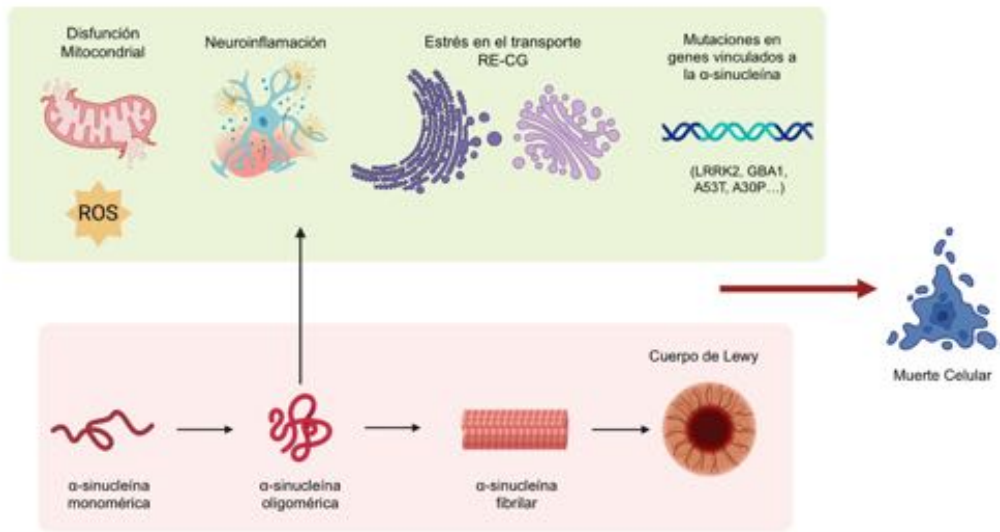


Figura 3. Citopatología de la oligomerización de la α -sinucleína. La α -sinucleína en condiciones de homeostasis celular, se encuentra de forma monomérica desplegada en el citosol. En situaciones de estrés celular (disfunción mitocondrial, neuroinflamación, interrupción del tráfico intracelular RE-CG...) o debido a mutaciones en el gen de la α -sinucleína u otros genes vinculados, se altera la estructura de la proteína, favoreciendo su oligomerización. Estas formas oligoméricas, a su vez, son citotóxicas para la célula, con tendencia a agregarse en formas fibrilares y finalmente en cuerpos de Lewy, siendo un factor clave en la muerte celular en el desarrollo de la EP. Figura de elaboración propia, creada con BioRender.

En este contexto, se han realizado numerosos estudios centrados en la transmisión de la patología de la α -sinucleína a otras localizaciones del sistema nervioso, surgiendo la hipótesis de que esta patología podría transmitirse del SNC a otras zonas del sistema nervioso periférico (SNP) a través del nervio vago, similar a un prion. En este contexto, la α -sinucleína oligomérica o alterada, induciría el cambio de conformación de otras proteínas monoméricas a esa misma estructura, provocando así su propia replicación y la dispersión de las formas patogénicas a otras células (Bernal-Conde et al., 2020).

Estudios, como el llevado a cabo por Uchiyama et al. (2013) en un modelo celular, observaron que, tras la administración de proteínas priónicas, estas se acumulaban de manera anómala en el CG y en los endosomas, particularmente en endosomas de reciclaje marcados por el receptor de transferrina, comprometiendo la función normal de estos orgánulos.

Esta interrupción contribuye a la disfunción neuronal y a la eventual muerte celular al disminuir la funcionalidad de proteínas clave y generar acumulaciones aberrantes intracelulares que exacerban el daño celular.

El primer indicio de esta característica en la α -sinucleína, se evidenció tras observar cuerpos de Lewy en células mesencefálicas trasplantadas en pacientes con EP varios años después del trasplante (Jan et al., 2021). Actualmente, se han descrito cuerpos de Lewy en tejidos nerviosos periféricos, como en el sistema nervioso entérico (SNE), en la piel, en las paredes del tejido cardíaco o en la saliva (Zheng et al., 2021), por lo que esta teoría podría explicar parte de la sintomatología previa a la aparición de la sintomatología motora, como los síntomas gastrointestinales o la anosmia.

Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios en modelos celulares y animales que han demostrado que la α -sinucleína oligomérica extracelular puede comportarse como un prion, atravesar la membrana plasmática y provocar la oligomerización de la α -sinucleína monomérica intracelular en neuronas aparentemente sanas (Du et al., 2020). Esta característica priónica de propagación ha generado interés en estrategias terapéuticas que bloqueen este proceso. Sin embargo, actualmente se desconocen los mecanismos moleculares por los que la α -sinucleína se secreta al medio extracelular, interacciona con proteínas de membrana de otras neuronas e induce el cambio conformacional en la α -sinucleína intracelular (Jan et al., 2021).

3. El colon en la enfermedad de Parkinson

El tracto gastrointestinal (GI) difiere del resto de órganos periféricos en que además de recibir la inervación extrínseca proveniente del SNC, posee un extenso sistema nervioso intrínseco propio, el sistema nervioso entérico (SNE), que controla las funciones del tracto GI en gran medida de manera autónoma, formando parte del sistema nervioso autónomo (SNA). La inervación intrínseca está formada por los plexos nerviosos de Auerbach y Meissner, localizados en entre las paredes del tracto GI, los cuales son responsables de la coordinación de movimientos peristálticos, la secreción de enzimas digestivas o el flujo sanguíneo local, mientras que la inervación extrínseca, proviene del SNC y del SNP, proporcionando inervación simpática y parasimpática para regular las funciones de motilidad y secreción intestinal, y la contracción de los esfínteres (Furness, 2012; Furness et al., 2014).

En el colon, la innervación simpática tiene su origen en las neuronas preganglionares de los nervios espinales de la región torácica y lumbar (T10-L2). Los axones de las neuronas preganglionares suelen ser cortos, y hacen sinapsis con neuronas posganglionares en los ganglios prevertebrales (celíaco, mesentérico superior e inferior e hipogástrico), las cuales inervan el tejido efector (Figura 4). La innervación parasimpática del colon procede del nervio vago, el cual contiene el 75% del total de las fibras parasimpáticas, y de los axones de las neuronas preganglionares de la región sacra (S2-S4) de la médula espinal, los nervios espláncnicos pélvicos. A diferencia de la innervación simpática, los axones de las neuronas preganglionares del sistema parasimpático suelen ser largos, y hacen sinapsis con neuronas posganglionares en el tejido efector, neuronas que forman el SNE (Felten et al., 2016; McCorry, 2007) (Figura 4).

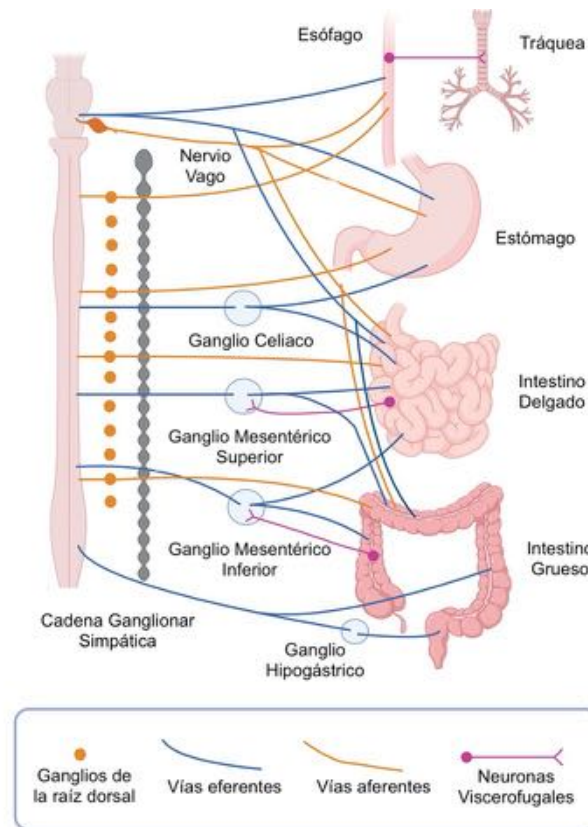


Figura 4. Representación gráfica de la innervación extrínseca del colon. La innervación eferente consta de conexiones del sistema autónomo simpático y parasimpático. Las vías simpáticas que inervan el colon se originan en las neuronas preganglionares de la región torácica (T10-T12) y lumbar (L1, L2) de la médula. Mientras que las conexiones parasimpáticas son proporcionadas por el nervio vago hasta la porción proximal del colon, y los nervios espláncnicos pélvicos de la región sacra para la porción distal. Las neuronas aferentes primarias transportan señales desde el tracto GI hasta el SNC. Las neuronas aferentes vagales tienen sus cuerpos celulares en los ganglios nodosos, mientras que los nervios aferentes espinales tienen sus cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal. Las neuronas entéricas viscero-fugales intrínsecas del SNE, proporcionan información sensorial desde el intestino delgado y grueso hacia los ganglios simpáticos y desde el esófago hacia la tráquea. Figura obtenida y modificada de Sharkey y Mawe, 2023.

3.1. Inervación intrínseca del colon: el sistema nervioso entérico

3.1.1. Distribución histológica del sistema nervioso entérico

En el tracto GI de vertebrados, el SNE se caracteriza por la presencia de neuronas y células gliales organizadas formando ganglios que a su vez conforman plexos nerviosos y vías neuronales interconectadas. Estos plexos nerviosos forman la inervación intrínseca del SNE y se pueden diferenciar dos tipos dentro de la pared del tracto GI. El plexo mientérico o plexo de Auerbach situado entre las capas musculares longitudinal y circular, y el plexo submucoso o plexo de Meissner, en el tejido conectivo de la submucosa. A diferencia de lo que sucede en pequeños mamíferos (ratón, rata, cobaya), en los que suele encontrarse en disposición de monocapa en la zona interna de la submucosa, en el ser humano se dispone formando dos capas, una en la parte externa, cerca de la capa muscular de la mucosa y otra en la cara interna de la submucosa (Sharkey y Mawe, 2023) (Figura 5).

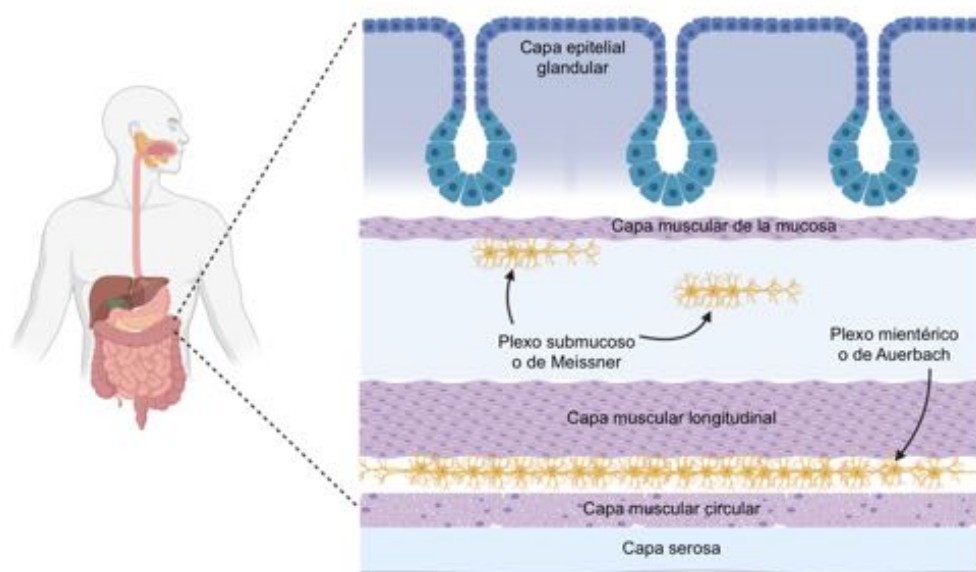


Figura 5. Representación gráfica de la disposición del SNE en el ser humano. El plexo submucoso consiste en un conjunto de pequeños ganglios localizados en la capa submucosa del tracto GI, mientras que el plexo mientérico se encuentra situado entre las capas musculares longitudinal y circular de la pared del tracto GI. Imagen de elaboración propia, creada con BioRender.

Aunque ambos plexos del SNE se encuentran interconectados, el plexo mientérico regula principalmente la movilidad intestinal, mientras que el plexo submucoso regula la secreción mucosa y el control vascular.

En el ser humano, el SNE se encuentra presente en todo el tracto GI, (Sharkey y Mawe, 2023), la mayor densidad de ganglios mientéricos se ha descrito en el píloro, mientras que donde menos predomina es en el esfínter anal. Los ganglios submucosos son más escasos, especialmente en el esófago y en el estómago (Wattchow et al., 2022). En el colon, estos valores son similares, existiendo una mayor densidad neuronal en los plexos mientéricos con respecto a los submucosos, tanto en el colon ascendente, como en el transverso y el descendente (Michel et al., 2022).

3.1.2. Tipos neuronales en el sistema nervioso entérico

El SNE humano, está compuesta por más de 400 millones de neuronas a lo largo del tracto GI (Furness, 2012; Schneider et al., 2018). La clasificación de estas neuronas se puede realizar en base a varios criterios o aproximaciones: morfológicos (tamaño, terminaciones axónicas...), funcionales, según propiedades electrofisiológicas, marcadores bioquímicos (según el tipo de neurotransmisor) o según análisis genéticos.

Clasificación morfológica

Históricamente se han descrito morfológicamente las neuronas del SNE basándose en la disposición del soma y la ramificación de sus terminaciones. Bajo esta clasificación, en humanos y roedores, se distinguen dos tipos de neuronas, las neuronas de Dogiel de tipo I y las neuronas de Dogiel tipo II (Natale et al., 2021). Las neuronas de Dogiel tipo I suelen ser aplanadas, con dendritas cortas y con un único axón (Wattchow et al., 2022), en esta tipología se incluyen las neuronas motoras, que a su vez se pueden dividir en neuronas nitrérgicas inhibitorias y neuronas colinérgicas excitatorias, de las cuales, las neuronas nitrérgicas, son neuronas inmunorreactivas para la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y sintetizan óxido nítrico como principal neurotransmisor, mientras que las neuronas colinérgicas expresan acetil transferasa de colina (ChAT) y producen principalmente acetilcolina como neurotransmisor (Sharkey y Mawe, 2023). Estas neuronas motoras, son las más abundantes en los plexos mientéricos, representando cada subtipo entre un 5-10% de la población neuronal total (Natale et al., 2021).

Las neuronas de Dogiel tipo II, son neuronas con un soma grande, sin dendritas y varios axones largos. En esta división se encontrarían las neuronas

aferentes intrínsecas primarias, estas neuronas representarían un 10% de la población total en los plexos mientéricos (Brehmer, 2021). Esta clasificación morfológica, se ha correlacionado en parte con el papel funcional de las neuronas del SNE.

Además, recientemente se ha descrito en el SNE un tercer subtipo de neuronas (Dogiel tipo III). Este grupo englobaría neuronas presentes en todo el tracto GI, que constan de una alta densidad dendrítica que termina en el ganglio de origen. Actualmente, la similitud morfológica entre neuronas del SNE y del SNC está en entredicho, puesto que los procesos dendríticos en el SNE difieren con los clásicos descritos en el SNC (Sharkey y Mawe, 2023). Además, las neuronas del SNC constan de mecanismos de protección ante la deformación mecánica, mientras que las SNE están expuestas a variaciones en la morfología por procesos de contracción y distensión de la musculatura de la pared GI (Sharkey y Mawe, 2023).

Clasificación funcional

De acuerdo con su funcionalidad, las neuronas del SNE se pueden clasificar en tres tipos: neuronas motoras, interneuronas y neuronas aferentes primarias o sensoriales (Palma y Sanhueza, 2001).

Las neuronas motoras o motoneuronas inervan el tejido muscular liso de las capas longitudinal, circular y muscular de la mucosa. Estas neuronas, pueden ser de carácter excitatorio o inhibitorio, y regulan la motilidad del tejido muscular del tracto GI, la secreción intestinal y la vasodilatación (Furness, 2012; Furness et al., 2014).

Las interneuronas, se encuentran presentes en todo el intestino y conectan los plexos mientérico y submucoso, formando cadenas neuronales interconectadas. Según la direccionalidad de las proyecciones que emiten, se pueden clasificar en interneuronas ascendentes (oral) y descendentes (caudal). Además, las interneuronas parecen tener función de mecanorreceptores, generando reflejos motores en el tracto GI (Furness et al., 2014).

Por último, las neuronas aferentes intrínsecas primarias (IPANs, del inglés *intrinsic primary afferent neurons*), se encuentran en los plexos nerviosos del SNE y son las primeras neuronas en detectar alteraciones físicas en el intestino (Fleming et al., 2020). Las IPANs, están clasificadas morfológicamente como neuronas de Dogiel tipo II, y poseen terminaciones libres con función de detección de cambios

mecánicos, químicos y térmicos en las capas musculares del tracto GI, por lo que también se consideran neuronas sensoriales (Fernández-Tresguerres et al., 2020; Fleming et al., 2020).

Clasificación neuroquímica

A diferencia de las clasificaciones morfológicas y funcionales, a nivel neuroquímico, la población neuronal intrínseca del SNE es muy diversa. Gracias a técnicas de secuenciación de mRNA y de marcaje por inmunohistoquímica, se han descrito más de 50 neurotransmisores presentes en el SNE. Además de la acetilcolina y el óxido nítrico, se han detectado en el SNE neurotransmisores como la serotonina, el GABA, el glutamato, la calcitonina, la somatostatina, la noradrenalina o la dopamina. En el caso de los neurotransmisores catecolaminérgicos (adrenalina, noradrenalina y dopamina), históricamente, estos han sido estudiados morfológicamente mediante el inmunomarcaje positivo de la TH en las neuronas del SNE (Neuhuber y Wörl, 2018).

La existencia de neuronas catecolaminérgicas intrínsecas del SNE, se ha puesto en entredicho, debido a la presencia de las proyecciones posgangliónicas de neuronas catecolaminérgicas TH positivas a las paredes del SNE (Neuhuber y Wörl, 2018). Sin embargo, gracias a estudios de mapeado genético, se ha podido detectar la presencia transcritos codificantes para la TH y el receptor de dopamina, en el tracto GI (estómago, intestino delgado, colon proximal y colon distal) de ratones, verificando así la presencia de neuronas dopaminérgicas intrínsecas en el SNE (Li et al., 2004).

Estas a su vez, podrían ser el único tipo de neuronas catecolaminérgicas intrínseco del SNE, debido a que tienen origen en una línea celular de precursores neuronales distinta del resto de neuronas catecolaminérgicas, como las noradrenérgicas (Li et al., 2004) (Figura 6). Además de las neuronas, en el SNE también existe una importante población de células gliales. En el SNE las células gliales entéricas son similares a los astrocitos del SNC, son más numerosas que las neuronas y suelen localizarse por inmunomarcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o la proteína de unión al calcio S100 (Natale et al., 2021). Tienen una función de protección neuronal, intervienen en la liberación de neurotransmisores y representan un punto de unión entre el sistema nervioso y el sistema inmune en los plexos mientéricos, existiendo una comunicación bidireccional entre las neuronas y las células de la glía en el SNE (Sharkey y Mawe, 2023)

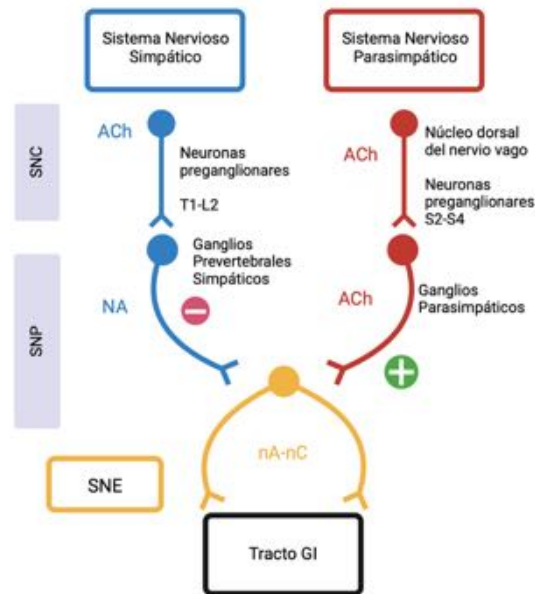


Figura 6. Organización del sistema nervioso autónomo en el SNE. En las fibras simpáticas (azul) que tienen origen en los nervios torácicos y lumbares, los principales neurotransmisores son la acetilcolina (ACh) que es liberada por las neuronas preganglionares, y la noradrenalina (NA), que es una catecolamina secretada por las neuronas posganglionares, actuando directamente sobre el órgano efector, realizando una función inhibitoria sobre el tracto GI (amarillo). En la vía parasimpática (rojo), la ACh realiza un efecto excitatorio de la actividad GI. El SNE contiene neuronas intrínsecas que son de carácter no adrenérgico y no colinérgico (nA-nC), presentando otros neurotransmisores, de los cuales la dopamina sería el único catecolaminérgico. Figura de elaboración propia, creada con BioRender y basada en Natale et al. (2017).

3.2. Inervación extrínseca del colon

3.2.1. Inervación vegetativa parasimpática del colon

Inervación vagal

El nervio vago es el décimo nervio craneal y contiene entre 40.000 y 50.000 terminaciones axónicas que proveen de inervación motora o eferente al tracto GI e inervación sensitiva o aferente desde el tracto GI (Sigurdsson et al., 2021).

Las vías vagales eferentes se originan en el núcleo motor dorsal y en el núcleo ambiguo del nervio vago. Estas vías regularían la capacidad y secreción gástrica, la secreción pancreática y la contracción esofágica, entre otras funciones (Furness et al., 2014) (Figura 4). En el colon, estudios recientes apuntan que la inervación del nervio vago estaría vinculada a la regulación de la motilidad colónica en el colon proximal de

rata (ascendente en humanos), en parte, a través de una conexión monosináptica con las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Xing et al., 2023). En el contexto de la EP, el deterioro de esta vía nigro-vagal por la degeneración de neuronas dopaminérgicas, podría contribuir a la sintomatología del tránsito GI severamente reducido, observada tanto en pacientes como en modelos animales de la enfermedad (Xing et al., 2023).

La extensión que alcanza la innervación de las fibras del nervio vago en el colon ha sido debatida a lo largo de la historia. Tradicionalmente, se ha postulado que el nervio vago provee de innervación eferente parasimpática al tracto GI, desde el esófago hasta la porción proximal del colon (Sigurdsson et al., 2021), dejando la innervación de la porción del colon distal y el recto a los nervios espláncnicos pélvicos.

Las vías vagales aferentes se pueden dividir en terminaciones intragangliónicas laminares (IGLEs), intramusculares y terminaciones nerviosas de la mucosa (Furness et al., 2014). Aunque los circuitos centrales en los que las aferencias vagales y espinales transmiten la información nociceptiva colorrectal aún no se han evaluado comparativamente, gracias a los nuevos estudios con enfoques optogenéticos, electrofisiológicos y de trazado para mapear las conexiones funcionales entre neuronas y tejidos efectores, parecen indicar que desde el colon distal y el recto surgen aferencias del nervio vago, además de los nervios espláncnicos pélvicos (Meerschaert et al., 2020, 2022; Tong et al., 2010). Un estudio reciente llevado a cabo por Wang et al., (2024), en modelo animal de ratón, evidenció la presencia de proyecciones aferentes vagales, mediante el uso de trazadores retrógrados neuronales en la porción colorrectal del SNE.

Es importante destacar que estos hallazgos sirven como un marco anatómico para guiar e interpretar la exploración adicional de los circuitos centrales en los que las vías aferentes vagales y espinales se transmiten para mediar el dolor colorrectal.

Nervios espláncnicos pélvicos

Los nervios espláncnicos pélvicos están formados por fibras nerviosas parasimpáticas preganglionares de la región sacra de la médula espinal (S2-S4) y fibras sensitivas viscerales, proporcionando la innervación parasimpática a la porción distal del colon y recto, de forma similar al nervio vago en la porción proximal (McCorry, 2007) (Figura 4). La innervación de los nervios espláncnicos pélvicos en colon está implicada en la coordinación de reflejos que regulan la motilidad intestinal y en la

detección de cambios en el ambiente luminal, como la presencia de estímulos microbianos o de inflamación (Brierley et al., 2018).

3.2.2. Inervación vegetativa simpática del colon

Vía toracolumbar o esplácnica

La vía toracolumbar o esplácnica, conecta con el tracto gastrointestinal a través de vías eferentes simpáticas y las vías aferentes, los somas de cuyas neuronas están localizados en los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal (Furness et al., 2014). La inervación simpática eferente de la vía toracolumbar se produce a raíz de neuronas preganglionares de los niveles espinales T5-L2, que hacen sinapsis con neuronas posganglionares de los ganglios colaterales prevertebrales (celíaco, mesentérico superior e inferior e hipogástrico) (Figura 4) (Felten et al., 2016). Desde estos ganglios, las neuronas posganglionares posteriormente inervan el tracto GI desde el estómago hasta el recto. La principal función de esta vía es ejercer una función inhibitoria en el tejido muscular y en la actividad secretora (Furness, 2012; Phillips y Powley, 2007; Smith-Edwards et al., 2021). Sin embargo, la actividad simpática de esta vía parece tener distintos efectos en las porciones del colon.

Un estudio llevado a cabo por Smith-Edwards et al. en 2021, mediante el uso de trazadores anatómicos en modelo de ratón, inmunohistoquímica y secuenciación de RNA de colon humano, ha revelado diferencias en la actividad simpática en el colon proximal (ascendente en humano) y el colon distal (descendente en humano), apoyando el concepto de que estas dos regiones tienen funciones y características distintas.

3.3. Marco teórico del sistema nervioso entérico en la enfermedad de Parkinson: Teorías sobre el origen de la propagación de la α -sinucleína. Top-down vs Bottom up

La teoría de la propagación de la α -sinucleína en forma de prion es consistente con el modelo propuesto por Braak et al., (2003) de diseminación de la patología en la EP. De acuerdo con este modelo, se han originado dos teorías sobre el origen y transmisión de la patología de la α -sinucleína.

Top-down o brain first

Según esta teoría el origen de la patología sería en el bulbo olfatorio, con progresión anterógrada hacia la corteza cerebral en el SNC y se propagaría al SNP a través del nervio vago. En este contexto, las primeras etapas de la patogénesis serían presintomáticas, y la sintomatología se desarrollaría en estadios más avanzados en los que las formas citotóxicas de la α -sinucleína afectan las regiones del mesencéfalo (Jan et al., 2021). Esta teoría ha sido apoyada por estudios en modelos animales en los que la inyección de α -sinucleína oligomérica en el mesencéfalo, induce una sobreexpresión de esta proteína en el SNC y alteraciones en el SNE (Leclair-Visonneau et al., 2020).

Bottom-up o body first

Esta teoría también descrita por Braak et al., (2006), postula que las formas citotóxicas de la α -sinucleína podrían originarse en el SNE y propagarse al SNC a través del nervio vago. El hallazgo de cuerpos de Lewy en neuronas dopaminérgicas del SNE, años antes del inicio de la sintomatología motora (Borghammer y Hamani, 2017; Zheng et al., 2021) ha dado lugar a la teoría de que la patología de la EP pueda tener origen en las neuronas del SNE. En un estudio llevado a cabo en 2017 por Liu et al., se observó que los pacientes que han sufrido una vagotomía tienen una menor probabilidad de padecer la EP, siendo la eliminación del nervio vago un factor de protección ante la enfermedad. Otros estudios en modelos animales han demostrado que la inyección de formas oligoméricas o fibrilares de la α -sinucleína en el SNE produce la patología en el SNC, y que la transmisión sería dependiente del nervio vago (Kim et al., 2019; Vargas et al., 2019).

Actualmente, todavía se cuestionan algunas de estas observaciones y las cualidades de la α -sinucleína como prion. Existen estudios post-mortem en los que no se ha observado un patrón de distribución de la patología similar al propuesto por Braak et al. (2003) (Henderson et al., 2019), o en los que no se han descrito cuerpos de Lewy en neuronas dopaminérgicas trasplantadas en pacientes con EP (Heras-Garvin y Stefanova, 2020).

A pesar de que el SNE no requiere del SNC para su funcionalidad, sí se encuentra regulado por el SNC a través de las conexiones simpáticas y parasimpáticas.

Esta comunicación se ha postulado como una vía de transmisión de la patología de la EP desde el SNE al SNC y viceversa (Chalazonitis y Rao, 2018). En pacientes con la EP, se han detectado agregados de α -sinucleína oligomérica en el SNE. Este descubrimiento llevó a Braak y colaboradores (2006) a formular la teoría de que los primeros tejidos afectados por la patología de la EP, podrían ser los tejidos nerviosos más vulnerables a patógenos externos, como el bulbo olfatorio y el SNE, siendo la principal causa de esta patología una neurotoxina o un virus neurotrópico. Esta teoría apunta al núcleo dorsal motor del nervio vago como vía de transmisión de la patología, debido a la conexión que ejerce con los plexos mientérico y submucoso hasta la parte proximal (ascendente) del colon (Lionnet et al., 2018).

Además de las manifestaciones sintomáticas motoras debidas a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el SNC, la EP también se caracteriza por alteraciones en las funciones autónomas, de las cuales el tracto GI se encuentra afectado, como el estreñimiento, hipersalivación, disfagia, disfunción anorectal, y disminución de la movilidad intestinal (Natale et al., 2021). Debido a estas manifestaciones clínicas y la teoría propuesta por Braak y colaboradores (2006), el estudio de la patología de la EP en el SNE se ha intensificado drásticamente en los últimos años. Estudios recientes han evidenciado la degeneración de neuronas dopaminérgicas en el SNE y la presencia de cuerpos de Lewy en el núcleo dorsal del nervio vago, evidenciando la citopatología de la EP presente en el SNE y la posible propagación de formas citotóxicas de la α -sinucleína desde el SNE al SNC, apoyando esta teoría (Lionnet et al., 2018; Schaeffer et al., 2020).

4. Modelos experimentales inducidos por neurotoxinas en la enfermedad de Parkinson

La importancia del tracto GI en el desarrollo de la EP ha llevado al desarrollo de modelos experimentales para estudiar esta patología (Natale et al., 2021). Los modelos experimentales actuales más usados se dividen en dos grupos: modelos experimentales inducidos por neurotoxinas y modelos inducidos por alteraciones genéticas.

Los modelos inducidos por neurotoxinas más comunes serían los que se basan en la administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), MPTP, paraquat o rotenona. Una de las mayores limitaciones de los modelos inducidos por

neurotoxinas, es la ausencia de cuerpos de Lewy (Chia et al., 2020). Sin embargo, estos modelos producen una rápida degeneración de las neuronas nigroestriales que es semejante a la patología de la EP esporádica, siendo muy útiles para los estudios en estadios iniciales de la enfermedad (Taguchi et al., 2020)

Los modelos genéticos se basan en la sobreexpresión transgénica de proteínas relacionadas con la patología de la EP hereditaria, como el gen SNCA (que codifica para la proteína α -sinucleína) o el gen LRRK2, o el uso de modelos para la deficiencia en la expresión de genes como PINK1 o PARK2 entre otros. Estos modelos son útiles para estudiar en detalle fenotipos de la EP familiar, pero no son adecuados para reproducir todas las características de la enfermedad (Chia et al., 2020) y en muchos casos, no producen una lesión dopaminérgica significativa característica de la enfermedad (Sanchez et al., 2014).

4.1. Modelo animal inducido por 6-hidroxidopamina

El primer modelo animal generado para el estudio de la patología de la EP fue elaborado por Ungerstedt (1968), y se basó en la administración unilateral de 6-OHDA en la SNpc de rata. Esta neurotoxina no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que su administración debe realizarse mediante inyección directa unilateral en la SNpc del animal (Simola et al., 2007). La inyección bilateral de la neurotoxina en la SNpc tiene consecuencias drásticas para el animal, produciendo en última instancia la muerte en pocos días (Kostrzewa, 2022), por lo que su administración suele ser unilateral.

La 6-OHDA es un análogo estructural de la dopamina y la noradrenalina y ejerce su función citotóxica en las neuronas catecolaminérgicas. El mecanismo neurotóxico de la 6-OHDA reside en su afinidad con los canales de dopamina y noradrenalina de membrana. Una vez la neurotoxina entra a la célula, la enzima MAO oxida la 6-OHDA generando H_2O_2 , produciendo un estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Simola et al., 2007). Además de producir un estrés oxidativo perjudicial para las neuronas, también afecta a la actividad mitocondrial, produciendo alteraciones en la actividad del complejo mitocondrial I (Salari y Bagheri, 2019; Simola et al., 2007). El efecto de la 6-OHDA depende del lugar y dosis de la inyección, ya que administrada en el estriado provoca una pérdida de las terminaciones axónicas del estriado y posteriormente una degeneración parcial de las

neuronas de la SN (Chia et al., 2020; Penttinen et al., 2016), mientras que administrada en la SN produce una degeneración progresiva de hasta el 60% de las neuronas dopaminérgicas, dando lugar a una patología similar a la observada en la EP (Hernandez-Baltazar et al., 2017; Salari y Bagheri, 2019) (Figura 7). Este modelo se caracteriza por generar en roedores y primates no homínidos, los principales aspectos citotóxicos de la patología de la EP, además de la sintomatología motora y no motora progresiva descrita en el ser humano, también se caracteriza por tener una respuesta positiva al tratamiento con levodopa (Van Den Berge y Ulusoy, 2022). Es por ello por lo que actualmente se considera un modelo válido para el estudio de los mecanismos de citotoxicidad y patogénesis de la EP (Hernandez-Baltazar et al., 2017).

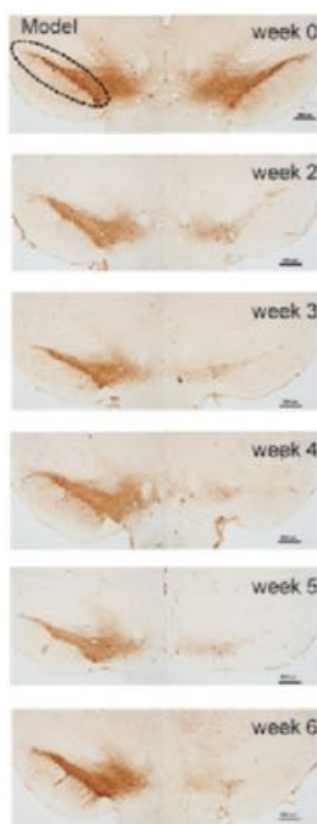


Figura 7. Detección por técnica de inmunohistoquímica de neuronas dopaminérgicas en la SNpc de rata tras la microinyección unilateral de 6-OHDA. En las imágenes se observa una disminución del inmunomarcado de la TH como marcador específico de neuronas dopaminérgicas en el hemisferio lesionado con 6-OHDA (derecha), en comparación con el hemisferio control (izquierda), dependiente del tiempo (week 0-6). Imagen tomada y modificada de Su et al. (2018).

4.2. Otros modelos animales inducidos por neurotoxinas

El descubrimiento de que la exposición a algunos compuestos químicos como el MPTP, la rotetona o el paraquat, suponen un factor de riesgo para padecer la EP, ha dado lugar a la generación de modelos animales basados en la administración de estas neurotoxinas.

4.2.1. 1-metil-4-fenil-6-tetrahidropirimidina

El modelo animal inducido por MPTP es junto con la 6-OHDA, uno de los modelos basados en la administración de neurotoxinas más usados actualmente (Mustapha y Taib, 2021). El MPTP es un análogo de la meperidina y un subproducto de la síntesis de 1-metil-4-fenil-propinoxi-piperidina. Este modelo se realiza preferentemente en ratón, aunque se han descrito estudios en otros roedores, pez zebra, nematodos, primates y en humanos expuestos a la sustancia (Mustapha y Taib, 2021).

El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que se inyecta directamente en el animal vía intravenosa o intraperitoneal. Una vez en el SNC, la enzima MAO secretada por los astrocitos, cataliza el MPTP a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina, un metabolito intermediario, y posteriormente al metabolito citotóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺). El MPP⁺ penetra selectivamente en las neuronas catecolaminérgicas vía transportadores de noradrenalina y dopamina, produciendo un efecto similar a la 6-OHDA (Salari y Bagheri, 2019). Una de las mayores diferencias con la 6-OHDA es que el MPTP al traspasar la barrera hematoencefálica, afecta otras áreas del sistema nervioso, no solo a la SN (Van Den Berge y Ulusoy, 2022). El uso de MPTP también requiere una mayor dosis de neurotoxina en comparación con la 6-OHDA para generar la patología de la EP, teniendo un mayor riesgo de mortalidad en las primeras 24 horas tras el tratamiento (Pingale y Gupta, 2020).

4.2.2. Paraquat, rotenona y otras neurotoxinas

El paraquat o N,N-dimetil-4,4'-bipiridinio es un herbicida que es estructuralmente similar al MPP⁺, por lo que el efecto patológico tras su administración es semejante, ejerciendo especial daño en el ciclo oxidativo mitocondrial. El efecto patológico en la vía nigroestriatal es dependiente de la dosis en ratones, mientras que algunos estudios han revelado la ausencia de degeneración en estas áreas del SNC (Salari y Bagheri, 2019). Además, este modelo presenta otras desventajas como la falta de especificidad en neuronas dopaminérgicas y la alta tasa de mortalidad (Pingale y Gupta, 2020).

La rotenona es un compuesto natural en plantas, que se ha extraído y usado como insecticida. Este compuesto también atraviesa la barrera hematoencefálica, y

produce una degeneración de las neuronas dopaminérgicas, así como agregación de la α -sinucleína y presencia de cuerpos de Lewy tras la inyección intravenosa de la neurotoxina (Salari y Bagheri, 2019). Sin embargo, al igual que el paraquat, esta toxina no es específica de neuronas dopaminérgicas, sino que también se han descrito alteraciones en otras neuronas del SNC, como neuronas serotoninérgicas, colinérgicas y otras catecolaminérgicas (Zeng et al., 2018).

Existen otros compuestos menos comunes para generar modelos animales para el estudio de la EP, por las limitaciones que presentan para reproducir la patología de la enfermedad (baja neurodegeneración, ausencia de cuerpos de Lewy, mayor mortalidad...). Entre ellas se encuentra el manganeso, cuya acumulación en los ganglios basales produce una patología similar a la observada en la EP, teniendo afinidad por los transportadores de dopamina (Pingale y Gupta, 2020). También se han utilizado inyecciones estereotáxicas de lipopolisacáridos e inhibidores del proteasoma, para reproducir la neuroinflamación observada la EP (Van Den Berge y Ulusoy, 2022). Aunque actualmente, los modelos más usados son los basados en las neurotoxinas 6-OHDA y MPTP, por la similitud en los procesos de citotoxicidad (estrés oxidativo, neuroinflamación...), la especificidad por neuronas dopaminérgicas y la reproducción del cuadro sintomatológico de la EP en el estudio de nuevos fármacos (Dovonou et al., 2023; Rentsch et al., 2019; Van Den Berge y Ulusoy, 2022).

5. Organización estructural y funcional de la vía secretora y el complejo de Golgi en neuronas

A pesar de que el mecanismo celular por el que se inicia la neurodegeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la EP sigue sin determinarse, se han propuesto mecanismos hipotéticos de la patogenicidad de la EP en las neuronas dopaminérgicas. Entre ellos se incluyen estrés oxidativo, estrés en el RE, disfunción mitocondrial, citotoxicidad inducida por α -sinucleína, disfunción en el complejo ubiquitina proteasoma, neuroinflamación, disfunción del sistema de autofagia y alteraciones en el tráfico de membrana (Hasegawa et al., 2017).

Recientes avances en el campo, logrados fundamentalmente gracias al desarrollo de modelos celulares y animales de la EP, indican que el tráfico de membrana contribuye enormemente a la patogénesis de esta enfermedad (Rendón et al., 2013), y de otras patologías neurodegenerativas (Hasegawa et al., 2017). Las

neuronas son células altamente polarizadas con una morfología única y compleja. Para mantener la homeostasis celular y controlar la actividad sináptica, las neuronas poseen una maquinaria celular compleja, que permite el tráfico de compuestos a sus correspondientes localizaciones subcelulares.

En la ruta secretora, los neurotransmisores, canales iónicos, complejos de adhesión y otros componentes, son sintetizados y procesados en vesículas de transporte por el RE y en el CG respectivamente, antes de ser transportados a la membrana celular (MacGillavry y Hoogenraad, 2018). En este proceso, las vesículas de transporte alcanzan los compartimentos de unión, con la regulación mediada por proteínas Rab GTPasas, proteínas receptoras del factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE) y por el citoesqueleto de la célula (Hasegawa et al., 2017)(ver apartado 6).

5.1. La vía secretora: Síntesis y plegamiento de proteínas

El RE es el primer orgánulo involucrado en la vía secretora, dónde las proteínas son sintetizadas, transportadas y plegadas, pero también está involucrado en otros procesos como la síntesis lipídica, el metabolismo de carbohidratos o la regulación de la homeostasis del calcio (Merighi y Lossi, 2022). El RE es el orgánulo celular de mayor tamaño, compuesto por una red membranosa de túbulos y láminas interconectados. Este orgánulo está formado por dos subdominios, el primer subdominio, rico en ribosomas, localizado en el área somatodendrítica de las neuronas que se denomina el RE rugoso (RER), y un segundo subdominio, sin ribosomas, localizado en contacto con otros orgánulos, en axones y zonas sinápticas de las neuronas, denominado RE liso (REL) (Yperman y Kuijpers, 2023).

La síntesis de proteínas se inicia con el reclutamiento de ribosomas del citosol hacia la cara citosólica del RE. Los ribosomas en el citosol comienzan a sintetizar los nuevos péptidos a partir del RNAm. Los polipéptidos, poseen en el extremo amino terminal una secuencia señal que va a ser detectada por la partícula de reconocimiento de señal (Wang y Kaufman, 2016). Posteriormente, se crea un complejo de unión entre el ribosoma, el RNAm y la partícula de reconocimiento, que se traslada a la cara citosólica del RE donde la partícula de reconocimiento se une a su receptor específico (Schwarz y Blower, 2016). En este punto de la membrana del RE, se disocia el complejo ribosoma-proteína de reconocimiento, y se produce una unión entre el ribosoma y el traslocón. El traslocón es un complejo proteico, constituido por tres

componentes principales, Sec61 α , Sec61 β y Sec61 γ , que actúa como canal para la traslocación de los polipéptidos al interior del RE (Swanton y Bulleid, 2003). Si la proteína es integral de membrana, poseerá residuos hidrofóbicos o secuencias de terminación del anclaje que harán que el proceso de traslocación se detenga, incorporándose a la membrana lipídica del RE (Schwarz y Blower, 2016).

En el caso de que la proteína sea destinada a la vía secretora, los polipéptidos sintetizados por los ribosomas son transportados al lumen del RE por la interacción del traslocón con el complejo oligosaciltransferasa, dónde comienza el proceso de plegamiento (Wang y Kaufman, 2016). En este proceso intervienen chaperonas (Hsp70 y Hsp90), peptidil propil isomerasas, oxidorreductasas y otros factores de plegamiento que actúan en el ensamblaje de la estructura oligomérica nativa de la proteína (Braakman y Bulleid, 2011). Cuando las proteínas no se pliegan correctamente, estas se acumulan en el RE, activando una respuesta que incrementa la actividad de plegamiento del RE. Si esta alteración persiste, se activa la vía de degradación asociada al RE (ERAD) (*endoplasmic reticulum associated degradation*) y los polipéptidos se trasladan al citosol donde son degradados por el proteasoma 26S (Viotti, 2016). Si las proteínas alcanzan la conformación estructural correcta, se liberan del RE en un transporte mediado por el complejo de proteínas de cubierta vesicular II (COPII).

El COPII se localiza en unas regiones concretas de la membrana del RE, denominadas lugares de salida del RE (ERES) (*endoplasmic reticulum exit sites*), también denominados elementos transicionales o RE transicional, dónde ensamblan las proteínas en vesículas de entre 60-100 nm de diámetro (Viotti, 2016). Estas vesículas posteriormente se liberan al compartimento intermedio entre el RE y el CG (ERGIC) (*endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*), mediado por cuatro proteínas SNARE: syntaxina-5, GS27, BET1, Sec22B (Viotti, 2016).

Compartimento intermedio o ERGIC

El compartimento intermedio entre el RE y el AG o ERGIC es un complejo membranoso originado por la fusión de vesículas COPII, entre el RE y el CG que originalmente se definió por la identificación de una proteína de membrana de 53kDA (ERGIC-53) (Appenzeller-Herzog y Hauri, 2006; Zhang et al., 2023). Este compartimento sirve de estación intermedia entre el RE y el polo más cercano al RE

del CG, el polo cis-Golgi, mediando el transporte bidireccional entre los dos orgánulos (Zhang et al., 2023).

En el transporte RE-CG, se ha teorizado que las proteínas plegadas en vesículas COPII se disocian en el ERGIC, donde continúan hacia el cis-Golgi mediadas por microtúbulos, mientras que los receptores COPII vuelven al RE (Zhang et al., 2023). En este compartimento, también se produce un transporte retrógrado de proteínas recicladas del cis-Golgi hacia el RE mediado por vesículas COPI (Viotti, 2016).

5.2. El complejo de Golgi

El CG es un orgánulo clave en las neuronas, desempeñando funciones fundamentales en el procesamiento, clasificación y transporte de proteínas y lípidos dentro del sistema de endomembranas. En las neuronas, su localización es mayoritariamente perinuclear en el soma, donde su proximidad al núcleo facilita la interacción con el RE en el transporte y modificación de proteínas sintetizadas. Además, en las dendritas, se han identificado pequeñas estructuras del CG, denominadas satélites del Golgi, relacionadas con la regulación de proteínas sinápticas y de la plasticidad neuronal (Climer et al., 2018).

Estructuralmente, el CG se caracteriza por una estructura polarizada, que consta de un conjunto de cisternas membranosas aplanadas, organizadas en pilas. Estas cisternas se agrupan en dominios específicos. La polaridad estructural del CG es esencial para su función de clasificación, asegurando que las proteínas sean modificadas en el orden adecuado antes de ser transportadas a su destino final (Wilson et al., 2011). Estas características hacen del CG un centro regulador de la dinámica celular en las neuronas, con impacto directo en funciones como la sinaptogénesis y la respuesta al estrés celular.

Esta polarización de la estructura del CG reside en una serie de compartimentos o dominios que atraviesan las vesículas de transporte. Estos compartimentos alineados desde el RE se clasifican en: red del cis-Golgi (CGN) (*Cis-Golgi Network*), medial o intra-Golgi y red del trans-Golgi (TGN) (*Trans-Golgi Network*) (Rothman, 1981). Las macromoléculas sintetizadas en el RE son recibidas en el CGN, donde se someten a modificaciones postraduccionales por la acción de

enzimas del CG, entre las que se incluyen glicosilación, sulfatación, palmitoilación, y proteólisis. Posteriormente, se transportan por las distintas cisternas del Golgi en un tráfico mediado por COPI. Cuando las vesículas alcanzan el TGN, se clasifican y conducen al compartimento subcelular correspondiente en vesículas revestidas de clatrina (Payne y Schekman, 1985).

5.2.1. El transporte bidireccional en el complejo de Golgi

Actualmente se han propuesto tres modelos sobre el transporte de proteínas en los compartimentos del CG. En el modelo de la maduración de cisternas, las vesículas de secreción atraviesan en dirección anterógrada desde el CGN al TGN, mientras que las proteínas residentes del CG se transportan en sentido retrógrado en vesículas COPI (Park et al., 2021).

El segundo modelo de transporte, denominado modelo de partición rápida se trata de un modelo selectivo en el que las cisternas del CGN se distribuyen en dos sub-dominios, un primer dominio de procesado, abundante en glicerofosfolípidos y enzimas del CG, y un segundo dominio de secreción rico en esfingolípidos. En este modelo, cada cisterna del CG poseería ambos dominios y la clasificación del material transportado estaría vinculada a la afinidad por glicerolípidos o esfingolípidos (Boncompain y Perez, 2013). De esta forma, las proteínas de la vía secretora se concentran en el dominio de secreción, mientras que las proteínas residentes del CG no entrarían a este dominio, si no que se concentrarían en el dominio de procesado (Park et al., 2021; Patterson et al., 2008).

Finalmente, el tercer modelo propuesto, mediado por túbulos del Golgi, en el que el transporte de vesículas mediado por COPI, ocurre en las cisternas del CGN interconectadas por túbulos, agilizando un transporte bidireccional (Park et al., 2021).

5.2.2. Clasificación y transporte en la red del Trans-Golgi

El TGN es el principal centro de distribución del CG, dónde proteínas y lípidos se clasifican en mensajeros destinados a distintas ubicaciones subcelulares. La estructura y tamaño del TGN varía según el tipo celular, pero en la mayoría de las células se trata de una estructura túbulo reticular localizada en la cara externa del CG que emerge de las dos últimas cisternas del CG y cuya estructura es sometida a

cambios dinámicos dependiendo del nivel de moléculas recibidas y secretadas (Guo et al., 2014; Kienzle y von Blume, 2014). En el TGN las moléculas se clasifican según su destino final que, en función del tipo de celular, puede ser la superficie apical o basolateral de la membrana, endosomas, vesículas de secreción, o bien, otros compartimentos del CG o el RE (Kienzle y von Blume, 2014).

En la ruta de secreción, las vesículas derivadas del TGN se dirigen a la membrana plasmática. Tras la fusión con la membrana, las moléculas solubles se secretan a la matriz extracelular, mientras que en el caso de las proteínas transmembrana se quedan ancladas a la membrana plasmática. Sin embargo, algunas células especializadas como las neuronas almacenan las proteínas o moléculas solubles en vesículas de secreción para liberarlas en respuesta a una regulación externa (Makaraci y Kim, 2018).

Aunque el mecanismo de clasificación molecular en el TGN no se ha elucidado por completo, este reside en el empaquetamiento de las moléculas secretadas en vesículas con microdominios de membrana específicos que no poseen otros tipos de vesículas. En la vía secretora, el TGN recluta clatrina y por la acción de complejos de proteínas adaptadores (APs) (*Adaptor protein complexes*), se deforma la membrana del TGN y se forman las vesículas secretoras (Guo et al., 2014). Estos APs suelen estar compuestos por varias subunidades de distintos tamaños, en células eucariotas se han descrito cinco tipos de APs, de los cuales tres están involucrados en el mecanismo de clasificación del TGN, AP-1, AP-3 y AP-4. Estos complejos tienen a su vez isoformas presentes en distintos tipos celulares, siendo la isoforma AP-3B exclusiva de neuronas y tejido neuroendocrino (Guo et al., 2014).

5.2.3. Proteínas estructurales y de mantenimiento del complejo de Golgi

Mientras que la modificación postraduccional del contenido procesado en el CG es llevada a cabo por enzimas propias del orgánulo (glicosiltransferasas, glicosidasas o quinasas), la estructura y apilamiento de las cisternas reside en la cooperación de proteínas ancladas a las membranas del CG. Estas proteínas a su vez se pueden clasificar en proteínas de ensamblaje y proteínas de la matriz del CG (Petrosyan, 2019).

Proteínas de ensamblaje y apilamiento del complejo de Golgi

En vertebrados existen dos proteínas de ensamblaje y apilamiento del CG (GRASPs) (*Golgi reassembly and stacking proteins*), la GRASP65 localizada en el CGN y la GRASP55 en el intra-Golgi. Estas proteínas se encuentran ancladas a las membranas del CG, uniendo lateralmente las cisternas del CG. Varios estudios han observado que la depleción de GRASP55 y GRASP65, resulta en la desestructuración del apilamiento de las cisternas en el CG (Lowe, 2011; Zhang y Wang, 2020). Además de regular la estructura del CG, las proteínas GRASPs también controlan el tráfico de moléculas en la célula mediante interacción con el extremo C-terminal de proteínas transmembrana de la membrana plasmática (Zhang y Wang, 2020).

Proteínas de la matriz del complejo de Golgi

La matriz del CG es un complejo de numerosas proteínas ancladas a la parte citoplasmática de las membranas del orgánulo y cuya función es aportar al CG integridad estructural y regular el tráfico vesicular (Witkos y Lowe, 2016). El principal componente de la matriz del CG son las golginas. Las golginas son proteínas ancladas a la cara citoplasmática de la membrana del CG por su extremo C-terminal, esta conformación permite a estas proteínas extender su extremo N-terminal en el citoplasma, facilitando la captación de vesículas, otros componentes de membrana o componentes del citoesqueleto (Witkos y Lowe, 2016). Estas golginas además forman complejos con GTPasas como las Rabs GTPasas (Rab1, Rab2, Rab6 o Rab33 entre otras) (Goud et al., 2018; Progida, 2019; Saraste, 2016), en distintas localizaciones del CG, contribuyendo a diferenciación de las membranas del CG, reclutando también proteínas efectoras en estas regiones.

Actualmente, se han descrito más de 11 golginas, de entre las cuales, la GM130 y la giantin son las más estudiadas (Kulkarni-Gosavi et al., 2019; Petrosyan, 2019). En particular, la golgina GM130 participa en la organización estructural y funcional del CG al actuar como un andamio molecular que facilita la coordinación espacial y temporal de múltiples procesos celulares. Esta proteína está anclada a la membrana del cis-Golgi, a través de interacciones con la proteína GRASP65, formando un complejo esencial para el mantenimiento de la estructura del CG y la biogénesis de sus compartimentos (Ahat et al., 2022).

Además de su interacción con las Rab GTPasas, la GM130 regula el tráfico vesicular a través de su capacidad de reclutar proteínas efectoras específicas, lo que contribuye a la diferenciación funcional de las membranas del Golgi (Goud et al., 2018; Kulkarni-Gosavi et al., 2019).

5.3. Exocitosis

5.3.1. Vesículas sinápticas

La comunicación entre neuronas se produce principalmente mediante la liberación de neurotransmisores tras el proceso de exocitosis. Durante la exocitosis, las moléculas se liberan a la matriz extracelular a través de un poro resultante de la fusión de la membrana de la vesícula secretora con la membrana plasmática. El proceso de fusión de membranas y liberación de neurotransmisores se puede producir según dos modelos.

En el modelo “*kiss-and-run*”, la membrana de la vesícula secretora y la membrana plasmática se fusionan parcialmente formando un poro estrecho por el que se liberan moléculas pequeñas. Mientras en el modelo de fusión total o “*full fusion*”, la membrana de la vesícula se fusiona totalmente con la membrana plasmática, liberando completamente su contenido al exterior (Houy et al., 2013)(Figura 9). La liberación de neurotransmisores está regulada por potenciales de acción de iones calcio (Ca^{2+}) extracelular e intracelular. Cuando se produce una señal interneuronal a través de la entrada de Ca^{2+} a los terminales neuronales, se activa la exocitosis y la liberación de neurotransmisores a la matriz extracelular (Williams y Smith, 2018).

La fusión de membranas intracelulares está regulada por proteínas SNARE presentes en la membrana vesicular y la membrana plasmática. En la membrana vesicular, la SNARE sinaptobrevina-2 (VAMP2) forma un complejo con las SNARE sintaxina-1 y SNAP-25 de la membrana plasmática. La formación de este complejo provoca una unión progresiva de las cadenas helicoidales de las SNARE en dirección N-terminal a C-terminal que conlleva la unión de las membranas, abriendo el poro de fusión (Südhof, 2013). En este contexto, la VAMP2 suele denominarse v-SNARE por su localización vesicular y las sintaxina-1 y SNAP-25, t-SNAREs por su localización de transmembrana (Rizo, 2018).

5.3.2. Vesículas extracelulares: Exosomas

Además de vesículas sinápticas, las neuronas también liberan al entorno extracelular diversos tipos de vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares tienen un papel importante en la comunicación celular, sirviendo como vehículo de transferencia de proteínas de membrana y citosólicas, lípidos y RNA (Raposo y Stoorvogel, 2013). Según su biogénesis y tamaño, las vesículas extracelulares se pueden clasificar en cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (Gurung et al., 2021). Los cuerpos apoptóticos suelen ser vesículas grandes (>1000 nm), producto de células que están en proceso de muerte celular programada, las microvesículas (100-1000 nm) se producen por evaginaciones de la membrana plasmática y los exosomas son vesículas pequeñas (30-200 nm) producto de la exocitosis de componentes de origen de la endocitosis (Gurung et al., 2021)(Figura 8). En los últimos años, estas vesículas, especialmente los exosomas, son objeto estudio debido a su alto potencial terapéutico y a su posible papel en la transmisión de citopatologías (Zhang et al., 2019).

La biogénesis de los exosomas se inicia en la membrana postsináptica con la endocitosis de material liberado al espacio sináptico por exocitosis, como por ejemplo los neurotransmisores. Estas moléculas se unen a sus receptores específicos en la membrana postsináptica, provocando una respuesta en la neurona receptora. Tras esta interacción, se acciona la endocitosis de las moléculas ancladas por invaginación de la membrana plasmática postsináptica, formando vesículas intracelulares que se fusionan intracelularmente, formando los endosomas tempranos (Huotari y Helenius, 2011; Krylova y Feng, 2023). Estas vesículas intracelulares son la principal forma de almacenamiento y reciclaje de neurotransmisores (Xia et al., 2022).

En los endosomas tempranos, el contenido puede seguir tres vías. El material destinado a reciclaje se localiza en el dominio periférico del endosoma, para posteriormente separarse y fusionarse con el TGN o con la membrana plasmática. En la vía de almacenamiento, el endosoma temprano se somete a un proceso de maduración endosomal, formando el endosoma tardío. Este proceso de maduración endosomal consiste en modificaciones de la membrana plasmática del endosoma que facilitan su movilidad y clasificación intracelular. En este contexto, se intercambian esfingolípidos por ceramidas, o algunas proteínas por otras, como por ejemplo la Rab5, que se sustituye por Rab11 (Krylova y Feng, 2023).

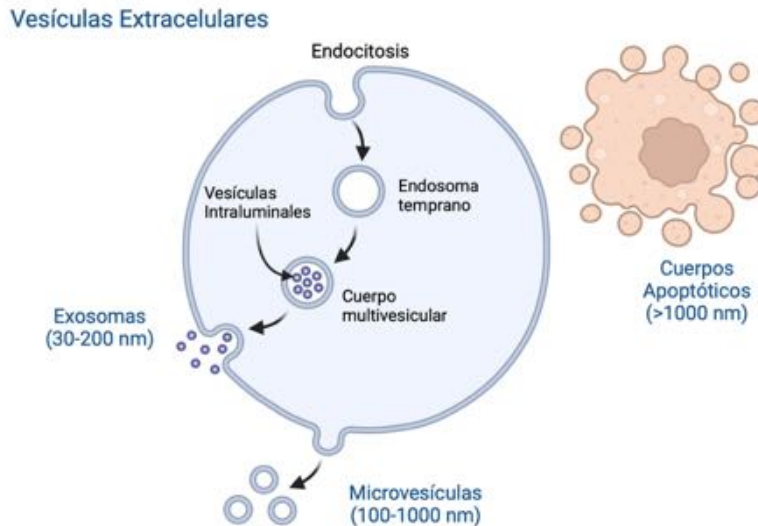


Figura 8. Representación gráfica de la formación de vesículas extracelulares. Existen tres categorías principales de vesículas extracelulares según su origen y tamaño. Los cuerpos apoptóticos son vesículas liberadas por la desintegración de células en proceso de apoptosis; las microvesículas, tienen origen en la exocitosis mediante gemación de la membrana celular y los exosomas son vesículas extracelulares producto de la endocitosis y formación de cuerpos multivesiculares en el citosol. Figura de elaboración propia, creada con BioRender.

Posteriormente, ciertas partes de la membrana del endosoma se invaginan, formando vesículas en el espacio intraluminal del endosoma, otorgándole una apariencia multivesicular, por lo que a los endosomas tardíos también se les conoce como cuerpos multivesiculares (CMV). El endosoma tardío posteriormente puede fusionarse con lisosomas procediéndose de esta forma a su degradación o seguir una ruta de exocitosis a la membrana plasmática, con la que se fusiona, produciendo la liberación de las vesículas intraluminales como exosomas al medio extracelular (Kalluri y LeBleu, 2020) (Figura 9). Estos exosomas podrán ser endocitados por células receptoras, donde tendrán función de transmisión de señales y/o moléculas o formar parte integral de la matriz extracelular (Pegtel y Gould, 2019).

El análisis y cuantificación de estas vesículas, se basa en el marcaje de proteínas presentes en la membrana de exosomas, como son las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 (Picca et al., 2020; Rastogi et al., 2023; Rufino-Ramos et al., 2022; Yakabi et al., 2023; Yeh et al., 2021). Entre ellas, la CD63 es una de las más estudiadas, siendo la primera tetraspanina descrita, es especialmente abundante en la membrana de vesículas intraluminales de los endosomas tardíos, las cuales se liberan posteriormente como exosomas (Han et al., 2023; Pols y Klumperman, 2009). Actualmente, se ha intensificado el estudio de las vesículas extracelulares, y más concretamente de los exosomas, como posibles vías de transmisión de las patologías neurodegenerativas en el sistema nervioso (Figura 10).

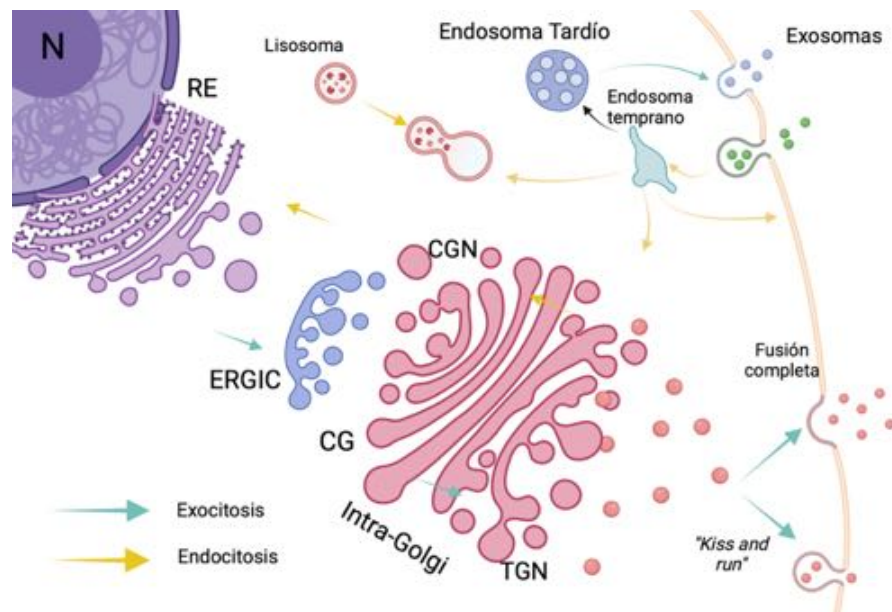


Figura 9. Esquema de la vía secretora en neuronas. En la vía secretora, las proteínas de nueva síntesis salen del RE hacia el ERGIC. Estas proteínas son sometidas a modificaciones postraduccionales en el CGN y se clasifican en vesículas secretoras en el TGN. En neuronas, la exocitosis de vesículas sinápticas se da mediante dos vías: “*Kiss and run*” o “*Full Fusion*”. El material exocitado puede ser endocitado por células receptoras, formando el endosoma temprano. Este contenido podrá reciclarse, almacenarse o seguir la vía de exocitosis madurando a endosoma tardío y liberando su contenido en forma de exosomas al medio extracelular. N: núcleo, RE: retículo endoplasmático, ERGIC: compartimento intermedio, CG: complejo de Golgi, CGN: red del Cis-Golgi, TGN: red del Trans-Golgi. Figura de elaboración propia creada con BioRender.

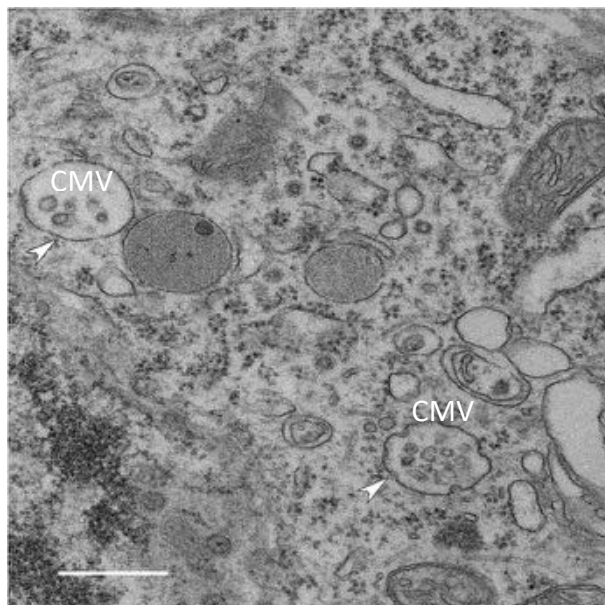


Figura 10. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la formación de exosomas en neurona. En la imagen se encuentran marcados los cuerpos multivesiculares (CMV), en los cuales se observan vesículas intraluminales que posteriormente serán liberadas al medio extracelular en forma de exosomas. Imagen tomada y modificada de Mathews y Levy (2019). Barra 500 nm.

En el contexto de la EP, a pesar de que los mecanismos no se han elucidado, se ha detectado que la α -sinucleína oligomérica se libera directamente al entorno extracelular mediante exosomas, funcionando como una posible vía de propagación de la citopatología a otras neuronas (Yu et al., 2020).

A pesar de ser posible la purificación de exosomas de fluidos biológicos, se encuentra en entredicho la detección de α -sinucleína en exosomas como biomarcador de la EP debido a la baja abundancia de la proteína en estas vesículas, siendo necesarios un mayor número de estudios para verificar su especificidad y sensibilidad como método de diagnóstico (Yu et al., 2020). Sin embargo, el estudio de estas vesículas permite la recogida de muestras de pacientes de forma menos invasiva para el estudio de posibles biomarcadores, como podría ser de la saliva, la sangre o la orina.

6. Maquinaria molecular del transporte intracelular

El tráfico intracelular es un proceso dinámico esencial para mantener la homeostasis en los orgánulos membranosos de la célula. La formación y transporte de vesículas intracelulares es un proceso altamente regulado, que requiere de un grupo de proteínas heterogéneo de Rab GTPasas, SNAREs, proteínas motoras, de aproximación o del citoesqueleto (Figura 9)(Cui et al., 2022).

Los defectos en el transporte intracelular y concretamente en este tipo de proteínas se han vinculado con enfermedades neurodegenerativas como la EP, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington y otras neuropatías (Kiral et al., 2018).

6.1. Proteínas reguladoras del transporte: Rab GTPasas

Las Rab GTPasas son una subfamilia de proteínas dentro de la superfamilia de las Ras GTPasas. Esta familia de proteínas está presente en todas las células eucariotas, pero se describieron por primera vez en tejido nervioso, dónde son especialmente abundantes debido a la alta diversidad funcional que reflejan las neuronas (Kiral et al., 2018). Las Rab GTPasas son claves para el mantenimiento del tráfico intracelular, ya que participan en procesos de fusión, transporte, apilamiento y ensamblaje de membranas (Villarreal-Campos et al., 2016). Estructuralmente, las Rab GTPasas se pliegan formando una lámina β compuesta por cinco cadenas dispuestas paralelamente y una cadena antiparalela, con cinco α -hélices rodeándola.

El extremo C-terminal de todas las Rabs es una región hipervariable de unos 35-40 aminoácidos, que en contacto con determinados efectores determina la localización y las interacciones de las Rabs con otras proteínas (Liu y Storrie, 2012).

La función de las Rab reside en el cambio entre la forma inactiva libre unida a GDP (guanosín difosfato) y la forma activa anclada a membrana, unida a GTP (guanosín trifosfato). En la forma activa, cada Rab GTPasa puede interactuar con una variedad de efectores, normalmente relacionados con etapas del tráfico intracelular, reclutándolos. Estos efectores son variables, y entre ellos, se incluyen, por ejemplo, componentes del citoesqueleto, SNAREs o adaptadores motores (Liu y Storrie, 2012). Estas Rabs a su vez están reguladas por chaperonas inhibidoras de la disociación con GDP (GDI), factores de desplazamiento de GDI (GDFs) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs). En este contexto, las GDIs mantienen las Rabs inactivas en el citosol, mientras que las GDFs regulan la inserción de las Rabs en las membranas correspondientes. Por último, las GAPs inactivan las Rabs unidas a GTP por hidrólisis del GTP a GDP, extrayéndolas de las membranas hasta su posterior reactivación en un nuevo proceso de transporte vesicular (Progida, 2019).

Actualmente se han descrito en humano más de 60 proteínas de la familia de las Rab GTPasas (Goud et al., 2018), de entre las cuales al menos 20 estarían asociadas al CG (Liu y Storrie, 2015).

Rab1

En el transporte entre el RE y el cis-Golgi, se han identificado múltiples Rab GTPasas implicadas en la comunicación de ambos orgánulos (Goud et al., 2018), siendo el mecanismo de acción de la Rab1 en esta región el más estudiado.

La Rab1 posee dos isoformas, la Rab1a y la Rab1b, y ambas se encuentran asociadas a membranas del ERGIC, donde estaría involucrada en la biogénesis de vesículas COPII derivadas del RE, el acoplamiento de estas vesículas al CG y en el transporte retrógrado mediado por vesículas COPI. Además de estar involucrada en el transporte RE-CG, la Rab1 también está presente en el espacio intra-Golgi (Figura 9) (Goud et al., 2018). Los cambios entre el estado activo e inactivo de la Rab1, promueven cambios conformacionales en la estructura de la proteína y su unión a efectores. La Rab1-GTP regula el tráfico de vesículas derivadas del RE y la fusión con el CG al reclutar los factores de anclaje p115 y v-SNAREs. Mientras que en el espacio

intra-Golgi, la Rab1 forma un complejo con la proteína Golgin-84, contribuyendo al mantenimiento de la estructura del CG (Yang et al., 2016).

En modelos de ratón, la ausencia de Rab1 provoca la fragmentación del CG, siendo la expresión de esta proteína, la única forma de restaurar la correcta citoarquitectura del orgánulo, indicando su papel fundamental en el mantenimiento de la estructura del CG (Galea et al., 2015; Saraste, 2016). Además, la Rab1 tendría un papel específico en el tráfico intracelular en neuronas. En las proyecciones neuronales (dendritas y axones), también denominadas neuritas, no suele estar presente el CG, pero sí estructuras tubulares del ERGIC en contacto con los endosomas tempranos, denominadas satélites (Mikhaylova et al., 2016).

Estas estructuras membranosas dónde se encuentra anclada la Rab1, se localizan en el cono de crecimiento de las neuritas, estableciendo una unión bidireccional con el cuerpo central de la neurona y favoreciendo el desarrollo neuronal (Santerud et al., 2006).

Rab2

La Rab2 se localiza principalmente anclada a las paredes del cis-Golgi y en el ERGIC. Esta GTPasa desempeña un papel esencial en el transporte vesicular mediado por COPI, facilitando tanto el transporte anterógrado como el retrógrado de proteínas y lípidos, contribuyendo a la homeostasis y el mantenimiento estructural del CG. En este contexto, la Rab2 interactúa con proteínas efectoras como GOLGA2 (Golgin-A2), una proteína estructural clave del CG, para estabilizar la organización del orgánulo y coordinar el tráfico vesicular. Además, la proteína Rab2 también actúa en procesos de autofagia, este mecanismo que asegura el reciclaje de las proteínas, previniendo la acumulación de proteínas mal plegadas en células que enfrentan altos niveles de estrés, como las productoras de insulina o las neuronas (Sugawara et al., 2014).

En el reciente estudio llevado a cabo por Szinyákovics et al. (2023) en un modelo animal de la EP en *Drosophila melanogaster*, observaron que la sobreexpresión de Rab2 aumentaba la esperanza de vida en una cepa de mosca con la mutación A53T para la α -sinucleína, mediante la activación de la autofagia.

Rab3a

Son muchas las Rabs presentes en el transporte vinculado al TGN y fuera del CG, entre ellas se encuentran Rab3, Rab6, Rab7b, Rab8 - Rab14, Rab21, Rab22b, Rab27, Rab29 y Rab39 entre otras (Figura 12). Algunas Rab GTPasas son casi exclusivas de neuronas, como es el caso de la Rab3a y la Rab27b, las cuales están presentes en la exocitosis de vesículas sinápticas (Kiral et al., 2018).

De entre ellas, la Rab3, se subdivide en cuatro isoformas distintas (Rab3a, Rab3b, Rab3c y Rab3d), de las cuales, la Rab3a es la más abundante en el cerebro (Dou et al., 2023; Schlüter et al., 2002). Aunque la Rab3a se ha descrito también en el CG, esta GTPasa se localiza principalmente en las terminaciones nerviosas, oscilando entre la forma citosólica unida a GDP y la forma activa unida a GTP anclada a la membrana de vesículas sinápticas. En este contexto, la Rab3a actúa regulando el reclutamiento y la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica durante la exocitosis de neurotransmisores (Geppert et al., 1997; Huang et al., 2011; Leenders et al., 2001).

En esta fase del transporte intracelular, la Rab3 se ha vinculado con la patología de la EP y con la α -sinucleína (Chen et al., 2013; Dou et al., 2023). En la EP, las mutaciones de ganancia de función del gen LRRK2, producen la fosforilación de Rab GTPasas como la Rab3a. La fosforilación de la Rab3a por la LRRK2, a su vez, altera el transporte anterógrado de vesículas sinápticas en el axón, originando un déficit en su liberación que favorece la acumulación de proteínas en el soma neuronal, contribuyendo de esta forma a la citopatología de la EP (Dou et al., 2023). También se ha descrito que la fosforilación del residuo 129 de la α -sinucleína, una de las alteraciones más comunes de la α -sinucleína en la EP, favorece su unión con la Rab3a en los terminales sinápticos, inhibiendo la hidrólisis de GTP y alterando el tráfico de vesículas sinápticas (Lv et al., 2022).

Además, esta GTPasa, también estaría involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de la membrana plasmática, actuando en el posicionamiento de lisosomas y endosomas tardíos, y en su unión con la membrana plasmática para reparar daños en la superficie celular (Encarnação et al., 2016; Raiborg y Stenmark, 2016; Vieira, 2018). Son múltiples las funciones y los efectores que se han vinculado con la Rab3a. Estudios recientes, han descrito la interacción de la Rab3a con la

espastina, una proteína clave en la biogénesis de los microtúbulos, modulando el crecimiento neuronal (Yang et al., 2023) .

6.2. Proteínas de anclaje y fusión de membranas: SNAREs

La fusión de dos membranas lipídicas provoca cambios en la topología y conformación de las membranas, para que este proceso tenga lugar, es necesario el contacto directo entre ambas membranas con gasto de energía. Las proteínas SNARE son las encargadas de provocar esta fuerza mecánica que produce la deformación de las membranas y la fusión de la estructura (Risselada y Mayer, 2020). Las proteínas SNARE son generalmente proteínas pequeñas de unos 100-300 aminoácidos ancladas a la membrana vesicular (v-SNAREs) y a la membrana receptora (t-SNAREs) (Margiotta, 2021). Estructuralmente, las proteínas SNARE presentan un dominio en α -hélice responsable de la unión entre ellas, un dominio común de unos 60 aminoácidos y una región C-terminal hidrofóbica necesaria para el anclaje a la membrana (Margiotta, 2021).

En el proceso de fusión de membranas, es necesaria la formación de complejos de varias SNARE en las dos membranas, las v-SNARE interactúan con las t-SNARE para formar un complejo, que aproxima ambas membranas lo suficientemente cerca como para que se fusionen. Esta unión genera la energía necesaria para catalizar el cambio de conformación de las membranas lipídicas (Wang et al., 2017). Después de la fusión, el complejo SNARE se une a proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (SNAP) (*N-ethylmaleimide attachment protein*) y a proteínas de fusión al factor sensible de N-etilmaleimida (NSF), formando un complejo en el que el NSF hidroliza ATP, resultando en la liberación del ensamblaje entre v-SNARE y t-SNARE (Wang et al., 2017) (Figura 11).

Sintaxina-5

La formación de complejos SNARE es altamente específica, y están presentes en las etapas de la exocitosis y en el mantenimiento de la estructura del CG. Recientemente, se han descrito dos nuevos complejos SNARE en el CGN: Sintaxina-5/SNAP29/VAMP7 y Sintaxina-5/VTI1B/Sintaxina-8/YKT6. La existencia de estos complejos, han dado lugar a estudios en modelos celulares en los que la depleción de la sintaxina-5, produce una deficiencia en el proceso de glicosilación en el CGN

(D'Souza et al., 2023), indicando el papel de la syntaxina-5 en el mantenimiento del CG. Esta función de la syntaxina-5, también se hace evidente durante la mitosis celular, donde el CG sufre un proceso de desensamblaje y reensamblaje.

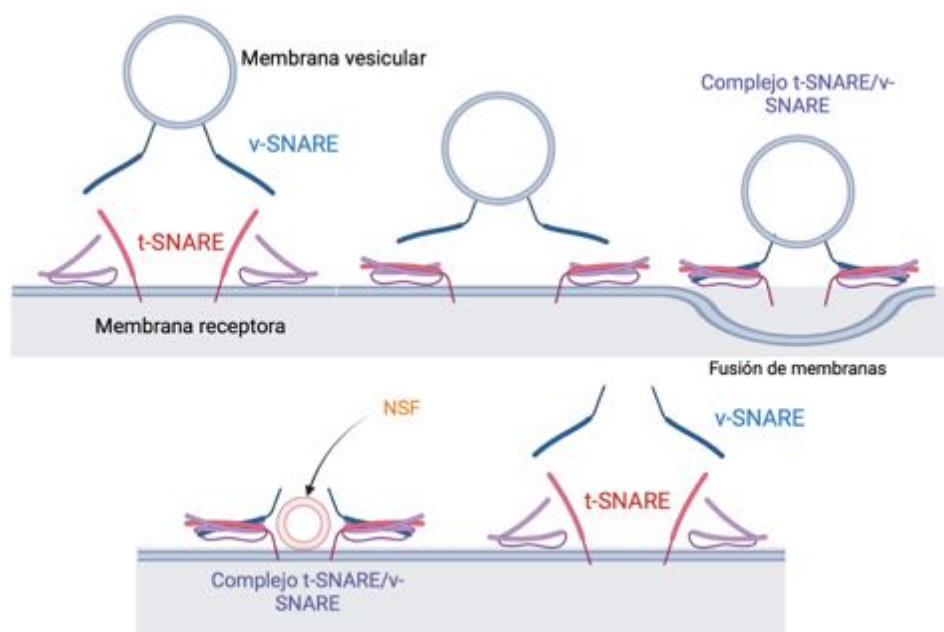


Figura 11. Esquema de fusión de membranas mediada por complejos SNARE. La unión de membranas en el tráfico intracelular es dependiente de la unión de proteínas v-SNARE y t-SNARE presentes en la membrana vesicular y en la membrana receptora. La formación del complejo v-SNARE/t-SNARE favorece la aproximación y fusión de las membranas para formar un único compartimento. Una vez se han fusionado las membranas, el NSF hidroliza el complejo, resultando en la liberación de las SNARE para su reutilización. Figura de elaboración propia, creada con BioRender.

Durante el reensamblaje del CG, la syntaxina-5 se ubiquitina e interviene en el reclutamiento de los fragmentos mitóticos del CG (S. Huang et al., 2016). Además, estudios en levadura, indican que la eliminación de inclusiones citosólicas proteicas parece ser dependiente de syntaxina-5 (Babazadeh et al., 2019). Es importante destacar que el complejo formado por las SNAREs syntaxina-5, GS27, Bet1 y Sec22b, es esencial en el transporte entre el RE-CG (Figura 12)(Linders et al., 2019). Este complejo es necesario para la fusión y ensamblaje de vesículas COPII provenientes del RE para la formación del ERGIC.

Proteínas de aproximación

Las proteínas o factores de aproximación son un grupo de moléculas que median el reconocimiento inicial y el contacto entre las vesículas y las membranas

receptoras, regulando el ensamblaje de las proteínas SNARE (Wang et al., 2017). Actualmente, se han descrito tres clases de factores de aproximación: complejos de proteínas en α -hélices superenrolladas, complejos de aproximación con múltiples subunidades y factores de anclaje específicos del CG (Ungermann y Kümmel, 2019). Estos factores difieren en la estructura de las subunidades individuales, la arquitectura general y la dimensión de los complejos, incluso dentro de la misma clase. Sin embargo, todos los factores de aproximación comparten la interacción con Rab GTPasas (Rab1, Rab2, Rab5, Rab6, Rab8, Rab11...) para ser reclutados, por la capacidad de unir membranas y por su papel en regular la fusión de los complejos SNARE (Koike y Jahn, 2022; Ungermann y Kümmel, 2019).

Los complejos de proteínas de α -hélices superenrolladas, son proteínas largas, de más de 200 nm, que pueden interaccionar a grandes distancias, mientras que los complejos de múltiples subunidades operan a distancias más cortas, de unos 30 nm (Koike y Jahn, 2022).

Cuando las vesículas son capturadas por los factores de aproximación de la membrana receptora, estas proteínas de aproximación cambian su conformación de un estado extendido a colapsado, de esta forma las vesículas se atraen a la membrana receptora a una distancia menor de 8 nm, compatible con la interacción de los complejos SNARE, mediando de esta forma, la fusión de ambas membranas (Koike y Jahn, 2022).

Algunas de las proteínas de aproximación más estudiadas, incluyen a las golginas, GM130, Golgin-45, Golgin-97, Golgin-245 o p115, en las membranas del CG (Figura 9.) (Hong y Lev, 2014). Este complejo de proteínas media la dirección y fusión de vesículas en el CG en la cara cis-Golgi y en el TGN del CG (Wang et al., 2017). Además, estas proteínas de aproximación también interaccionan con proteínas SNARE regulando el ensamblaje de los complejos SNARE. En este contexto, p115 interacciona con syntaxina-5, GS28, GS15, Sec22, GS27 regulando el ensamblaje de este complejo SNARE en el CG (Wang et al., 2017).

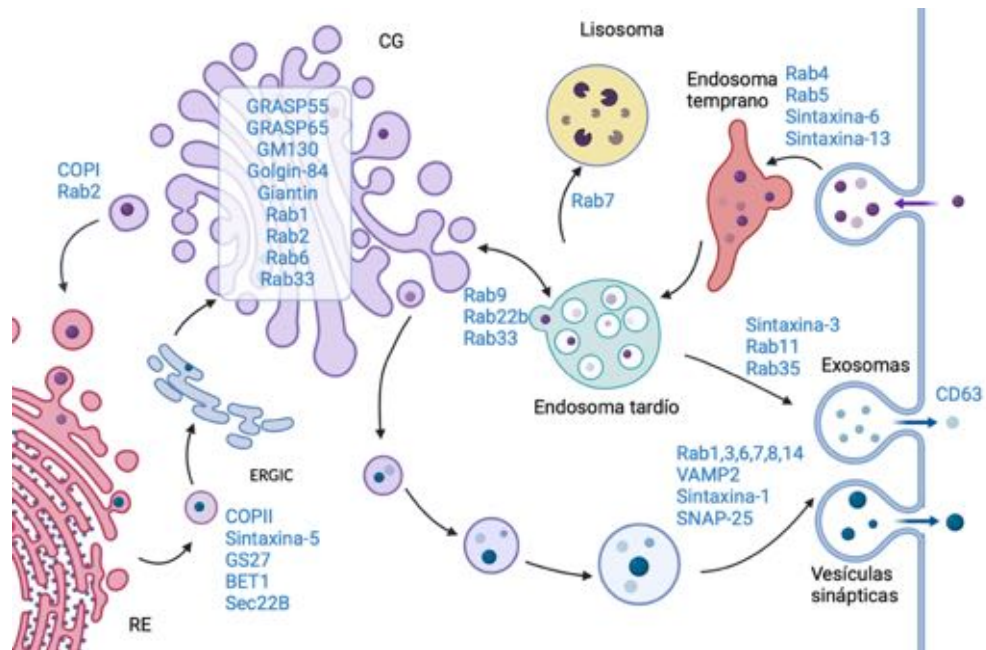


Figura 12. Esquema de la maquinaria molecular del transporte intracelular. Se ilustra la localización subcelular de algunas de las proteínas involucradas en el transporte de membranas y en el mantenimiento de la citoarquitectura del CG durante el proceso de endocitosis y exocitosis. Figura de elaboración propia creada con BioRender.

6.2. Citoesqueleto

En células eucariotas y especialmente en neuronas, la estructura y organización del RE y el CG, así como la direccionalidad del transporte intracelular, está regulado en gran parte por el citoesqueleto. De hecho, los microtúbulos que conforman el citoesqueleto controlan la localización y organización del CG, y proveen de una ruta de transporte a través de la célula hacia las dendritas y los axones mediante diversos mecanismos (Mascanzoni et al., 2022; Parato y Bartolini, 2021). En las neuronas, son tres los principales componentes del citoesqueleto: los microtúbulos, los neurofilamentos y los filamentos de actina (Di Giaimo et al., 2020).

Los microtúbulos

Los microtúbulos en todas las células eucariotas tienen un papel fundamental en la regulación de la estructura celular, el movimiento de orgánulos, la secreción de moléculas y la división celular. En neuronas, los microtúbulos se disponen paralelos a las fibras nerviosas y se orientan uniformemente con sus extremos polarizados hacia el axón.

Con esta disposición, los microtúbulos forman una vía de transporte de material a través de las fibras nerviosas (Di Giaimo et al., 2020). Los microtúbulos son polímeros de 13 protofilamentos polarizados formados por subunidades de α y β tubulinas regulados por el centrosoma (Di Giaimo et al., 2020; Parato y Bartolini, 2021). Los centrosomas son orgánulos multifuncionales sin membrana de unos 330-600 nm de longitud y 25 nm de diámetro, compuestos por dos centriolos apareados de nueve tripletes de microtúbulos cada uno, en disposición cilíndrica simétrica. La función principal de los centrosomas es la nucleación de los microtúbulos, actuando como lugar de ensamblaje de los dímeros de tubulina (Mascanzoni et al., 2022; Vaquez-Limeta y Loncarek, 2021). En las neuronas, los microtúbulos maduros no se encuentran unidos al centrosoma, lo que otorga una mayor variedad de disposiciones geométricas dependiendo de factores enzimáticos y moléculas motoras (Parato y Bartolini, 2021).

La nucleación de los microtúbulos también se lleva a cabo en el CG, a través de dos complejos proteicos localizados en la red cis y trans del Golgi. El primer complejo localizado en el CGN se origina a través de GM130 (Mascanzoni et al., 2022). Esta golgina recluta proteínas de anclaje como AKAP450, CEP215 y miomegalina, que van a producir el ensamblaje de microtúbulos en el CG. Posteriormente, esos microtúbulos son estabilizados en el TGN por proteínas MTCL1, CLAPs, AKAP450, CAMPSAP2 reclutadas por la miomegalina. Además, la golgina GM130 también interactúa con GRASP65 en el CG, teniendo papel de estabilización de los nuevos microtúbulos y de la estructura del CG (Mascanzoni et al., 2022).

Filamentos de actina y neurofilamentos

Los filamentos de actina, también denominados microfilamentos, se originan a raíz de la polimerización de monómeros de actina globular, formando polímeros de dos cadenas helicoidales de unos 8 nm de diámetro. Los filamentos de actina son estructuras polares, normalmente asociadas a superficie de membranas (Gurel et al., 2014). Los filamentos de actina están también involucrados en diversos procesos celulares, como la división celular, la endocitosis, la exocitosis, el mantenimiento de la estructura del CG o el transporte RE-CG (Mascanzoni et al., 2022). En las neuronas, la actina adquiere reorganizaciones estructurales esenciales en la formación de prolongaciones citoplasmáticas como las dendritas o el cono de crecimiento axonal.

Recientemente, se ha descrito que los filamentos de actina adquieren una conformación en anillos a lo largo de los axones y las dendritas, los cuales dotan de soporte mecánico a las neuronas (Oliveira da Silva y Liz, 2020). Algunos estudios también han descrito la vinculación de los filamentos de actina con la organización del tráfico de vesículas intracelulares y la liberación de vesículas sinápticas en la exocitosis (Rust y Maritzen, 2015).

Los neurofilamentos son un tipo de filamentos intermedios expresados exclusivamente en las neuronas, compuestos por tres subunidades proteicas, la proteína neurofilamentosa de alta densidad (205 kDa), de densidad media (160 kDa) y de baja densidad (68 kDa) (Gentil et al., 2015). Estos filamentos forman una estructura compuesta por extremo N-terminal, un dominio en α -hélice central y un extremo C-terminal largo, de unos 10 nm de diámetro. Los neurofilamentos son esenciales en el crecimiento de los axones, otorgando al axón de soporte mecánico y determinando el diámetro de su estructura y favoreciendo la mielinización (Di Giaimo et al., 2020; Gentil et al., 2015). Además, los neurofilamentos interactúan con otros elementos del citoesqueleto, como los microtúbulos, para organizar y posicionar orgánulos en el entorno celular, como son el núcleo, las mitocondrias, el CG o el RE (Gentil et al., 2015).

7. Alteraciones del tráfico intracelular en la neurodegeneración

Las alteraciones en el tráfico intracelular se han vinculado a la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas. Gracias al avance en técnicas bioquímicas y genéticas, se han descubierto mutaciones vinculadas a la EP familiar que están directamente relacionadas con el transporte intracelular, como son las descritas en los genes LRRK2, PINK1, SNCA, RAB39b, VPS35, etc (Dou et al., 2023; Hasegawa et al., 2017; Kiral et al., 2018).

Una anomalía común de varias enfermedades neurodegenerativas es la fragmentación del CG (Caracci et al., 2019; Fan et al., 2008; Y. Wei et al., 2023). Estudios post-mortem y en modelos animales, han descrito la fragmentación del CG en la enfermedad de Alzheimer, la atrofia multisistémica, la ataxia espinocerebral de tipo II, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, y en la EP (Fan et al., 2008; Fujita et al., 2006; Gonatas et al., 2006). Considerando que el CG es el orgánulo central del transporte intracelular, la fragmentación del CG conlleva alteraciones en el pH, la

glicosilación y el transporte intracelular, siendo habitualmente un evento previo al proceso de apoptosis celular, lo que indica que es un contribuyente clave en la neurodegeneración (Liu et al., 2021) (Figura 13). La inhibición de la fragmentación del CG neuronal disminuye o retrasa la apoptosis celular y previene la agregación de proteínas anómalas, como la α -sinucleína, eventos clave en la neurodegeneración (He et al., 2020; Liu et al., 2019).

Las alteraciones en proteínas fundamentales en el mantenimiento del tráfico intracelular, también se han vinculado con irregularidades en la estructura y funcionamiento del CG en enfermedades neurodegenerativas. En modelos celulares y animales, la depleción de proteínas estructurales como la GM130 o de anclaje como la SNARE syntaxina-5, producen una deficiencia en la glicosilación de proteínas en el CG (D'Souza et al., 2023) y la fragmentación del CG (Caracci et al., 2019; Suga et al., 2005). A su vez, en un modelo celular de la enfermedad de Alzheimer, el proceso de estrés en el CG se describió un aumento en la expresión en la syntaxina-5, indicando su posible función como factor de protección, mientras que el proceso de estrés prolongado produciría su degradación por la acción de la caspasa-3 durante la apoptosis celular (Suga et al., 2022).

En este contexto, también se han descrito alteraciones en la red de microtúbulos en neuronas afectadas de la citopatología de la EP. En algunos modelos de la EP se ha observado agregación de las tubulinas junto con la agregación de la α -sinucleína (Cyske et al., 2023). Además, en estudios recientes en modelos celulares y animales, se ha observado la interacción de la α -sinucleína con los filamentos de actina, teniendo un efecto negativo en la función neuronal, en la elongación y migración axónica y en la función mitocondrial (Oliveira da Silva y Liz, 2020).

La desestructuración y disfunción del CG y sus proteínas asociadas se han identificado como eventos comunes en varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica y la EP. Estas alteraciones son factores implicados en la acumulación de proteínas mal plegadas, estrés oxidativo y eventualmente la muerte celular.

Es fundamental ampliar el conocimiento sobre los mecanismos patológicos que afectan al CG y las proteínas involucradas en el tráfico intracelular. Este enfoque resulta clave para optimizar el diagnóstico y desarrollar estrategias terapéuticas basadas en posibles factores comunes que actúan en las etapas iniciales del desarrollo de

enfermedades neurodegenerativas. A largo plazo, esta comprensión podría permitir no solo retrasar, sino también prevenir la progresión de estas patologías, contribuyendo significativamente a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

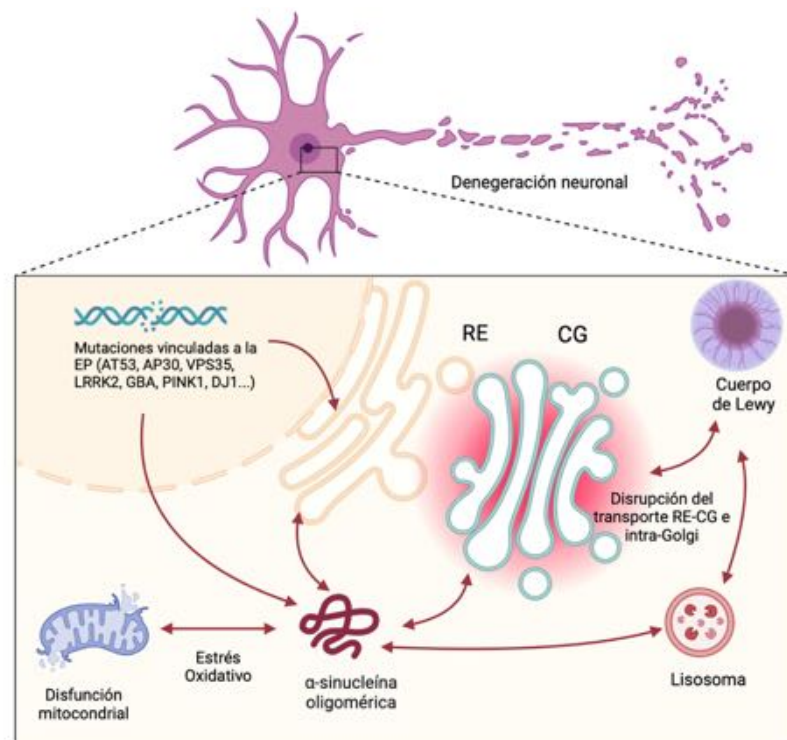


Figura 13. Esquema de la implicación del transporte intracelular en la neurodegeneración. La presencia o acumulación de proteínas citotóxicas como las formas oligoméricas de la α -sinucleína, pueden asociarse con componentes estructurales del RE, del CG y de las mitocondrias, produciendo la disrupción del transporte intracelular y de la función mitocondrial. Esto a su vez, produce una deficiencia en la actividad lisosomal y la autofagia, favoreciendo aún más la acumulación y desorganización de las proteínas, la formación de grandes agregados proteicos como los cuerpos de Lewy y la degeneración neuronal. Figura de elaboración propia creada con BioRender.

III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. Hipótesis y objetivos

1. Justificación

Actualmente, la EP se presenta como un desafío para el diagnóstico, ya que no se dispone de biomarcadores específicos que faciliten su identificación de manera temprana y precisa. Aunque los cuerpos de Lewy se consideran un sello histopatológico distintivo de la EP, carecen de validez como biomarcador, debido no solo a su presencia en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la demencia con cuerpos de Lewy o la esclerosis lateral amiotrófica, sino también a la inconsistente aparición de estos agregados de α -sinucleína en muestras de pacientes con la EP. A pesar de los avances alcanzados gracias a pruebas de diagnóstico por imagen y de estudio genético, las características sintomatológicas de la EP se correlacionan con otras condiciones neurodegenerativas, por lo que estos, resultan insuficientes para confirmar el diagnóstico de la enfermedad en estadios iniciales. Incluso cuando la condición clínica se ha manifestado completamente, la precisión en el diagnóstico de la enfermedad sigue siendo insuficiente. Es por ello por lo que actualmente, el examen post-mortem del encéfalo, sigue siendo el único método para confirmar con exactitud el diagnóstico de la EP.

Los estudios realizados hasta el momento reflejan un gran interés en la detección de nuevos biomarcadores diagnósticos, mostrando evidencias de una estrecha vinculación con las alteraciones en el tráfico intracelular, especialmente en la citoarquitectura del CG, orgánulo central en el tráfico de membranas. La fragmentación del CG se ha documentado recientemente como un fenómeno patológico común en diferentes enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Alzheimer. En este contexto, en la EP, las alteraciones producidas en el tráfico intracelular contribuyen a la acumulación de proteínas con plegamiento anómalo, como la α -sinucleína, la acumulación de dopamina y la formación de metabolitos citotóxicos, la interrupción de la vía lisosomal y la autofagia, y la generación de un estrés oxidativo que eventualmente favorecería la degeneración de neuronas dopaminérgicas.

En contradicción a la concepción histórica de que la EP es un trastorno exclusivamente motor vinculado principalmente a la degeneración dopaminérgica en el SNC, se ha producido un cambio de paradigma en el estudio de esta patología,

destacándose la creciente importancia de los síntomas gastrointestinales. Este cambio, ha propiciado una reconsideración en la aproximación de la investigación de la EP, poniendo especial énfasis en el eje bidireccional entre el SNC y el SNE, en un estudio integral y multidisciplinario de la enfermedad.

Los recientes descubrimientos de formas oligoméricas patogénicas de la α -sinucleína en tejidos nerviosos periféricos como es el SNE en muestras de pacientes y modelos animales, así como la presencia de una sintomatología gastrointestinal temprana en un gran porcentaje de los pacientes, reflejan que la citopatología de la EP no parece limitarse únicamente a las neuronas dopaminérgicas del SNC. Este hallazgo ha impulsado varias teorías sobre el origen de la enfermedad, situándolo fuera del SNC y sugiriendo una comunicación bidireccional entre el SNC y el SNP, tomando especial relevancia el estudio en el SNE y la transmisión de la α -sinucleína mal plegada través del nervio vago.

Por ende, las bases de nuestro trabajo se centran en explorar las posibles alteraciones estructurales en el CG, “estación central” en el proceso de tráfico intracelular, así como los cambios en diversas proteínas implicadas en la regulación y mantenimiento del tráfico de membranas en las neuronas dopaminérgicas tanto del SNC como del SNE, en un modelo animal de rata hemiparkinsoniana. El estudio comparativo entre las neuronas del SNE de colon proximal y las del colon distal, podría ayudar a comprender las posibles vías de propagación de la α -sinucleína en el eje SNC-SNE, y la influencia del nervio vago en la citopatología de la EP.

Analizar los posibles mecanismos implicados en la fragmentación del CG y en las alteraciones en el tráfico intracelular en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el SNE, podría suponer un avance en el conocimiento de la citopatología que caracteriza el inicio de la enfermedad y permitiría ampliar las vías de estudio y diagnóstico de la EP.

2. Hipótesis

La hipótesis central de nuestra investigación se fundamenta en que la microinyección unilateral de 6-OHDA en la SNpc en el modelo de rata hemiparkinsoniana, provoca alteraciones significativas en la estructura del CG y en la regulación del transporte intracelular en las neuronas dopaminérgicas.

Las neuronas dopaminérgicas se caracterizan por una extensa ramificación axonal, lo que genera una alta demanda metabólica y requiere de un tráfico intracelular muy activo, haciéndolas especialmente vulnerables a las alteraciones en el CG. Estas alteraciones interfieren en la glicosilación, maduración, liberación y reciclaje de proteínas, relacionándose con la agregación de la α -sinucleína en formas oligoméricas citotóxicas, ya identificadas en el modelo celular de la EP desarrollado en nuestro laboratorio (Rendón et al., 2013).

En este contexto, la microinyección de 6-OHDA ofrece un modelo experimental ideal para estudiar la fragmentación del CG como un evento citopatológico temprano en la EP, ya que no se observan cuerpos de Lewy en este modelo, lo que puede ayudar a comprender si estas alteraciones pueden preceder a la agregación de la α -sinucleína y posterior formación de los cuerpos de Lewy.

La conexión bidireccional entre el SNC y el SNE, y las observaciones en pacientes con EP, sugieren que estas alteraciones estarían presentes en las neuronas dopaminérgicas de ambos sistemas nerviosos, apoyando así la teoría de la implicación del SNE en el desarrollo de la EP, principalmente a través de la conexión establecida por el nervio vago. En este contexto, las neuronas dopaminérgicas del SNE serían aún más sensibles a la exposición de toxinas como la 6-OHDA, debido a la carencia de una barrera hematológica protectora como la presente en el SNC. Por lo que, la detección de alteraciones en las neuronas dopaminérgicas del SNE podría proporcionar una ventana de estudio y diagnóstico en la EP.

Finalmente, en base a las diferencias en la innervación del SNE del colon, el estudio comparativo de la citopatología entre las neuronas dopaminérgicas de plexos nerviosos del colon proximal y del colon distal, podría proporcionar información para elucidar las posibles vías de transmisión de la citopatología de la EP en sus etapas más tempranas.

3. Objetivos

Con este trabajo, se pretende profundizar en el estudio de las bases celulares de la EP, mediante el análisis morfológico de neuronas dopaminérgicas del SNC y del SNE, de un modelo experimental de rata hemiparkinsoniana inducido por la toxina 6-OHDA.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el estudio del CG en las neuronas dopaminérgicas como eje central en el análisis citopatológico de la EP, analizando su citoarquitectura, así como la distribución y contenido de proteínas esenciales en el tráfico intracelular mediante análisis morfológicos y moleculares comparativos entre neuronas dopaminérgicas de la SNpc y las neuronas dopaminérgicas del SNE del colon proximal y del colon distal.

Los dos capítulos incluidos en el apartado de Resultados dan respuesta a los objetivos concretos enumerados a continuación:

Capítulo 1: Análisis morfológico y molecular de la sustancia negra pars compacta

- Objetivo 1. Evaluar el efecto de la neurotoxina 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc como modelo experimental de la EP.
- Objetivo 2. Estudiar la respuesta inflamatoria tras la lesión dopaminérgica, mediante análisis morfológico y cuantitativo de las células de la glía en la SNpc.
- Objetivo 3. Analizar la distribución de la proteína α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc tras la lesión dopaminérgica.
- Objetivo 4. Analizar la citoarquitectura del CG en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, a través de técnicas inmunohistoquímicas.
- Objetivo 5. Valorar las alteraciones en la distribución de proteínas esenciales en el mantenimiento de la estructura del CG y en la regulación del tráfico de membranas en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc
- Objetivo 6. Cuantificar la expresión de proteínas implicadas en la citoarquitectura del CG y en el tráfico intracelular en la SNpc.
- Objetivo 7. Realizar un estudio morfológico ultraestructural de la citoarquitectura del CG en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

- Objetivo 8. Analizar la distribución y expresión de proteínas presentes en las membranas de exosomas en la SNpc, como posible vía de transmisión de la EP.

Capítulo 2: Análisis morfológico de las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso entérico en el colon

- Objetivo 1. Identificar morfológicamente los plexos mientérico y submucoso en el SNE.
- Objetivo 2. Validar el modelo experimental de rata hemiparkinsoniana inducido por 6-OHDA, para el estudio del SNE, evaluando la lesión dopaminérgica en el SNE de muestras de colon proximal y colon distal.
- Objetivo 3. Analizar la densidad de la población de células gliales en plexos nerviosos del SNE de muestras de colon proximal y colon distal.
- Objetivo 4. Estudiar y comparar los cambios en la distribución de la α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas del SNE.
- Objetivo 5. Analizar la citoarquitectura del CG en las neuronas dopaminérgicas del SNE.
- Objetivo 6. Evaluar la citoarquitectura del CG en otros tipos neuronales que forman parte de los plexos nerviosos del colon proximal y colon distal.
- Objetivo 7. Analizar morfológicamente la distribución de proteínas involucradas en el tráfico de membranas en neuronas dopaminérgicas del SNE.
- Objetivo 8. Identificar proteínas presentes en las membranas de exosomas en los plexos nerviosos del colon como posible vía de transmisión de la EP en el SNE.

IV

MATERIAL Y MÉTODOS

III. Material y métodos

1. Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos y reactivos químicos de grado de pureza analítica utilizados en este trabajo se encuentran detallados en Anexos (Anexo I y II).

Los productos no especificados se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), Thermofisher (Waltham, MA, USA), Merk KGaA (Darmstadt, Alemania) y PanReac AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemania).

2. Modelo experimental

2.1. Sujetos experimentales

Para este estudio se seleccionó un modelo animal inducido por la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en el SNpc del hemisferio cerebral derecho, produciéndose una lesión específica de neuronas dopaminérgicas en uno de los hemisferios de los animales de experimentación. Al mismo tiempo, el otro hemisferio cerebral se utilizó como control. Se trata, por tanto, de un modelo de hemiparkinsonismo.

Se emplearon 22 ratas Sprague-Dawley machos y hembras (Charles River, Barcelona, España), con un peso medio de 300-350 gr. Todos los ensayos experimentales se aplicaron siguiendo estrictamente la normativa del Consejo de Europa 2010/63 relativa a la protección de los animales utilizados con fines científicos. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (A14311938371570). En concreto, se usaron 9 ratas macho y 13 ratas hembra y los animales fueron estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM) de la Universidad de Valencia. Las condiciones de estabulación fueron de una temperatura de 22 ± 2 °C, ciclos de luz/oscuridad de 12h, humedad del $55 \pm 10\%$ y con acceso a agua y alimento *ad libitum* hasta la fecha de experimentación.

2.2. Procedimiento quirúrgico

El procedimiento quirúrgico llevado a cabo, se realizó bajo condiciones de anestesia general, utilizando como agente anestésico isoflurano (3%-5%) mezclado con oxígeno puro que fue administrado por vía inhalatoria. Además, la anestesia general se complementó con anestesia local, administrando lidocaína distribuida en la superficie craneal. La efectividad de la anestesia se verificó mediante la comprobación de la ausencia de reflejos corneopalpebral, podal y cola, mediante contactos con algodón de la superficie corneal, o el pellizcamiento del espacio interdigital o la cola respectivamente. Además, para prevenir cualquier sensación de dolor como resultado de la cirugía, se administraron inyecciones subdérmicas de buprenorfina, un potente analgésico con una duración del efecto media-larga. Para prevenir la posible depresión respiratoria en los animales tratados con isoflurano y buprenorfina, se administró conjuntamente atropina, un antagonista competitivo del receptor muscarínico de acetilcolina, que induce la relajación del tejido muscular liso de las vías respiratorias, evitando así estos problemas respiratorios durante la cirugía. Los volúmenes de administración se establecieron en 0.05 mg/ por kg de peso del animal (Cho et al., 2019). La técnica se realizó en un marco estereotáxico (SR-6R, Narishige, Japón), colocando a los animales con el cráneo fijado al marco mediante soportes en los conductos auditivos externos y en incisivos para modular la posición definitiva del cráneo, de forma que permita la correcta identificación de las referencias estereotáxicas (Figura 14).

Posteriormente, se procedió a rasurar y desinfectar la cabeza del animal, y con ayuda de un bisturí, se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 2 cm en la piel del cráneo. Para dejar expuesta la superficie craneal, se retiró el periostio y se apartó la piel sobrante utilizando una espátula. Usando como referencia los puntos Bregma y Lambda de las suturas del cráneo, se niveló la cabeza, y se corrigieron las coordenadas extraídas del Atlas de Paxinos y Watson (2013).

Dado que las coordenadas en el atlas se basan en ratas con una distancia entre Bregma y el punto interaural de 9.0 mm, se aplica una corrección con el tamaño real de la cabeza del animal para asegurar el lugar de inyección exacta de la 6-OHDA en la SNpc. Esta consistió en medir la distancia entre Bregma y el punto interaural del cráneo y dividirla por la longitud del atlas (9.0mm), este factor posteriormente se emplea como factor de corrección en las coordenadas correspondientes de AP: -5.4 mm, ML: 1.9 mm y DV: 8.0 mm para la SNpc (Figura 15).

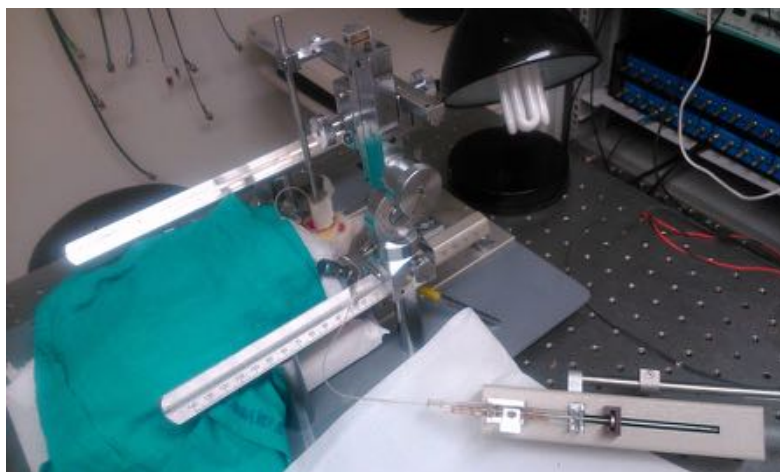


Figura 14. Imagen representativa del proceso de microinyección estereotáxica de la neurotoxina 6-OHDA en un hemisferio cerebral de rata en el marco estereotáxico.

Una vez localizada la posición, se marcó en el cráneo, se realizó el trépano con un taladro dental y se retiraron las meninges. Se inyectó un volumen de 7 μl de 6-OHDA (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en uno de los hemisferios cerebrales a una velocidad de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ con una jeringa Gastight de 10 μl (Hamilton®) unida al marco estereotáxico. Después de la cirugía, se suturó la incisión mediante sutura de seda 3/0 y los animales se mantuvieron en estabulación entre 18 y 21 días, en las mismas condiciones descritas anteriormente, para asegurar la degeneración definitiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc.

Para prevenir la sensación de dolor e inflamación durante los días posteriores a la intervención quirúrgica, se administró meloxicam por vía subcutánea una vez al día durante dos días. El volumen de administración se estableció en 2mg por kg de peso del animal (Cho et al., 2019).

En esta intervención quirúrgica se utilizaron 18 ratas (7 machos y 11 hembras), y los 4 animales restantes (2 machos y 2 hembras) se utilizaron como control para el estudio morfológico de las neuronas dopaminérgicas del SNE del colon, tratándose con el mismo procedimiento, pero con la sustitución de la 6-OHDA por una infusión de 7 μl de solución salina.

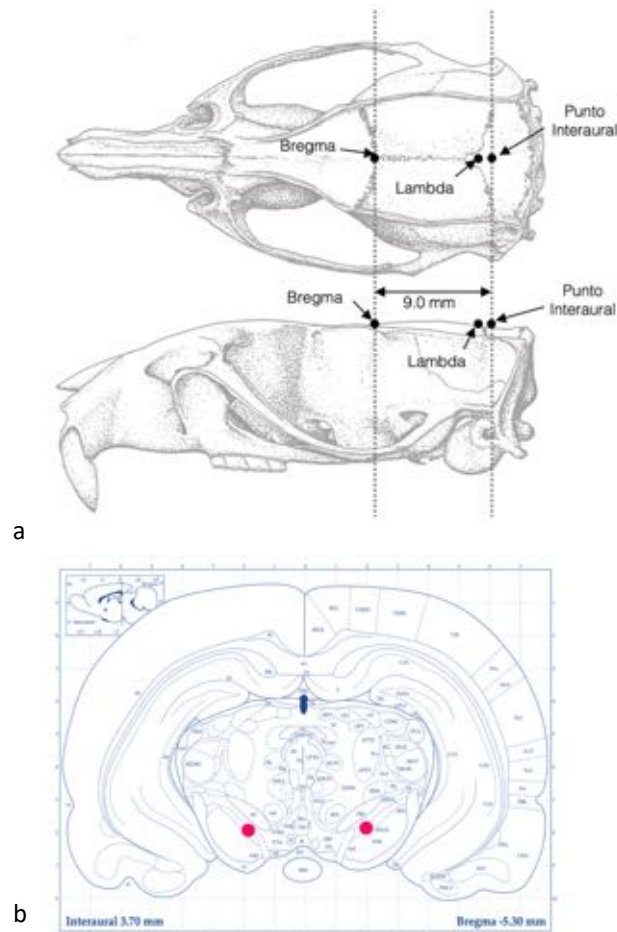


Figura 15. Esquema de la localización estereotáxica de la SNpc en rata modelo. (a) Visión lateral y dorsal del cráneo de rata modelo. Se representan con puntos las localizaciones de Bregma, Lambda y el punto interaural, siendo la longitud entre Bregma y el punto interaural de 9.0 mm. (b) Visión coronal y sagital (esquina superior izquierda) de sección de encéfalo de rata en la posición antero-posterior -5.4 mm con respecto a Bregma. En esta sección se localizan con puntos (rojo) la posición de la SNpc en ambos hemisferios cerebrales. Imágenes adaptadas del Atlas de Paxinos y Watson (2013).

2.3. Sacrificio, perfusión y obtención de muestras biológicas

Tras el periodo de estabulación posterior a la cirugía, las ratas hemiparkinsonianas y los controles para el estudio de las neuronas dopaminérgicas del SNE de colon, fueron sacrificados, mediante la administración por vía intraperitoneal, de una sobredosis de pentobarbital sódico (Doletal®) en relación 100 mg/Kg de peso corporal. Posteriormente, el tejido fue fijado mediante perfusión intracardiaca. Cuando la frecuencia cardíaca disminuyó, y se comprobó la ausencia de reflejos, se realizó una sección transversal en el abdomen a la altura del esternón, se seccionó el diafragma para así obtener una zona de abertura al corazón y se introdujo una cánula roma de 1 mm de diámetro sin filo, desde el ventrículo izquierdo hasta la aorta ascendente.

Después, se fijó la cánula con una pinza hemostática para asegurar su posición y se seccionó la aurícula derecha para permitir la salida de fluidos. Posteriormente con una bomba de perfusión (PERCOM N-M, J.P, Selecta) a la que estaba única la cánula, se administró con un flujo constante de 20 ml/min una solución isotónica (0.9%) para purgar la sangre del sistema circulatorio y seguidamente 500 mL de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% con glutaraldehído (GA) al 0.25% en tampón fosfato salino (PBS) (0.1M, pH 7.4), para asegurar una correcta fijación de la ultraestructura celular y la posterior observación de las muestras seleccionadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Una vez completada la fijación, se extrajo el encéfalo y se realizaron tres secciones coronales de 1 mm de grosor en una matriz Zivic®, tomando como referencia el lugar de inyección de la 6-OHDA y 1 mm a ambos lados de este.

Las secciones destinadas al análisis histológico e inmunocitoquímico, se sumergieron en una solución fijadora de PFA al 4% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente, calculando siempre el volumen de solución fijadora diez veces superior al volumen del tejido, estas muestras posteriormente se conservaron a 4°C. Para el estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica, se microdisecionaron las dos porciones de SNpc de ambos hemisferios de la sección coronal, hemisferio control y hemisferio con el punto de inyección, y se procesaron según se detalla en el apartado correspondiente (ver apartado 5).

Por otra parte, porciones de colon proximal y distal se extrajeron haciendo una pequeña incisión en el abdomen para exponer la cavidad peritoneal, se cortó el intestino grueso por el borde anal y localizando el ciego, y se obtuvieron segmentos de 4 cm de cada porción del colon. Estos se lavaron con PBS frío para eliminar las heces y se sumergieron en PFA al 4% en PBS 24h a 4°C, para su posterior procesamiento para el análisis histológico del tejido (ver apartado 3).

Las 5 ratas hemiparkinsonianas restantes no fueron perfundidas con la solución fijadora, con el fin de obtener los cerebros libres de fijador para utilizarlos en la cuantificación de proteínas mediante la técnica de Western-blotting (Tabla 1). En estos casos, los animales fueron sacrificados por decapitación, el cerebro se extrajo y se lavó suavemente con PBS frío. Se realizaron secciones coronales en matriz Zivic® y se microdisecionaron bajo lupa las dos porciones de SNpc de la sección coronal con el lugar de inyección, de esta forma se obtuvieron por separado la SNpc lesionada y control. Inmediatamente después, las muestras de SNpc se pesaron, congelaron y

almacenaron a -80°C para evitar la degradación de las proteínas. Las dos secciones coronales restantes de 1mm a ambos lados de la sección con el punto de inyección de cada encéfalo, se sumergieron en una solución fijadora de PFA al 4% en PBS durante 2h a temperatura ambiente. Estas secciones se procesaron posteriormente para el estudio morfológico mediante microscopía óptica de fluorescencia (ver apartado 3.2).

3. Estudio morfológico y cuantitativo mediante microscopía óptica

3.1. Análisis histológico

Con el fin de identificar los plexos mientérico y submucoso, y observar la densidad y ubicación de las neuronas en el SNE, se realizó un primer análisis histológico utilizando la tinción de azul de toluidina. El azul de toluidina es un colorante catiónico y metacromático en función del pH, que tiñe estructuras basófilas como la matriz extracelular o el nucleolo, siendo su uso muy extendido en el análisis de tejido nervioso al teñir de azul estructuras como los cuerpos de Nissl y las fibras nerviosas (Vidal y Mello, 2019). Para esta técnica, se diseccionó con bisturí una porción (< 1cm) de las muestras de colon proximal y distal fijadas en PFA al 4% en PBS durante 24h a 4 °C y se incluyeron en parafina.

La inclusión se realizó con previa deshidratación de las muestras debido al carácter hidrófobo de la parafina, por inmersiones sucesivas de 15 min en etanol, en gradiente creciente (30%, 50%, 70%, 80%, 96% y 100% (v/v)). La parafina tampoco es miscible con el etanol, por lo que posteriormente se realizaron dos lavados en xilol de 10 min para extraer el agente deshidratante, y finalmente se embebieron las secciones en moldes con parafina líquida en estufa a 60°C durante 1h. Después el molde se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta la solidificación de la parafina. Una vez obtenidos los bloques de parafina, se cortaron secciones transversales de 5 µm de espesor con micrótomos Leica RM2235 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) y se colocaron en series de dos secciones por portaobjetos. Para desparafinar las muestras, los portaobjetos se colocaron en estufa a 40 °C durante una noche, y posteriormente se realizaron dos lavados de 10 min en xilol. Seguidamente, se rehidrataron mediante varios lavados de 10 min en un gradiente descendiente de etanol (100%, 96%, 80%, 70% (v/v)), para finalizar con un último lavado en H₂O destilada.

Posteriormente, las muestras se tiñeron con azul de toluidina 0.5% en una solución de tampón acético/acetato (0.2 M ácido acético, 0.2 M acetato sódico) a distintos pH entre 3 y 5.4, durante 2 min, para elegir el óptimo para la identificación de los plexos nerviosos. Después se hicieron lavados rápidos consecutivos con H₂O destilada, etanol 96° y 100° y 2-3 lavados de 1 min en xilol para eliminar el exceso de colorante. Por último, las muestras se cubrieron con medio de montaje Entellan™ y cubreobjetos. Finalmente, las muestras histológicas se observaron bajo microscopio Leica DMD108 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

3.2. Inmunofluorescencia

3.2.1. Procesado de muestras y obtención de cortes con criostato

Las secciones de cerebro y colon destinadas para este estudio se mantuvieron en una solución de PFA (4%) durante 48h a 4 °C antes del procesado. La inclusión de las muestras en parafina puede provocar una pérdida de antigenicidad en las muestras por enmascaramiento de los epítomos, por lo que, con el fin de conservar la mayor especificidad posible para el inmunomarcaje, estas muestras no se incluyeron en parafina, si no que se criopreservaron y congelaron a -20°C hasta su utilización (Hira et al., 2019).

Para criopreservar las muestras y de esta forma no alterar las membranas celulares y evitar la formación de cristales de hielo durante la congelación, las muestras se lavaron con PBS y se sumergieron en una solución de sacarosa (30%) en PBS durante uno o dos días a 4 °C, hasta conseguir que la muestra se embebiera completamente en la solución. Después se incluyeron en cryobloc (Diapath, Martinengo, Italia), este compuesto a base de glicoles y resinas hidrosolubles es líquido a temperatura ambiente y se congela a temperaturas inferiores a -10 °C, siendo un medio de inclusión óptimo para obtener secciones de las muestras en criostato. Una vez congelados los bloques a -20°C, se obtuvieron secciones coronales de 7 µm de espesor del hemisferio cerebral control y experimental con el uso del criostato (Leica CM1950, Leica Biosystems) a -24 °C.

Se procedió de igual forma para el estudio de las muestras de colon proximal y distal. La inclusión de las muestras en parafina puede provocar una pérdida de antigenicidad en las muestras por enmascaramiento de los epítomos, por lo que, con

el fin de conservar la mayor especificidad posible para el inmunomarcaje, estas muestras no se incluyeron en parafina, si no que se criopreservaron y congelaron a -20°C hasta su utilización (Hira et al., 2019). Todas las secciones, se colocaron en series de tres en portaobjetos Superfrost Plus™ (Thermofisher, Waltham, MA, USA) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.2.2. Inmunomarcaje

Para el inmunomarcaje, los portaobjetos se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 min y utilizando un rotulador hidrofóbico Pap Pen, para delimitar el área alrededor de la sección y de esta forma se aseguró el mismo volumen de reactivos en cada muestra (20-30 µl).

Con el fin de realizar un último paso de fijación y asegurar la adhesión de los cortes al portaobjetos se volvió a aplicar una solución de PFA (4%) en PBS durante 1 min. Seguidamente se lavaron las muestras en cubeta de tinción con PBS, tres veces durante 5 min a temperatura ambiente.

Como la reactividad antígeno-anticuerpo puede verse disminuida por modificaciones estructurales en las proteínas debidas a la fijación con PFA, se aplicó un método de desenmascaramiento denominado “heat-induced antigen retrieval” (Kakimoto et al., 2008), que consiste en aplicar calor y presión a las muestras para romper las uniones cruzadas que se hayan generado tras la fijación en la estructura de las proteínas, para así recuperar la conformación original de la proteína y asegurar la unión del anticuerpo primario. Para ello, se sumergieron los portaobjetos en solución de desenmascaramiento (tampón citrato 10 mM, Tween™ 20 0.05%, pH 6.0) a 80 °C durante 30 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente unos minutos y se lavaron nuevamente con PBS tres veces, durante 5 min cada una.

Para evitar la formación de uniones inespecíficas entre el anticuerpo primario y otros epítomos y facilitar la penetración del anticuerpo mediante la permeabilización de las membranas celulares, se aplicó una solución de bloqueo con 2% albúmina de suero bovino (BSA) y 0.1% Triton™ X 100 en PBS durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el bloqueo y se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios en cámara húmeda a 4 °C durante 24 h (Anexo I).

Tras este periodo, se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 h. A partir de este momento, se mantuvieron los portaobjetos en oscuridad para evitar la degradación del fluoróforo por exposición a la luz.

Debido a la presencia de moléculas autofluorescentes como flavinas y lipofuscinas en las neuronas del SNC y el SNE, se volvieron a lavar las muestras con PBS y se incubaron con una solución de bloqueo de autofluorescencia (sulfato de cobre 2 mM, acetato de amonio 50 mM, pH 5) en PBS durante 1 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente (Potter et al., 2012). Después se lavaron con PBS y se marcaron los núcleos celulares con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 min. Finalmente, se realizó un lavado de 5 min en PBS y se montaron los portaobjetos con Mowiol, medio de montaje específico para inmunofluorescencia.

3.3. Microscopía de fluorescencia

El análisis de la densidad de neuronas dopaminérgicas en la SNpc se realizó con un microscopio de fluorescencia Leica DM 2500 equipado con una cámara Leica DFC 3000G (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), utilizando una lente objetivo en seco de 20x (apertura numérica 0.4). Las imágenes se capturaron usando el software Leica Application Suite X Versión 3.7.4.23463 (LAS X) (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

3.4. Microscopía confocal

La observación de las muestras de inmunofluorescencia se realizó con un microscopio confocal con escáner resonante Leica TCS-SP5-AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) bajo un lente objetivo de 100x de inmersión en aceite (apertura numérica 1.44). Para la excitación se utilizaron láseres DIODE 405 para DAPI, Ar (488) y HeNe 543 para anticuerpos secundarios conjugados Alexa-488 y Alexa-568 respectivamente. La adquisición de imágenes se realizó utilizando el software Leica Application Suite X (LAS X), en modo XYZ con un espesor en Z entre 2-6 μm y utilizando modo secuencial.

Para el modelado 3D, las imágenes se obtuvieron usando microscopio confocal Leica TCS-SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con tecnología de

láser de luz blanca (WLL), con lente objetivo de 63x de inmersión en aceite (apertura numérica 1.44). La adquisición de imágenes se realizó utilizando el software Leica Application Suite X (LAS X), en modo XYZ con un espesor de Z entre 5-7 μm y utilizando modo secuencial.

3.5. Análisis de datos

Para estudiar la distribución de las proteínas inmunodetectadas y cuantificar la intensidad de fluorescencia de las imágenes, se analizaron las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y el hemisferio modelo de la EP inducido por 6-OHDA de los 22 animales de experimentación. Para cada proteína de estudio, se realizaron al menos 3 repeticiones de la técnica de inmunofluorescencia en distintas secciones de los hemisferios cerebrales de cada animal, de las cuales se adquirieron un mínimo de 3-5 imágenes de la SNpc. Una vez adquiridas las imágenes, se utilizó el programa ImageJ Versión 1.53 (National Institute of Health, USA), para el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia.

Los datos obtenidos se extrajeron de la intensidad de la fluorescencia por área de interés y estos valores medidos luego se convirtieron a *.xls y se analizaron con SPSS Versión 26 (IBM: Nueva York, EE. UU.). Se utilizaron las pruebas t de Student y U de Mann-Whitney para comparar las medias entre los valores de muestras control y muestras EP, en base al análisis de la normalidad por la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Finalmente, utilizamos los valores de p para demostrar las diferencias entre los grupos, donde $p < 0,05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa entre las medias. Los gráficos se obtuvieron con Microsoft Excel y las medias se expresaron en porcentajes con error estándar de la media (SEM). El modelado 3D se procesó con el software Imaris (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido).

4. Inmunodetección y cuantificación de proteínas por Western-blotting

4.1. Extracción y determinación de proteínas

La extracción de proteínas para inmunodetección y cuantificación por la técnica de Western-blot se realizó partiendo de las muestras de SNpc congeladas a -80 °C. Se utilizaron fragmentos con un peso medio de 0.02 gr de 5 muestras control

y 5 muestras EP que fueron homogeneizados en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0.5%, EDTA 2 mM, desoxicolato sódico 0.5%, pH 8.8).

Este tampón de lisis que se complementó con ortovanadato sódico 1mM y un cóctel de inhibidores de proteasas SigmaFast™. La proporción en volumen de tejido/tampón se mantuvo 1:10 para todas las muestras (150-200 µl de tampón). Se utilizó un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem por agitación, hasta que la muestra quedó completamente diluida en el tampón de lisis. La homogeneización del tejido se realizó en frío para evitar la degradación de las proteínas por actividad enzimática tras la lisis. A continuación, cada lisado se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm a 4°C.

Debido al reducido peso de la SNpc (0.02 gr), se resuspendieron los *pelets* con el sobrenadante y se centrifugó de nuevo para asegurar la máxima extracción de proteínas, se recogió cuidadosamente el sobrenadante resultante y se transfirió a un tubo nuevo. A partir de estos extractos, se cuantificaron las concentraciones de proteína a partir de una curva patrón de BSA, usando el método de Micro-Lowry con Modificación de Peterson de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).

4.2. Técnicas electroforéticas

4.2.1. Electroforesis

Tras obtener la concentración proteica en los extractos resultantes, se separaron las proteínas en geles verticales en gradiente de acrilamida 4%-15% Mini-Protean® TGX™ de 0.1 cm de espesor (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) según el método de electroforesis en geles de acrilamida con SDS (SDS-PAGE) descrito por Laemmli U.K (1970). Con el fin de optimizar los extractos, se realizaron varias pruebas de concentración proteica y de dilución de anticuerpos en la inmunodetección. Se cargaron 15 µg de extracto proteico en tampón de carga Laemmli 4X en cada pocillo de los geles (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) en proporción 1:4 (tampón/muestra), desnaturalizada en termobloque a 100°C durante 3 min. Después se añadió en el primer y último pocillo un marcador de peso molecular Seeblue™ Plus2 de rango 250-4 kDa.

La electroforesis se realizó a 120V constantes a temperatura ambiente, en equipo Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0.1%, pH 8.3) hasta que el frente del tampón de carga llegase al otro extremo del gel.

4.2.2. Transferencia a membrana

Una vez finalizada la electroforesis, se realizó una electrotransferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE, del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,22 μm de poro (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), utilizando un sistema húmedo descrito por Towbin et al., 1979, en tampón de transferencia (Tri-HCl 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%, pH 8.3).

Esta transferencia se realizó en equipo Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), el cual consta de un soporte portageles con dos placas que actúan de ánodo y cátodo para la electrotransferencia. En este soporte, desde el ánodo al cátodo, se situaron una esponja humedecida con el tampón de transferencia, una lámina de papel Whatman® (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania) y el gel de acrilamida con las proteínas separadas. Sobre el gel de acrilamida, se dispuso la membrana de PVDF (0.22 μm de poro), otra lámina de papel Whatman® y una última esponja humedecida con el tampón de transferencia. Se eliminaron las burbujas de aire entre las distintas capas en la electrotransferencia para optimizar la electrotransferencia, y se colocó el soporte portageles en el equipo Mini Trans-Blot® con tampón de transferencia. El voltaje empleado para la transferencia de las proteínas fue de 150 mA constantes a 4 °C durante una noche, de esta forma, las proteínas migran desde el gel de acrilamida en el ánodo, hasta la membrana de PVDF en la posición del cátodo.

4.3. Métodos de detección de proteínas

4.3.1. Tinción con azul de coomasie

Una vez completada la electrotransferencia, se extrajeron el gel de acrilamida y la membrana de PVDF, y se evaluó la efectividad de la transferencia mediante la tinción de los geles con azul de Coomassie.

El azul de Coomassie es un colorante ampliamente usado para teñir proteínas en geles de acrilamida y la ausencia de bandas proteicas nos indica la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Para teñir los geles se usó una disolución de 0.1% azul de Coomassie, 40% metanol y 10% ácido acético en H₂O destilada, durante 2 horas a temperatura ambiente en constante agitación suave. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con H₂O destilada y varios lavados con una disolución acuosa de 25% de metanol y 10% de ácido acético, hasta que se eliminó el exceso de colorante.

4.3.2. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas

Posteriormente, se lavaron las membranas de PVDF con tampón Tris salino (TBS-T) (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.9%, 0.05% TweenTM 20, pH 8). Después, con el fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos, se mantuvieron las membranas en agitación durante 1h a temperatura ambiente en una solución que contenía 5% BSA en TBS-T. Seguidamente se sustituyó la solución de bloqueo y se incubaron las membranas con otra solución que contenía el anticuerpo primario a la dilución adecuada (Anexo I), en constante agitación suave durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las membranas tres veces durante 10 min cada una con TBS-T en agitación y seguidamente, se incubaron en una disolución en TBS-T del anticuerpo secundario anti-IgG específico (Anexo I) conjugado con peroxidasa (HRP), durante 60 min en agitación suave a temperatura ambiente. Tras este periodo, las membranas se volvieron a lavar en TBS-T tres veces durante 10 min.

Para el revelado del inmunomarcaje, se escogió el método por quimioluminiscencia. Este método se basa en el uso de reactivos a base de luminol que se oxidan con la presencia de HRP conjugada al anticuerpo secundario, originando un estado excitado del luminol en el cual emite luz. De esta forma, las bandas proteicas se revelaron con un kit de reactivos de detección de proteínas AmershamTM ECLTM (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) según las indicaciones de la casa comercial, durante 1 minuto a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia resultante se detectó utilizando el lector de quimioluminiscencia Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA).

4.4. Cuantificación y análisis estadístico

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el software ImageJ. La densidad de las bandas inmunorreactivas correspondientes a las muestras de SNpc de EP se comparó con la densidad de las bandas de las muestras de SNpc del hemisferio control y se realizaron un total de 4-6 experimentos independientes para cada muestra. Los datos densiométricos se presentaron como porcentajes respecto a los controles, y las variables continuas se presentaron como medias y errores estándar de la media (SEM). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las medias entre las muestras de EP y de control. Finalmente, se utilizaron los valores de p para demostrar las diferencias entre los grupos, donde $p < 0,05$ significó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias.

5. Microscopía electrónica de transmisión

5.1. Análisis ultraestructural

5.1.1. Procesamiento de muestras

Se seleccionaron siete secciones coronales de encéfalo de animales distintos, perfundidos según se ha detallado para un estudio ultraestructural, y se realizó la microdissección de las porciones de SNpc de cada hemisferio (control y EP) con ayuda de bisturí y lupa (Motic SMZ-168, Motic, Hong-Kong, China). Estas se cortaron en bloques de 1 mm³ aproximadamente y se introdujeron en una solución fijadora de 2% de GA en tampón cacodilato sódico 0.2 M con 0.05% de CaCl₂ a pH 7.4 durante 2 h a 4 °C.

Posteriormente se lavaron en tampón cacodilato (0.1 M, pH 7.4) 3 veces durante 10 min y se post-fijaron en una mezcla 1:1 de ferrocianuro potásico 3% y tetróxido de osmio 2% en agua bidestilada a 4 °C durante toda la noche. Estas soluciones no solo actúan como post-fijadores, si no que estos metales electrodenso se unen a estructuras como las membranas celulares, aportando contraste que facilitará la visualización de las muestras, y más concretamente del CG. Después las muestras se lavaron 3 veces con agua destilada durante 5 min, y se mantuvieron en tampón cacodilato a 4°C hasta su posterior procesamiento.

A continuación, las muestras se lavaron 2 veces durante 5 min con agua destilada. Seguidamente, se empleó una solución de ácido tánico al 0.15% en tampón cacodilato (0.2 M, pH 7.4) durante 1 min a temperatura ambiente. El ácido tánico es un compuesto que actúa como mordiente, realzando el contraste de las muestras. Tras este paso, se volvieron a lavar las muestras con agua bidestilada 3 veces durante 5 min cada una. Posteriormente, se realizó un primer contraste aplicando una solución de acetato de uranilo al 2% en agua bidestilada durante 2 h en oscuridad. Después, se lavaron las muestras en agua bidestilada 3 veces durante 5 min cada una y se procedió a deshidratarlas mediante tratamiento con etanol, siguiendo un gradiente creciente de concentración. Se trataron las muestras durante 5 min a 4°C con soluciones sucesivas de etanol al 50%, 75%, 90%, 95% y 3 veces al 100%.

Las muestras deshidratadas se infiltraron con Epon 812, una resina epoxialifática de naturaleza hidrofóbica de una relativa baja viscosidad a temperatura ambiente, que una vez polimeriza a una temperatura de 60 °C, se convierte en un medio de inclusión idóneo para obtener secciones de grosor nanométrico para la observación de muestras mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Para su preparación, se parte de cuatro componentes incluidos en kit comercial, Epon 812 (resina), DDSA y MNA (endurecedores) y BDMA (acelerador de la polimerización). Las muestras se depositaron en una mezcla de Epon y etanol 1:1 v/v durante 1 h, y en la misma mezcla en proporción 2:1 v/v durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se incluyeron en bloques de Epon puro recién preparado y se dejaron polimerizar en estufa a 60 °C durante 48 h. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

5.1.2. Obtención y tinción de secciones semifinas y ultrafinas

Se realizaron secciones semifinas de 1µm de grosor con ultramicrotomo (Ultracut Reichert Jung) con cuchilla de vidrio para confirmar la región de interés de estudio de la SNpc. Estas secciones se recogieron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina 0.5% en tampón cacodilato 0.2 M durante 1 min a temperatura ambiente. Después se realizó un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se observaron bajo microscopio Leica DMD108 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Una vez localizadas las zonas de interés, se retallaron las muestras manualmente con ayuda de un bisturí, delimitando una región trapezoidal de 1 mm² de área, se colocaron en el ultramicrotomo (Ultracut, Reichert Jung) y se obtuvieron secciones ultrafinas de 40-60 nm utilizando una cuchilla de diamante (Diatome US, Quakertown, Pensilvania, USA). Estas secciones se colocaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Figura 16). Estos metales pesados aumentan la electrodensidad en las zonas donde se depositan, aportando así contraste a la preparación. El acetato de uranilo tiñe principalmente estructuras que contienen ácidos nucleicos, mientras que el citrato de plomo tiñe estructuras membranosas. Para ello, se preparó una disolución de acetato de uranilo al 2% (p/v) en agua bidestilada, se filtró con filtro de 0.22 µm y se mantuvo a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

El citrato de plomo se preparó disolviendo 3.52 gr de citrato de sodio y 2.66 gr de nitrato de plomo en 60 ml de agua bidestilada en agitación suave durante 30 min, posteriormente se añadieron 16 ml de NaOH 1N y se enrasó hasta 100 ml con agua bidestilada, esta solución se mantuvo en agitación suave hasta que la solución se volvió completamente transparente. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y la solución obtenida se almacenó a 4°C hasta su uso.

Las rejillas de cobre con las secciones ultrafinas fueron colocadas sobre gotas de aproximadamente 20 µl de acetato de uranilo al 2% filtrado, con la cara mate de la rejilla, que es donde se encontraban las secciones de las muestras en contacto con las gotas, durante 8 min. Se lavaron con agua bidestilada dos veces de la misma forma y se dejaron secar al aire. A continuación, se pusieron las rejillas en contacto con gotas de citrato de plomo durante 4 min.

Debido a que el citrato de plomo en presencia de CO₂ reacciona formando carbonato de plomo, el cual produce precipitados en las muestras, este segundo contraste se realizó en presencia de perlas de NaOH que se distribuyeron sobre Parafilm®, en el que se colocaron las gotas del agente de tinción, contribuyendo de este modo a la eliminación del CO₂ ambiental. Posteriormente, se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar al aire.

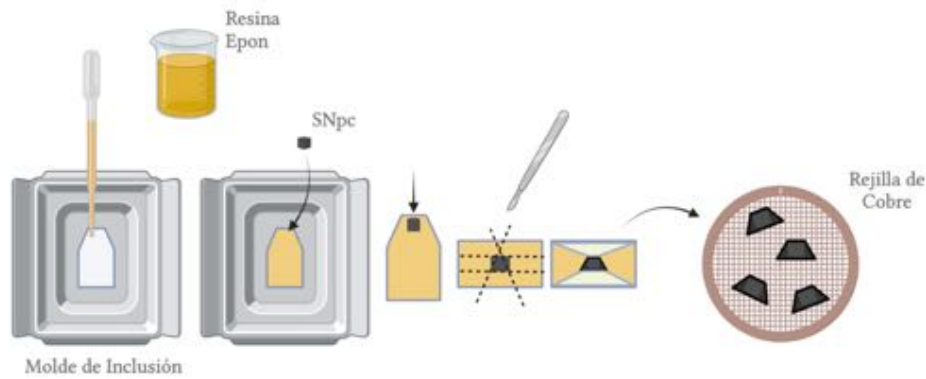


Figura 16. Ilustración del procedimiento de inclusión de muestras post-fijadas y deshidratadas de SNpc en moldes para la obtención de bloques incluidos en resina Epon 812. Una vez han polimerizado los bloques de resina, se talla con ayuda de un bisturí la muestra, formando una pirámide con la región de interés. Finalmente se obtienen cortes ultrafinos y se colocan en rejillas de cobre. Figura de elaboración propia realizada con Biorender.

5.1.3. Estudio ultraestructural y análisis estadístico de imágenes

Las rejillas se observaron bajo microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1011 operado a 80 kV de voltaje de aceleración, con cámara AMT XR80 con configuración Mid-mount. La evaluación de los cambios ultraestructurales en el CG de las neuronas dopaminérgicas de muestras de SNpc se realizó utilizando el software ImageJ, de esta forma se midieron longitud media de los dictiosomas, dilatación de las cisternas, distancia de los dictiosomas a la membrana nuclear y distancia entre las cisternas.

Los datos obtenidos se convirtieron a *.xls y se analizaron con SPSS versión 26 (IBM: Nueva York, EE. UU.). Se aplicaron las pruebas T de Student y U de Mann-Whitney para comparar las medias entre los datos de muestras control y EP, y se utilizaron los valores de p para demostrar las diferencias entre los grupos, donde $p < 0,05$ significó una diferencia significativa entre las medias. Los gráficos se obtuvieron con Microsoft Excel.

5.2. Crio-microscopía electrónica

5.2.1. Procesamiento de muestras

Se seleccionaron diez secciones coronales de encéfalo de animales distintos, perfundidos según se ha detallado para un estudio ultraestructural e

inmunocitoquímico, y se realizó la microdissección de las porciones de SNpc de cada hemisferio (control y EP) con ayuda de bisturí y lupa (Motic SMZ-168, Motic, Hong-Kong, China).

Se seccionaron bloques de 1 mm³ aproximadamente y se fijaron en una mezcla de PFA 2% y GA 0.2% en tampón fosfato (PB) 0.1 M a pH 7.4 durante 2 h a 4 °C. Posteriormente, las muestras ya fijadas se lavaron tres veces con PBS para eliminar cualquier resto de fijador. Como un primer paso de bloqueo, se lavaron las muestras tres veces con una solución de glicina 0.02 M en PBS durante 5 min por lavado. Después, las muestras se incluyeron en gelatina al 10% en tampón PB, previamente calentada en estufa a 37 °C para mantenerla líquida. La inclusión en gelatina se realizó colocando una gota de gelatina con la SNpc sobre dos láminas de Parafilm® en hielo durante 30 min, de esta forma la gelatina alcanza la temperatura de 4 °C y solidifica. Tras este periodo, con ayuda de lupa y bisturí, se seccionaron fragmentos de 1 mm³ aproximadamente y se introdujeron en una solución de sacarosa 2.3 M durante 12 h a 4 °C para criopreservar las muestras.

Los bloques obtenidos se montaron sobre portamuestras especiales para crioultramicrotomía, estos se lavaron varias veces con agua destilada y por último con acetona para evitar la humedad y la formación de hielo. Los portamuestras tienen una superficie redonda rugosa (mejora la adherencia de la muestra) donde con ayuda de una pinza, se dispuso una pequeña gota de sacarosa 2.3 M y sobre esta se colocó el bloque de muestra. Inmediatamente después de montar, se congeló la muestra junto con el portamuestras en criotubos en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta que se realizaron las criosecciones con crioultramicrotomo.

5.2.2. Crioultramicrotomía

Las muestras se cortaron en un crioultramicrotomo Leica Ultracut T/FCS a -120 °C con cuchilla de diamante (Druker). Inicialmente se talló cada bloque formando un cubo y se obtuvieron secciones semifinas de 350 nm de grosor. Estos cortes se recogieron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina 0.5% en tampón cacodilato 2 M durante 1 min y se lavaron con agua destilada para posteriormente localizar las zonas de interés bajo microscopio Leica DM108. Una vez localizadas las zonas de interés, se obtuvieron cortes ultrafinos de 50 nm de grosor. Los criocortes ultrafinos se recogieron con un asa impregnada de una mezcla 1:1 de metil-celulosa al

2% y sacarosa 2.3 M (siguiendo el procedimiento descrito por Liou et al., 1996), después se depositaron en rejillas de cobre recubiertas de una película de formvar (resina polivinílica) y carbón (Carbon Coater CC7650). Esta película en las rejillas funciona como un medio de soporte para los cortes ultrafinos, ofreciendo estabilidad a la muestra, sobre todo durante la exposición al haz de electrones para su observación en MET.

5.2.3. Crioimmunocitoquímica

Las muestras se lavaron e incubaron con los reactivos correspondientes, apoyando la superficie mate de las rejillas con las crio secciones, sobre gotas sucesivas en Parafilm®. Se lavaron 3 veces en gotas de glicina 0.02M en PBS durante 5 min. Después, se realizó un lavado con BSA 0.1% en PBS durante 5 min para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo. Posteriormente las rejillas se incubaron con el anticuerpo primario (Anexo I) diluido en tampón BSA acetilada 0.1% y glicina 0.02 M en PBS durante 30 min. Tras esta incubación, se lavaron 3 veces durante 5 min en PBS y se realizó otro lavado en BSA 0.1% en PBS durante 5 min.

Si los anticuerpos primarios eran policlonales (obtenidos de conejo), se incubaron las muestras en proteína A-oro (10 nm) durante 20 min. Sin embargo, si los anticuerpos primarios eran de origen monoclonal (obtenidos de ratón), debido a que la proteína A-oro se encuentra conjugada con anticuerpo anti-conejo, se incubaron las muestras con anticuerpos secundarios de conejo anti-ratón durante 30 min, repitiéndose después en este caso los lavados con PBS y BSA 0.1% en PBS. Posteriormente se realizó la incubación con la proteína A-oro durante 20 min. En cualquiera de los dos casos, tras finalizar la incubación con la proteína A-oro, las muestras se lavaron 4 veces durante 5 min en PBS, se fijaron con GA 1% durante 5 min y se lavaron con agua destilada 5 veces durante 5 min.

Las rejillas con las crio secciones fueron contrastadas con acetato de uranilo al 4% en agua bidestilada a pH 7 filtrado durante 5 min, realizando un lavado rápido con agua destilada y posteriormente, se protegieron con un lavado de 5 min en una mezcla 1:9 de acetato de uranilo al 4% y metil-celulosa a 4 °C (siguiendo el procedimiento descrito por Martínez-Menárguez et al., 1999) Finalmente, las rejillas se recogieron, se eliminó el exceso de mezcla suavemente con papel Whatman® y se dejaron secar 15 min.

V

RESULTADOS

IV. Resultados

Capítulo 1: Análisis morfológico y molecular de la sustancia negra pars compacta

1.1. Evaluación del efecto inducido por la neurotoxina 6-hidroxidopamina

El principal sello histopatológico de la EP es la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Las neuronas dopaminérgicas de los roedores, a diferencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en el humano, no acumulan neuromelanina (Carballo-Carbajal et al., 2019), como producto intracelular de la oxidación de catecolaminas, lo que no permite identificar fácilmente este tipo de neuronas. Por ello, para valorar los efectos de la lesión dopaminérgica generada en uno de los dos hemisferios cerebrales por la inyección estereotáxica de 6-OHDA en la SNpc de nuestro modelo animal, se identificaron las neuronas dopaminérgicas mediante el inmunomarcaje con la enzima TH. La elección del inmunomarcaje de la TH para la detección de neuronas dopaminérgicas en lugar de la dopamina, se debe a que esta enzima es exclusiva de este tipo de neuronas, de esta forma se detectan únicamente neuronas que contienen dopamina endógena y no como consecuencia de la endocitosis (Rausch et al., 2022; Tedjakumala et al., 2017).

La observación de las secciones histológicas de SNpc mediante microscopía de fluorescencia (apartado 3 de Material y Métodos), reveló una menor inmunoreactividad para TH en el hemisferio lesionado con 6-OHDA (Figura 17 a, b). El análisis cuantitativo del número de neuronas dopaminérgicas inmunomarcadas en la SNpc, confirmó una reducción estadísticamente significativa del 39% en el número de neuronas del hemisferio lesionado (EP) con respecto al hemisferio control ($p < 0.05$) (Figura 17 c). Dentro de este análisis cuantitativo de la lesión dopaminérgica producida por la microinyección unilateral de 6-OHDA, se realizó una comparativa de género para estudiar posibles diferencias entre las muestras de SNpc de animales machos y hembras. Inicialmente, no se detectaron diferencias en el análisis cualitativo de la tinción de neuronas dopaminérgicas inmunomarcadas por TH entre los grupos de animales.

Además, el análisis cuantitativo del número de neuronas dopaminérgicas inmunomarcadas con TH, reveló que este valor se veía disminuido en un 35% en las

muestras de SNpc de animales machos, del modelo inducido por 6-OHDA con respecto a las muestras control, mientras que en las muestras de SNpc de las hembras, la disminución detectada fue de un 43%. Posteriormente, el análisis estadístico mediante comparación de medias por la prueba U de Mann-Whitney, no reveló diferencias estadísticamente significativas en la lesión dopaminérgica entre géneros ($p>0.05$).

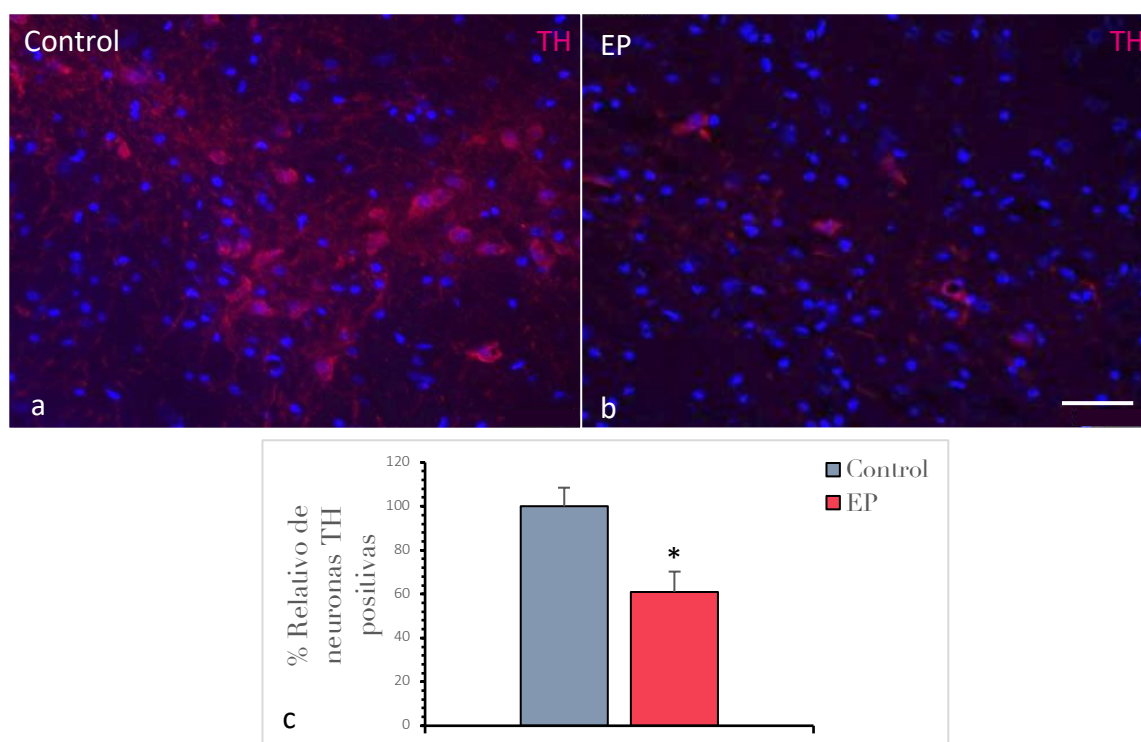


Figura 17. Imágenes representativas de la distribución de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP) por inmunofluorescencia de la proteína TH (rojo). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). Se aprecia la disminución en el número de neuronas TH positivas del hemisferio EP (b) con respecto al hemisferio control (a). El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia total por ImageJ (c) confirma una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas en el hemisferio EP con respecto al control. Barra 50 μ m.

1.2. Reactividad astrocitaria en la sustancia negra pars compacta

La reactividad astrocitaria es considerada como un indicador de disfunción neuronal y neurodegeneración (Muñoz-Ballester y Robel, 2023). Esta proliferación de células astrocitarias tiene como resultado un proceso de neuroinflamación, siendo esta, una herramienta para eliminar moléculas patogénicas mediante la liberación de citoquinas y factores neurotróficos, que a su vez pueden resultar dañinas para las células cercanas (Walsh et al., 2011). Análisis en cerebros post-mortem de pacientes de EP, han revelado una presencia elevada de microglía y factores neuroinflamatorios que indican la presencia de neuroinflamación en la patología (Walsh et al., 2011). En esta parte del estudio, se analizó la activación de células gliales, mediante el inmunomarcaje de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP). Esta proteína está presente en los filamentos intermedios de células gliales como los astrocitos, y su sobreexpresión está vinculada a alteraciones en el sistema nervioso, indicando una activación de las células gliales (Muñoz-Ballester y Robel, 2023).

A diferencia del resultado observado en el número de neuronas dopaminérgicas, el análisis de la distribución de la GFAP en secciones de SNpc mediante microscopía confocal, indicó un aumento del inmunomarcaje de células GFAP positivas en el hemisferio EP con respecto al hemisferio control (Figura 18 a,b). Mientras que la intensidad de fluorescencia de células gliales parecía ser escasa en el hemisferio control, en el hemisferio inyectado con la neurotoxina 6-OHDA, se observaron un mayor número de cuerpos celulares y prolongaciones inmunomarcadas próximos a las neuronas dopaminérgicas supervivientes. Esta observación cualitativa se confirmó mediante el análisis cuantitativo de la expresión de fluorescencia total correspondiente al inmunomarcaje de la proteína GFAP, confirmándose un aumento del 40% en la inmunodetección de GFAP en el hemisferio lesionado con 6-OHDA con respecto al hemisferio control (Figura 18 c). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa mediante la prueba de t de Student ($p < 0.05$).

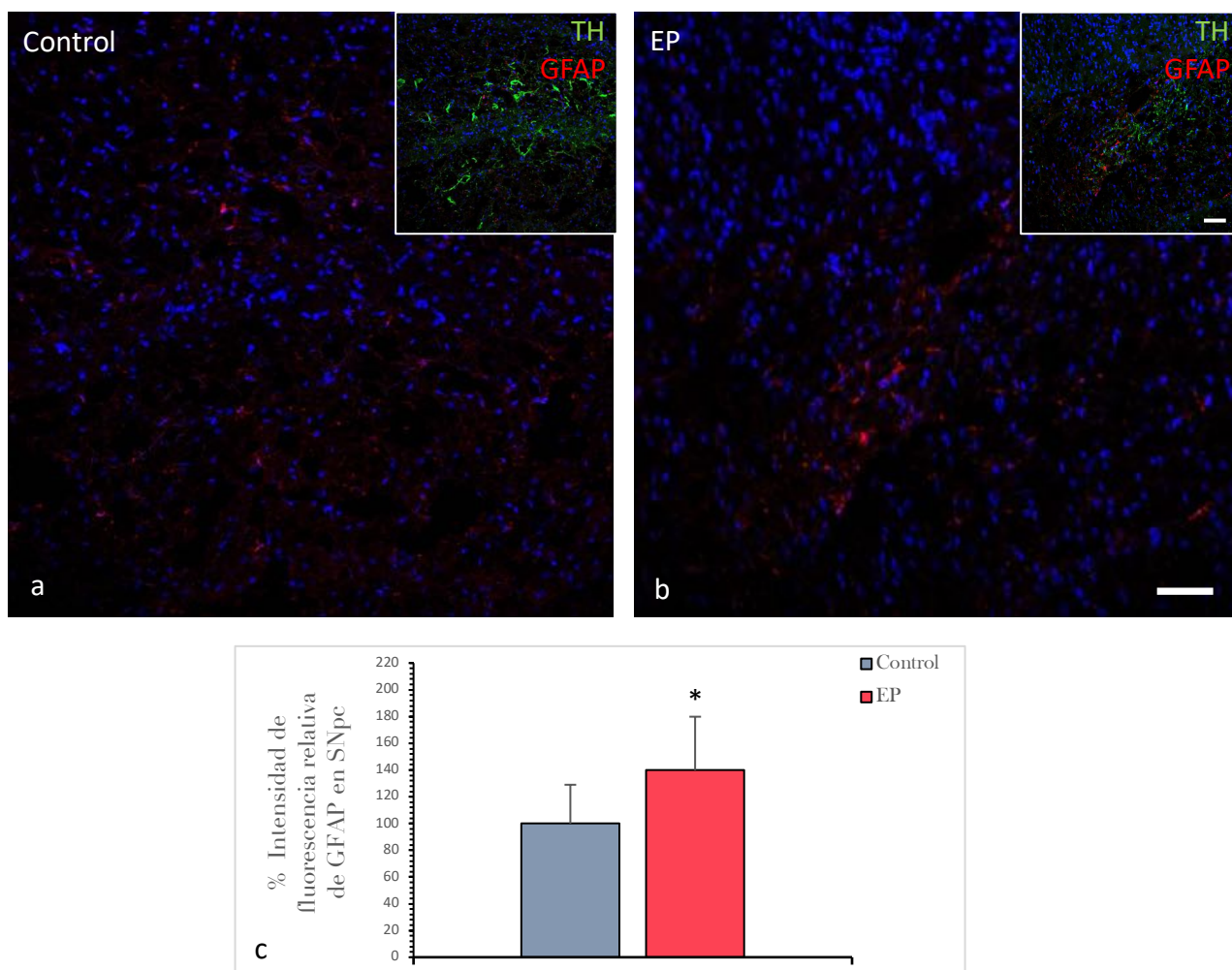


Figura 18. Imágenes representativas de la distribución de células gliales de la SNpc en el hemisferio control (a) y en el hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP) (b) detectadas por inmunofluorescencia de la proteína GFAP (rojo). El inmunomarcaje de GFAP (rojo) indica un aumento en la tinción de células GFAP en el hemisferio lesionado (EP) con respecto al hemisferio control. En la esquina superior derecha se muestran las neuronas dopaminérgicas inmunomarcadas con TH (verde), los núcleos marcados con DAPI (azul) y la proteína GFAP (rojo). El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia total (c), mediante análisis de imagen por ImageJ, muestra un aumento estadísticamente significativo en la intensidad de fluorescencia observada en el hemisferio EP con respecto al control. Barra 50 μ m.

1.3. Análisis de la distribución de la proteína α -sinucleína tras la lesión dopaminérgica

Para identificar los posibles cambios en la distribución de la α -sinucleína, se realizó su inmunodetección en neuronas dopaminérgicas de la SNpc. En el estudio morfológico mediante microscopía confocal del hemisferio control, se observó una distribución difusa de la proteína en el citoplasma (Figura 19 a). Sin embargo, en la SNpc lesionada (EP), el inmunomarcaje de la proteína α -sinucleína cambió a un marcate puntiforme claro y homogéneo, con numerosos puntos bien definidos de fluorescencia, distribuidos por el citoplasma celular, evidenciándose un cambio de organización de la α -sinucleína (Figura 19 b). Por otra parte, no se identificaron cuerpos de Lewy en ningún caso, de acuerdo con lo descrito en estudios previos en un modelo similar de EP (Blesa y Przedborski, 2014; Tieu, 2011; Vercammen et al., 2006). Si bien no se identificaron cuerpos de Lewy, este cambio observado en la distribución de la fluorescencia podría deberse a la creación de formas oligoméricas y prefibrilares de α -sinucleína, agregados iniciales solubles que se transforman en parcialmente insolubles, en las neuronas dopaminérgicas supervivientes de la inyección de 6-OHDA, cuya presencia también se ha detectado en este modelo (Hadi et al., 2021).

Posteriormente, se analizó la intensidad de fluorescencia total del inmunomarcaje de la α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ambos hemisferios. Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los hemisferios control y lesionado. No obstante, sí se observó una tendencia a la disminución en la intensidad de fluorescencia media en el hemisferio lesionado, siendo un 14% menor con respecto al hemisferio control (Figura 19 c), pudiendo deberse al cambio de distribución observado de la α -sinucleína.

Este análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia apoya la observación cualitativa de que el cambio en el patrón de fluorescencia observado para la proteína α -sinucleína en el hemisferio lesionado de nuestro modelo de rata hemiparkinsoniana debe ser causado por un cambio de organización de la proteína en las neuronas dopaminérgicas supervivientes en la SNpc, y no por un aumento en el nivel de expresión de la proteína.

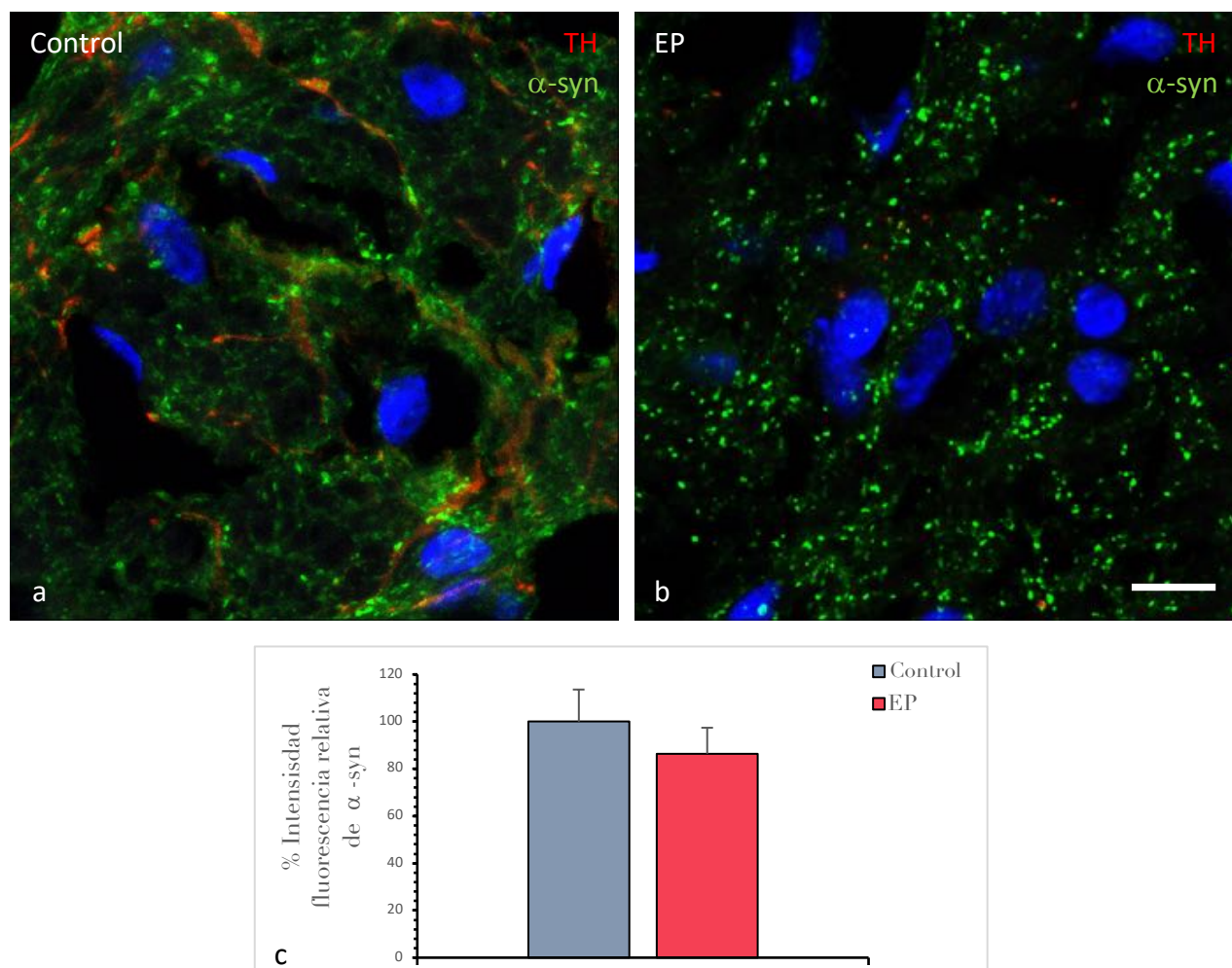


Figura 19. Imágenes representativas de la distribución de la proteína α -sinucleína (α -syn) (verde) en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP) por inmunofluorescencia. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). En el hemisferio control (a), la α -sinucleína (verde) muestra un patrón difuso con escaso punteado en el citoplasma a diferencia del hemisferio EP (b) donde el patrón de marcaje se concentra y se vuelve puntiforme, indicando un posible cambio en la organización de la proteína. No se detectan cuerpos de Lewy. El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia en imágenes de ambos hemisferios cerebrales (c) no muestra diferencias estadísticamente significativas entre el hemisferio control y el hemisferio lesionado. Barra 10 μ m.

1.4. Fragmentación del complejo de Golgi en las neuronas dopaminérgicas

Con la finalidad de realizar un análisis morfológico de los posibles cambios en la citoarquitectura del CG, en las neuronas dopaminérgicas de las secciones de SNpc tras la lesión dopaminérgica, realizamos un estudio mediante inmunofluorescencia con doble marcaje, utilizando un anticuerpo frente a la golgina GM130, para identificar el CG, y un segundo anticuerpo frente a la proteína TH, para identificar las neuronas dopaminérgicas. La GM130 fue la primera proteína estructural de la matriz del Golgi descrita en la región cis-Golgi, y es uno de los marcadores más habituales en el estudio de la estructura del CG (Van Bommel et al., 2023). La función principal de la GM130 es el mantenimiento de la citoarquitectura del CG y la fusión de membranas y vesículas de transporte entre el RE-CG, a través de la formación complejos con otras proteínas estructurales y de mantenimiento como GRASP65, p115 y giantin, además de la interacción con proteínas reguladoras del tráfico intracelular como la GTP-asa Rab1a (Huang et al., 2021).

El análisis morfológico de la estructura del CG en neuronas dopaminérgicas del hemisferio control, mostró la estructura característica del CG en este tipo celular, consistiendo en una conformación cercana al núcleo con una forma semilunar y más extendida o ramificada que en otros tipos celulares (Figura 20 a). Sin embargo, en el hemisferio lesionado con la neurotoxina 6-OHDA, la citoarquitectura del CG de las neuronas dopaminérgicas se mostraba alterada, observándose un patrón desestructurado del orgánulo y disperso por el citoplasma celular (Figura 20 b), indicando una posible fragmentación del CG en estas neuronas.

Para confirmar este resultado, se realizó una reconstrucción 3D del CG de las imágenes tomadas mediante microscopía confocal (Figura 21 a, b), lo que permitió un análisis más detallado de su estructura. En este análisis, se estudió la estructura del CG en distintos planos, observándose en neuronas del hemisferio control, numerosas uniones entre las cisternas del CG (Figura 21 a). Mientras que en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado con 6-OHDA, se distinguían pequeños dictiosomas desconectados en el citoplasma (Figura 21 b), confirmándose de esta forma, la fragmentación del CG en estas neuronas (material complementario en Anexo III: videos 1 y 2 ilustrativos de la reconstrucción 3D del CG).

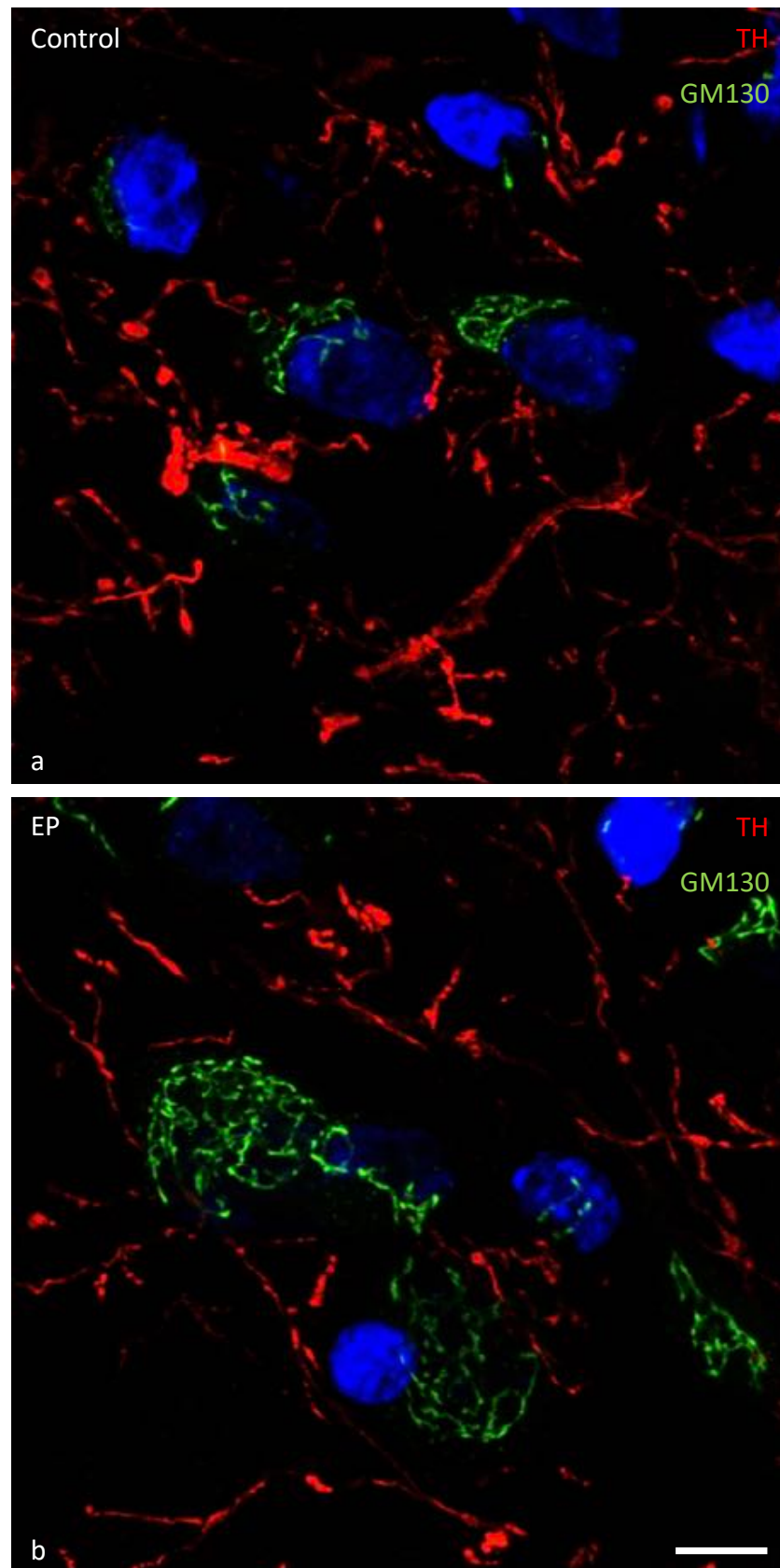


Figura 20. Imagen representativa de la citoarquitectura del CG, inmunomarcado con la proteína GM130 (verde), de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). El CG presenta una organización perinuclear, compacta y ramificada en neuronas dopaminérgicas del hemisferio control (a), mientras que en el hemisferio EP (b), se observa el CG perinuclear, aunque más disperso, ocupando una mayor área del citoplasma. Barra 10 μ m.

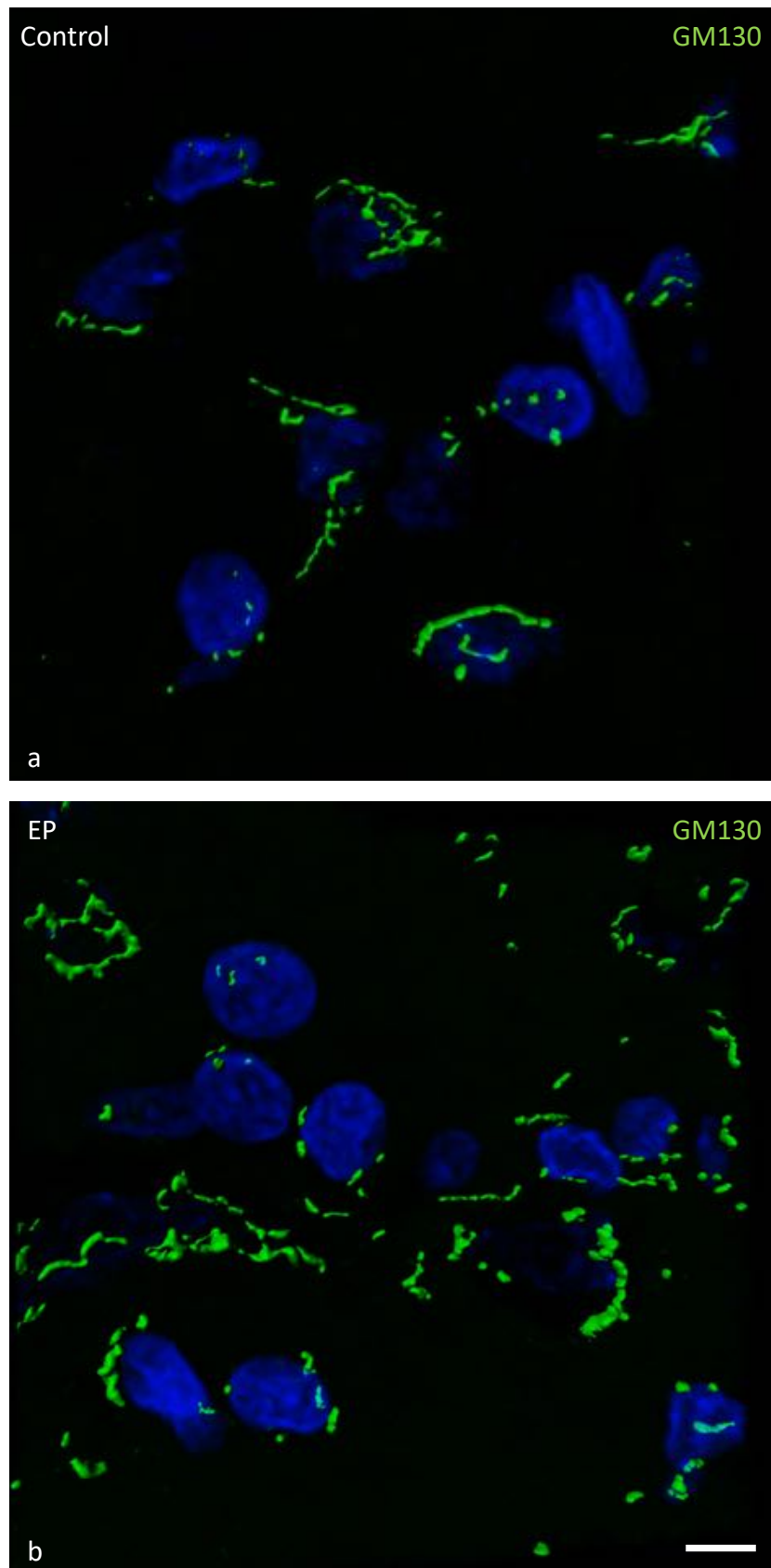


Figura 21. Imágenes representativas de la reconstrucción 3D del CG, realizada con el software Imaris, de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP), inmunomarcado con GM130 (verde). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). La reconstrucción 3D de la citoarquitectura del CG de las neuronas del hemisferio control (a) confirma la organización perinuclear y compacta del CG a diferencia del CG de las neuronas dopaminérgicas en el hemisferio EP (b) que muestran la dispersión de las cisternas del CG. Barra 10 μm .

La cuantificación del porcentaje de neuronas dopaminérgicas con el CG fragmentado confirmó que el 70% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en el hemisferio tratado con la neurotoxina 6-OHDA presentaba el CG fragmentado, a diferencia de solo un 15% en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio control. Este resultado fue estadísticamente significativo (t de Student, $p < 0.05$).

Para reflejar de forma cuantitativa el resultado de este estudio morfológico, se realizó un análisis de imagen de la distribución de fluorescencia (Figura 22 a-e), con el que se estudió la dispersión de la señal de fluorescencia resultante del patrón de inmunofluorescencia de la proteína GM130. Para ello, se delimitaron 5 zonas concéntricas alrededor del núcleo de cada neurona (Figura 22 c, d), clasificándose según su lejanía al núcleo del 1 (más cercana) al 5 (más alejada), y se analizó la intensidad de fluorescencia en cada una de ellas (Figura 22e). El análisis mostró que en el hemisferio control (Figura 22 c), la localización de la proteína GM130 disminuía en áreas más lejanas al núcleo debido a la citoarquitectura y conformación perinuclear y compacta del CG, mientras que en neuronas dopaminérgicas del hemisferio EP (Figura 22 d), el patrón de fluorescencia del CG se distribuía homogéneamente en todas las áreas, confirmando la distribución fragmentada y la dispersión de este orgánulo en el citoplasma como consecuencia de su desestructuración.

Finalmente, se compararon las medias de las intensidades relativas mediante la prueba de t de Student, y se confirmaron diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la fluorescencia en las zonas más alejadas al núcleo (3-5) de las neuronas dopaminérgicas del hemisferio control y del hemisferio lesionado.

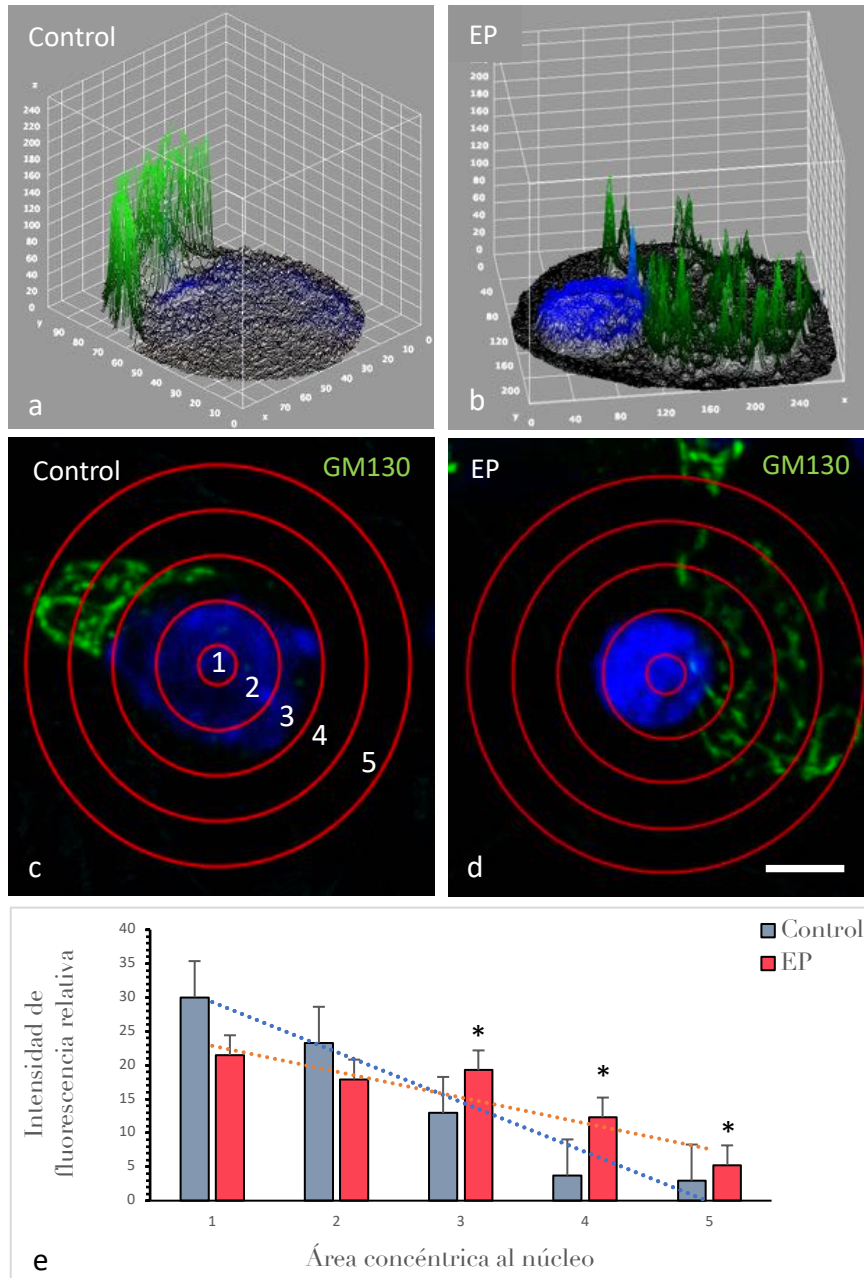


Figura 22. Estudio cuantitativo de la citoarquitectura del CG mediante análisis de imagen con ImageJ. (a, b) Representación gráfica de la distribución de fluorescencia en una célula individual en el eje XYZ. En las neuronas del hemisferio control, se observa una distribución de la GM130 (verde) muy próxima al núcleo (DAPI) (a). En neuronas del hemisferio EP, la señal de fluorescencia se dispersa en el citoplasma (b). (c, d) Imagen representativa del diseño de anillos concéntricos para el análisis de la distribución de fluorescencia en dos células ejemplo. (e) El análisis de la intensidad de fluorescencia en el área de cada anillo, revela diferencias estadísticamente significativas en las áreas más lejanas al núcleo entre neuronas dopaminérgicas del hemisferio control y las neuronas dopaminérgicas del hemisferio tratado (3-5), indicando que en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado existe una dispersión de la fluorescencia en el citoplasma. Los valores en el histograma se representan como valores arbitrarios de intensidad de fluorescencia, obtenidos mediante ImageJ. Barra 5 μm .

1.5. Análisis de la distribución de proteínas involucradas en la citoarquitectura del complejo de Golgi y en el tráfico intracelular de membranas

Tras observar los cambios descritos en la citoarquitectura del CG de las neuronas dopaminérgicas en el modelo experimental de la EP, nos planteamos realizar un análisis de la distribución de proteínas esenciales en el mantenimiento de su estructura y en el tráfico intracelular de membranas. La elección de proteínas involucradas en la regulación del transporte intracelular para analizar en este estudio se realizó en base a los resultados obtenidos en estudios anteriores de nuestro grupo, utilizando un modelo celular de la EP y muestras humana de SN, donde describimos alteraciones en proteínas vinculadas directamente a la fragmentación del CG observada (Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021).

De las proteínas analizadas, fueron especialmente relevantes los resultados obtenidos de la inmunodetección de SNARE syntaxina-5 y la GTP-asa Rab1a.

1.5.1. Syntaxina-5

La syntaxina-5 es una proteína SNARE implicada en el transporte y unión de vesículas COPII del RE al ERGIC y en el transporte intra-Golgi de vesículas COPI, formando complejos con otras SNARE como GosR1, GosR2, Bet1 y Sec22b y con el complejo p115-GM130 (Linders et al., 2019). En mamíferos, tanto la sobreexpresión como la depleción de syntaxina-5 se ha vinculado con la fragmentación del CG, defectos en el tráfico lisosomal, la glicosilación y la autofagia (D'Souza et al., 2023; Linders et al., 2019). Esta SNARE también se ha vinculado con la EP en estudios previos en los que se ha demostrado la unión de la α -sinucleína con el complejo syntaxina-5-GosR2, produciendo la interrupción del transporte RE-CG (Thayanidhi et al., 2010).

Tras el inmunomarcaje de la proteína syntaxina-5 de la familia de las SNAREs, se observó una tinción intensa y difusa en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control, así como en la SNpc del hemisferio lesionado, aunque en este caso, las células mostraban una clara disminución en la intensidad de la inmunofluorescencia en comparación con las células del hemisferio control (Figura 23 a-f).

Este resultado se confirmó con un análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia, que mostró una reducción estadísticamente significativa (U de Mann-Whitney, $p < 0.05$), del 46% en el inmunomarcaje para la proteína syntaxina-5 en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado respecto a las del hemisferio control (Figura 23 g).

1.5.2. Rab1a GTPasa

La Rab1 es una proteína de la familia de las Rab GTPasas que posee dos isoformas, la Rab1a y la Rab1b. Ambas isoformas se encuentran en todos los tejidos, y se localiza anclada a la membrana del ERGIC y de la cara cis-Golgi, actuando en la primera etapa de la vía secretora, mediando el transporte de vesículas COPII entre el RE-CG. La Rab1 presente en las vesículas COPII se une a la golgina p115 en la cara cis-Golgi, este complejo Rab1-p115 a su vez interactúa con el complejo formado por GRASP65 y GM130 favoreciendo la unión de las vesículas del ERGIC al CG (Beard et al., 2005; Martínez-Menárguez et al., 2021).

Tras el inmunomarcaje de la Rab1a en las neuronas dopaminérgicas TH positivas del hemisferio control, se observó una tinción citosólica de muy poca intensidad de fluorescencia (Figura 24 a-c). Sin embargo, en el hemisferio tratado, se observaron pequeños agregados distribuidos por la región perinuclear del citoplasma, en las neuronas TH positivas (Figura 24 d-f). El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia para Rab1a, reveló un aumento del 35% en la intensidad media de fluorescencia en las neuronas TH positivas del hemisferio lesionado con respecto al hemisferio control. Esta diferencia de medias resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre hemisferios mediante la prueba de U de Mann-Whitney (Figura 24 g).

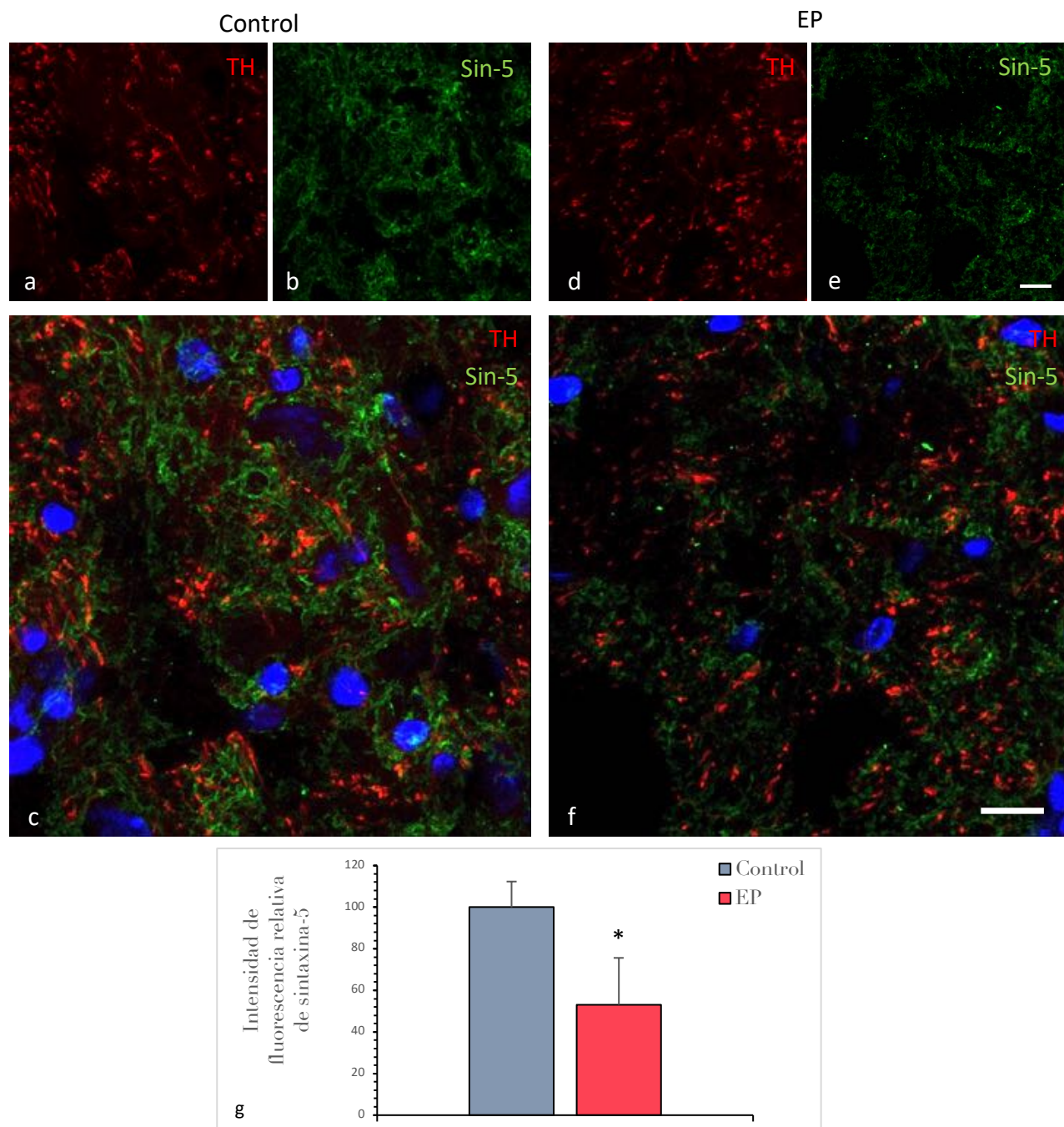


Figura 23. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de la proteína syntaxina-5 (sin-5) (verde) en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control (a-c) y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP) (d-f). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). El inmunomarcaje de la syntaxina-5 muestra una reducción en la intensidad del marcaje en neuronas del hemisferio lesionado (EP). (g) El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia, mediante análisis de imagen por ImageJ, confirma una disminución estadísticamente significativa con respecto al hemisferio control (valor arbitrario del 100%). Los valores representan el porcentaje ($\pm$ Error estándar de la media). Barra 10 μ m.

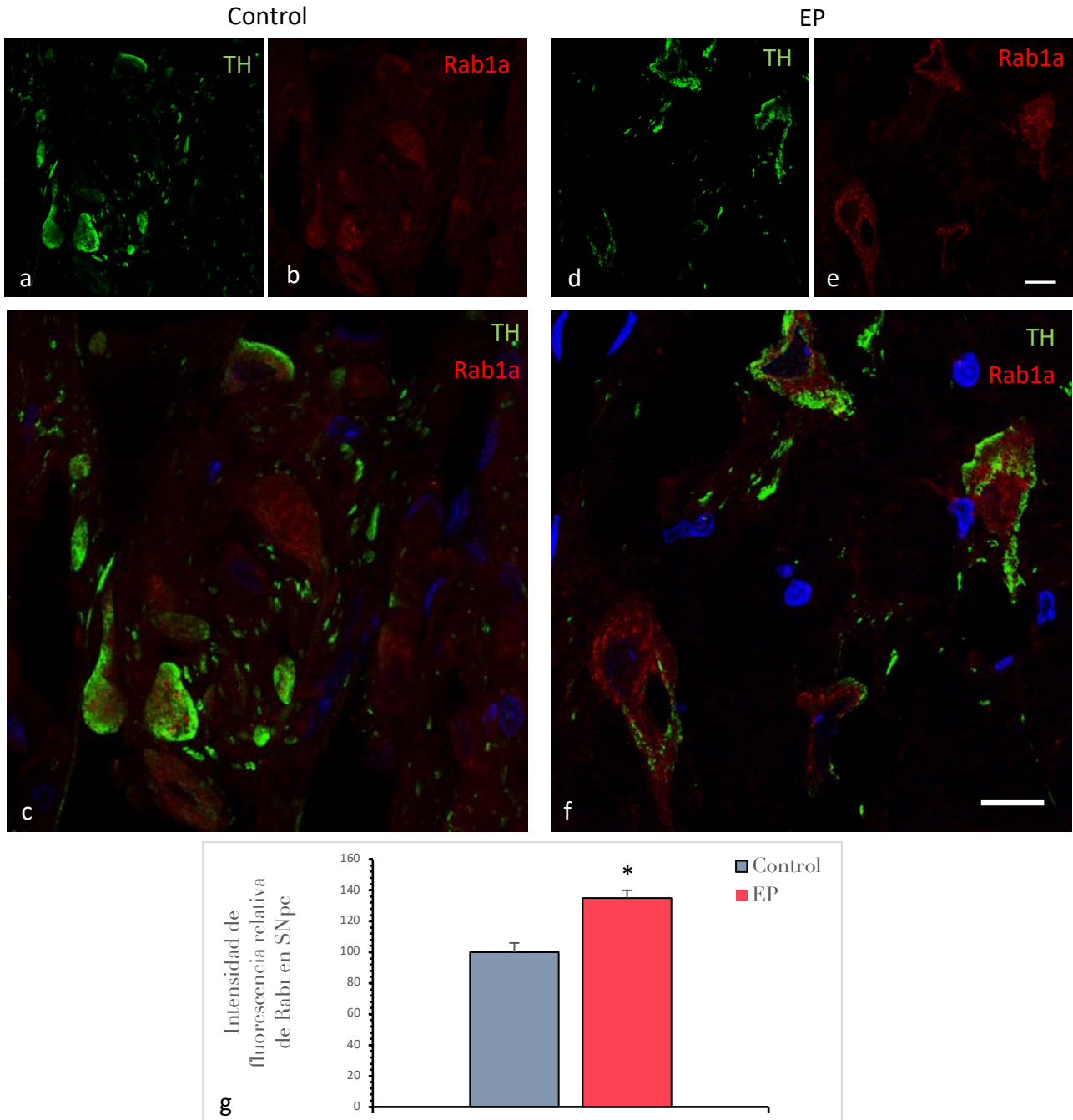


Figura 24. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de Rab1a (rojo) en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control (a-c) y del hemisferio lesionado con 6-OHDA (EP) (d-f). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (verde) y los núcleos marcados con DAPI (azul). El inmunomarcaje de Rab1a muestra un aumento de intensidad de fluorescencia en neuronas TH positivas del hemisferio tratado. (g) El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia por ImageJ confirma un aumento estadísticamente significativo de la intensidad de fluorescencia de las células dopaminérgicas en el hemisferio lesionado por 6-OHDA (EP) con respecto al hemisferio control (valor arbitrario del 100%). Los valores representan el porcentaje ($\pm$ Error estándar de la media). Barra 10 μ m.

1.5.3. Rab2a GTPasa, β -COP y GRASP65

Rab2a

La Rab2 es una GTPasa cuya estructura se encuentra altamente conservada y se localiza principalmente anclada al CG donde interacciona con la GM130 (Ding et al., 2019). Las funciones de la Rab2 se relacionan con el ensamblaje y maduración de precursores presinápticos en el TNG y la regulación de la autofagia (Ding et al., 2019; Götz et al., 2021). La autofagia, es un proceso que disminuye progresivamente con la edad debido a la regulación genética, contribuyendo a la pérdida de funcionalidad y viabilidad celular. Este hecho, es especialmente relevante en células postmitóticas como las neuronas, contribuyendo al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas.

El análisis mediante inmunofluorescencia de la Rab2a en neuronas dopaminérgicas de la SNpc mostró un marcaje citosólico, leve y difuso. No se apreciaron diferencias de distribución o intensidad del inmunomarcaje entre hemisferios control y el hemisferio lesionado (EP) en nuestro estudio (Figura 25 a, b).

β -COP

La proteína β -COP es una subunidad fundamental del complejo que forma el COPI. El COPI, es un complejo de siete unidades subproteicas (α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ), cuya función principal es mediar el transporte retrógrado de vesículas del cis-Golgi al RE (Viotti, 2016). Además, se ha descrito que este complejo actúa en el tráfico anterógrado y retrógrado de vesículas en el intra-Golgi y en el TGN, ejerciendo un papel fundamental en la regulación del tráfico intracelular (Xie et al., 2023). En concreto, la subunidad β -COP, se ha vinculado a la regulación de canales iónicos de potasio TWINK/TREK1 y TREK2 en astrocitos (Kim et al., 2022; Kim et al., 2023), y el transporte entre los endosomas y el TGN en levaduras (Xie et al., 2023). Para el estudio de la β -COP, se realizó una inmunodetección de la proteína en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, tanto en hemisferio control como en el hemisferio lesionado por 6-OHDA.

El inmunomarcaje de la β -COP en estas neuronas, mostró un patrón citosólico de distribución, sin observándose cambios de distribución ni de intensidad del marcate por inmunofluorescencia de la proteína entre las neuronas dopaminérgicas de ambos hemisferios (Figura 25 c, d).

GRASP65

Posteriormente, se analizó la distribución de la GRASP65. Como se ha mencionado anteriormente, la GRASP65 es una proteína anclada en la cara cis-Golgi, que está implicada en el ensamblaje y apilamiento de cisternas del CG, cuya función reside en permitir la unión lateral de las cisternas del CG. Esta proteína está estrechamente relacionada con GM130, con la que forma un complejo en el cis-Golgi, actuando como proteína de soporte en la estructura del CG. La degradación o pérdida de función de la GRASP65 se ha vinculado con la depleción de GM130 de las membranas del CG y con la fragmentación del CG o desestructuración de las membranas (Burd, 2021; Zhang y Seemann, 2021). Es por ello por lo que la integridad de la estructura del CG está estrechamente vinculada a la presencia de las proteínas GRASP (Burd, 2021).

El inmunomarcaje de la proteína GRASP65 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc en el hemisferio control, mostró un patrón punteado característico de distribución citoplasmática con zonas de incremento de intensidad en regiones perinucleares, correspondiendo con la localización en el CG (Figura 25 e). En el hemisferio lesionado con 6-OHDA, se detectó un cambio de distribución en la proteína GRASP65. En este caso, el incremento del patrón punteado perinuclear desaparece, observándose una distribución homogénea en el citoplasma (Figura 25 f), correspondiéndose con el mismo patrón observado en el estudio de la proteína GM130. La GRASP65 es una proteína en estrecha unión con GM130 en el CG, por lo que la fragmentación y dispersión del CG en el citoplasma explicaría el cambio de distribución observado en la GRASP65 en el hemisferio lesionado con 6-OHDA.

El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia en las imágenes de GRASP65 (Figura 9 g) no reveló diferencias estadísticamente significativas entre las imágenes del hemisferio control y el hemisferio inyectado con 6-OHDA, si bien si se detectó un ligero descenso en la intensidad de fluorescencia en el hemisferio lesionado.

Esta diferencia puede ser debida a la dispersión citoplasmática de la GRASP65 y a la menor proporción de zonas perinucleares con mayor señal de fluorescencia, con respecto al hemisferio control.

1.5.4. β -tubulina III, actina y neurofilamentos

La estructura del CG también está íntimamente ligada al citoesqueleto. En este contexto, los microtúbulos, filamentos de actina y los filamentos intermedios como los neurofilamentos, son esenciales para el mantenimiento de la estructura del CG y tienen una actividad dinámica ante eventos de señalización celular.

Los microtúbulos se encuentran nucleados en la cara cis-Golgi y se estabilizan con interacciones con los microtúbulos del TGN, contribuyendo en la posición y en la unión de las membranas del CG. Mientras que los filamentos de actina tienen un papel en la definición de la arquitectura del complejo (Kulkarni-Gosavi et al., 2019). Finalmente, los neurofilamentos son filamentos intermedios exclusivos de neuronas, cuya principal función es el crecimiento axonal (Di Giaino et al., 2020). Estos a su vez se componen de subunidades heteropoliméricas que se pueden dividir en neurofilamento ligero, neurofilamento medio y neurofilamento pesado (NF-H). El ensamblaje erróneo de estas subunidades podría provocar acúmulos intracitoplasmáticos y se ha vinculado con enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer o la EP (Speranza et al., 2021).

Los microtúbulos están conformados por dímeros de subunidades de α y β -tubulinas (Suzuki et al., 2014). En los modelos animales de la EP inducidos por MPTP y rotenona, se ha descrito una depleción en el ensamblaje de los microtúbulos en neuronas dopaminérgicas, las cuales serían más susceptibles a esta alteración que otros tipos neuronales (Cartelli y Cappelletti, 2017). Además, también se ha observado que la β -tubulina III se puede unir a la α -sinucleína, favoreciendo la formación de complejos proteicos insolubles en las neuronas (Suzuki et al., 2014). Este tipo de alteraciones podrían provocar un desequilibrio en el transporte intracelular e incluso la desorganización del CG, siendo una de las posibles causas de la fragmentación del CG.

En nuestro estudio, para el análisis morfológico de los microtúbulos se seleccionó la β -tubulina III como proteína de estudio, debido su presencia exclusiva en neuronas y no en otros tipos celulares. Tras el inmunomarcaje de la β -tubulina III, se observó una distribución citosólica y fibrilar, similar a la observada en el inmunomarcaje de la actina, en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio control. Este mismo resultado se observó en las neuronas dopaminérgicas supervivientes del hemisferio lesionado. Este resultado se confirmó tras cuantificar la intensidad de fluorescencia en ambos hemisferios, que resultó similar, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos, por lo que los resultados de nuestro estudio no muestran cambios en la distribución de la β -tubulina III (Figura 26 a, b).

Seguidamente, para analizar la distribución de los filamentos de actina en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se realizó una inmunofluorescencia de la actina, revelando una distribución citosólica y en algunos casos fibrilar en las células de ambos hemisferios cerebrales (Figura 26 c, d). De igual manera, se estudió la distribución y organización de los neurofilamentos, mediante el inmunomarcaje del NF-H (Figura 26 e, f). Al igual que en las anteriores proteínas del citoesqueleto analizadas, el marcaje mediante inmunofluorescencia del NF-H mostró un patrón fibrilar en todo el tejido de la SNpc, sin observarse diferencias significativas entre ambos hemisferios cerebrales.

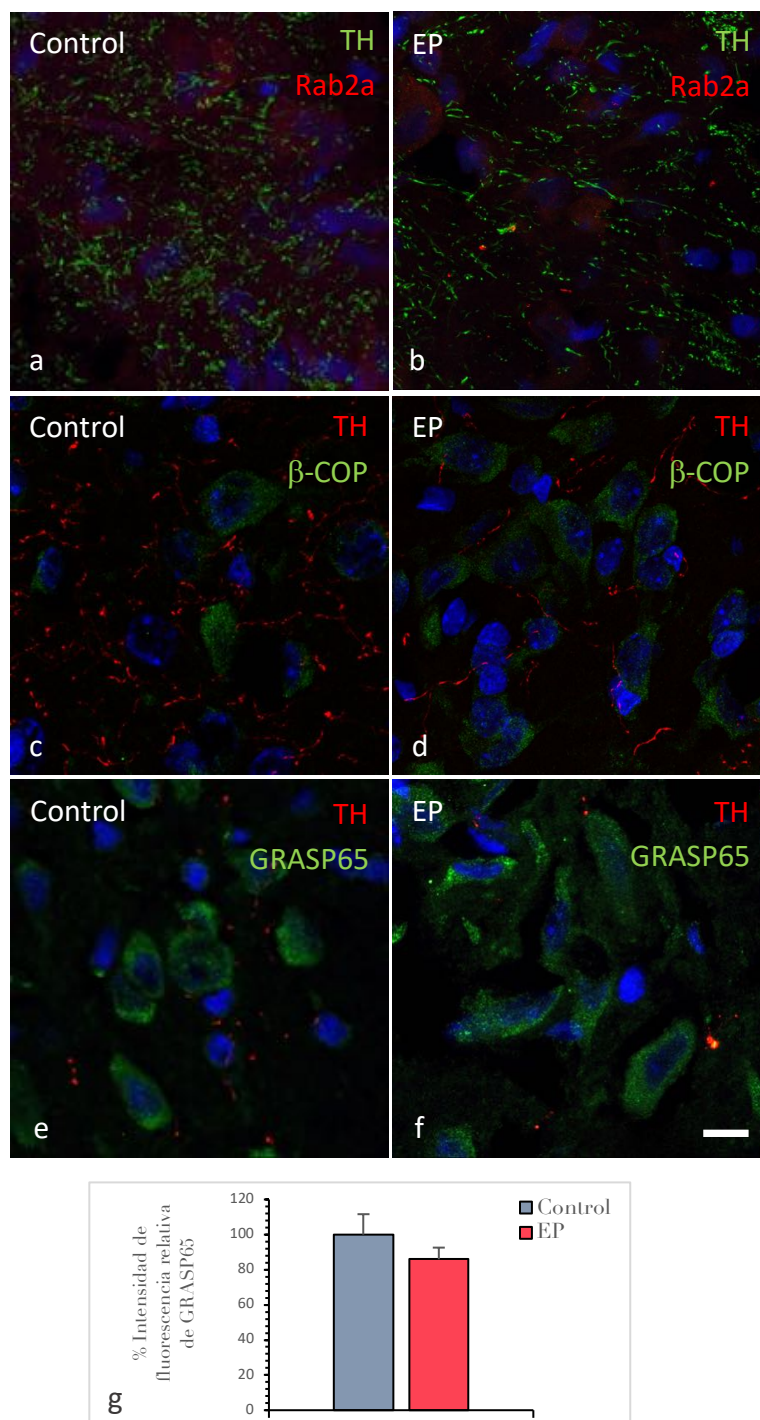


Figura 25. Imagen representativa de la inmunofluorescencia de Rab2a (a, b), β -COP (c, d) y GRASP65 (e, f) en neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Los núcleos están marcados con DAPI (azul). (a, b) Tras el inmunomarcaje de Rab2a (rojo), se observa una distribución citosólica difusa en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, sin diferencias entre el hemisferio control y el hemisferio lesionado. (c, d) En el inmunomarcaje de β -COP (verde) en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se distingue un marcaje citosólico punteado, sin evidencias de un cambio en el patrón de distribución o en la intensidad del inmunomarcaje de la proteína. (e, f) En el hemisferio control, la GRASP65 (verde)(e) muestra un patrón citoplasmático con mayor presencia en zonas perinucleares correspondiendo con la localización del CG, mientras que en el hemisferio EP (f), esta distribución se altera, observándose una distribución homogénea y punteada en el citoplasma. El análisis cuantitativo con ImageJ (g), no muestra diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de fluorescencia total entre ambos hemisferios Barra 10 μ m.

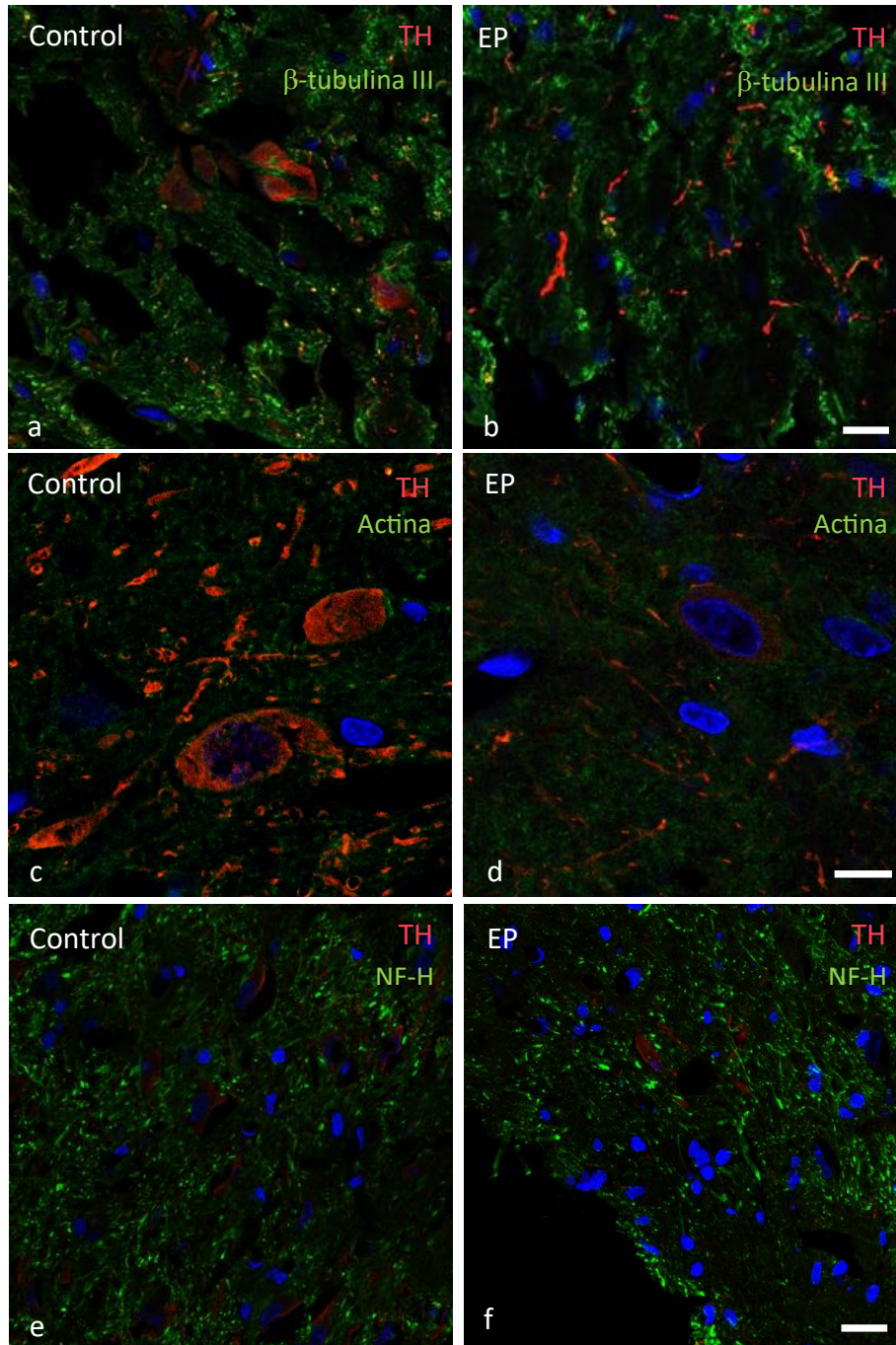


Figura 26. Imágenes representativas de la distribución de proteínas marcadoras del citoesqueleto en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control (a, c, e) y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP) (b, d, f), mediante inmunofluorescencia. El inmunomarcaje de la β -tubulina III (verde) (a, b), la actina (verde) (c, d) y el NF-H (verde) (e, f), no revela diferencias entre ambos hemisferios mediante análisis de imagen por ImageJ. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barras 50 (a, b), 10 (c, d) y 50 (e, f) μ m.

1.6. Estudio ultraestructural en las neuronas dopaminérgicas

1.6.1. Análisis de la citoarquitectura del complejo de Golgi

Tras el estudio morfológico y cuantitativo de la distribución de proteínas involucradas en el mantenimiento de la citoarquitectura del CG y el análisis de alteraciones observadas en la distribución y expresión, de proteínas implicadas en el tráfico de membranas, analizamos la citoarquitectura del CG a nivel ultraestructural utilizando para ello, microscopía electrónica de transmisión (detallado en material y métodos, apartado 5).

A nivel ultraestructural, los dictiosomas del CG de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control, mostraron una morfología característica, con cisternas apiladas y compactas en una posición yuxtannuclear (Figura 27 a). En el hemisferio tratado con 6-OHDA, a diferencia de los dictiosomas observados en las células controles, el CG de las neuronas estudiadas presentaba grupos de cisternas de menor tamaño, formando lo que se denominan minidictiosomas (“ministacks”), perdiendo su posición perinuclear y localizándose de forma más dispersa en el citoplasma, ocupando así una mayor área de distribución (Figura 27 b).

Estas alteraciones morfológicas se confirmaron cuantitativamente mediante análisis de imagen, evaluando diferentes parámetros, como la longitud media de las cisternas de los dictiosomas de cada CG, la distancia media desde la membrana nuclear a la cara cis-Golgi de cada CG y la separación media entre cisternas por dictiosoma (Figura 27 c, d, figura 28). Los resultados obtenidos, mostraron que la longitud media de los dictiosomas de los CG, en las neuronas del hemisferio tratado, se redujo de forma estadísticamente significativa (t de Student, $p < 0.05$), en un 50% (Figura 28 a) con respecto a los controles, mientras que la distancia al núcleo aumentó un 31% (Figura 28 b). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distancia entre las cisternas de los diferentes grupos de dictiosomas (Figura 28 c). Estos resultados confirman que los cambios de morfología del CG en neuronas dopaminérgicas de la SNpc observados por microscopía óptica, representan una fragmentación y dispersión del orgánulo en forma de lo que se conoce como ministacks del CG tras el tratamiento con 6-OHDA.

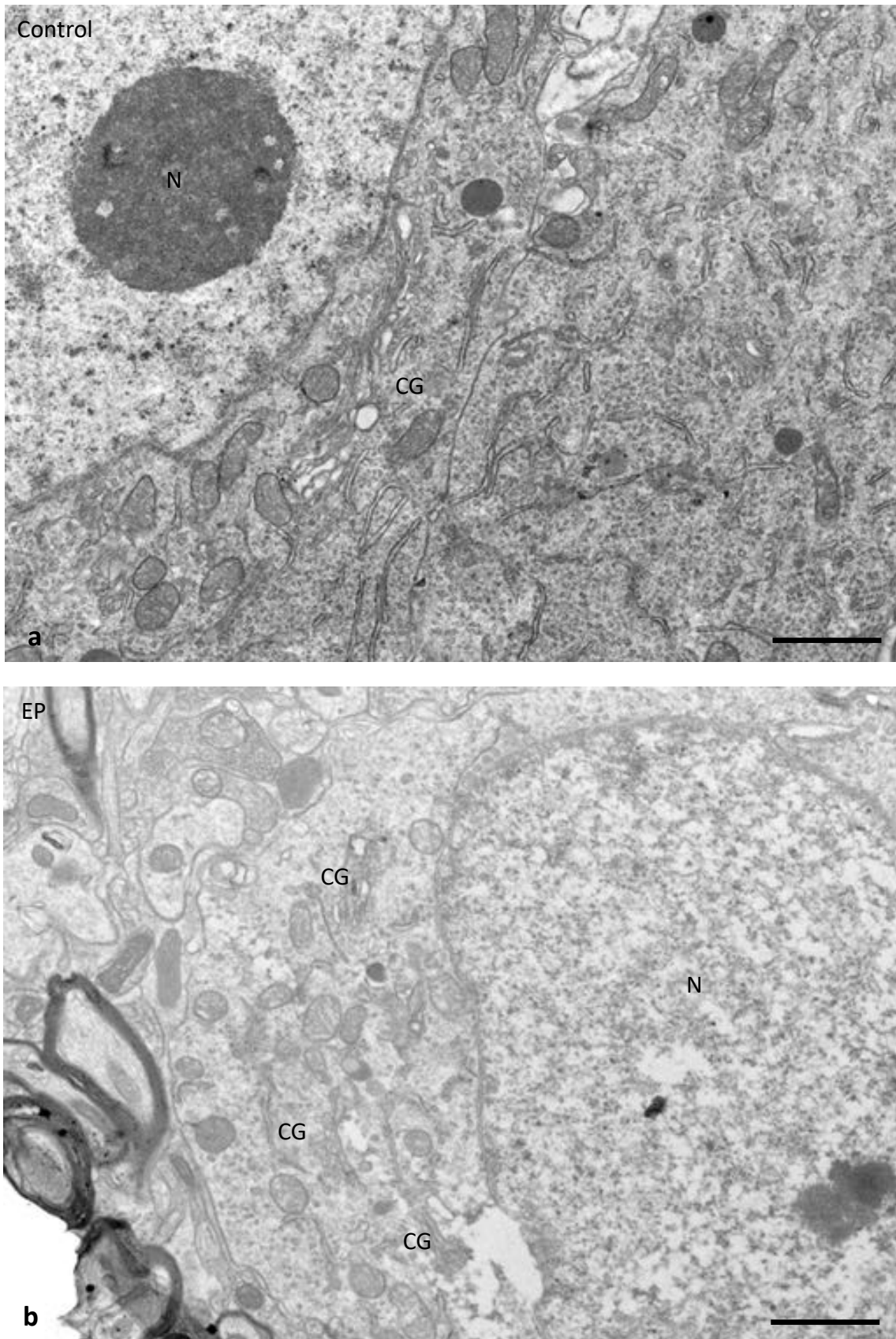
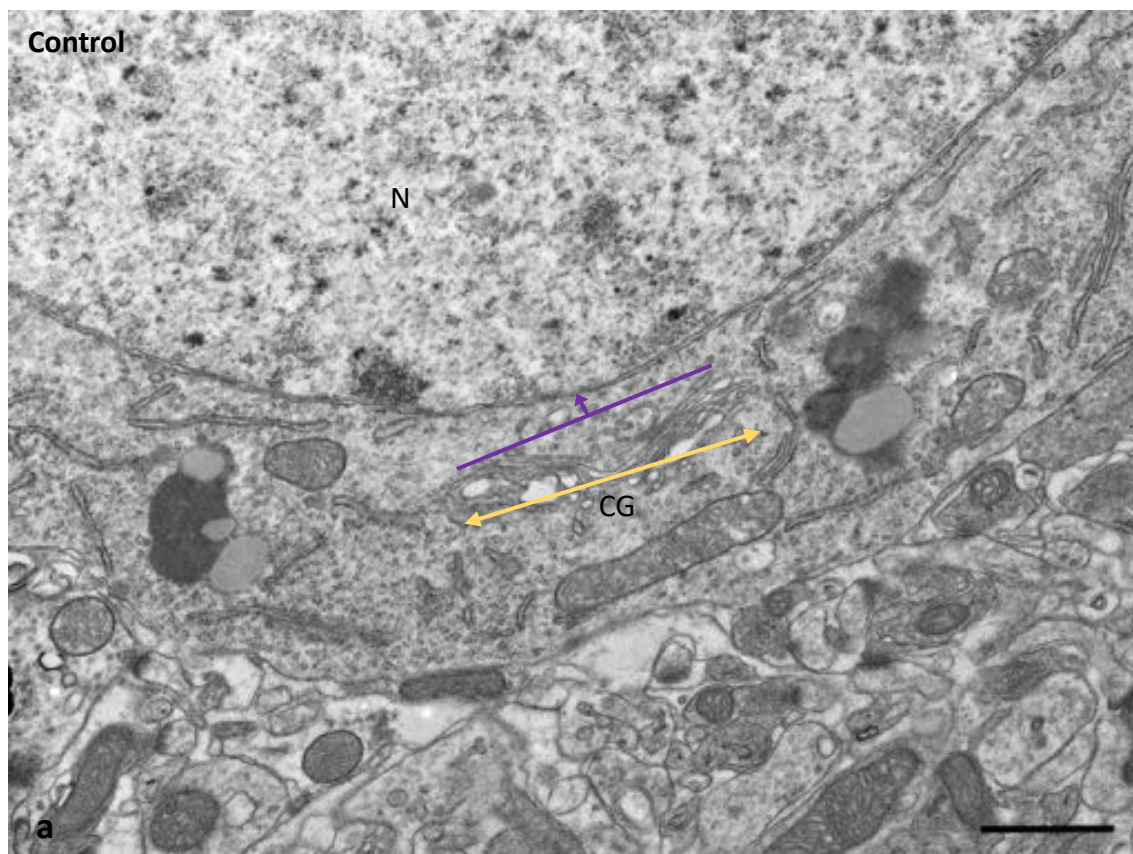


Figura 27. Imágenes representativas del CG, realizadas por microscopía electrónica de transmisión, de neuronas de la SNpc del hemisferio control (a) y del hemisferio lesionado con 6-OHDA (EP)(b). El CG de las neuronas del hemisferio control (a) aparece próximo al núcleo y muestra una citoarquitectura compacta, mientras que en el hemisferio EP (b) aparece en forma de “ministacks” dispersos por el citoplasma. CG: complejo de Golgi. N: núcleo. Barra 1 μm . 0.5 μm .



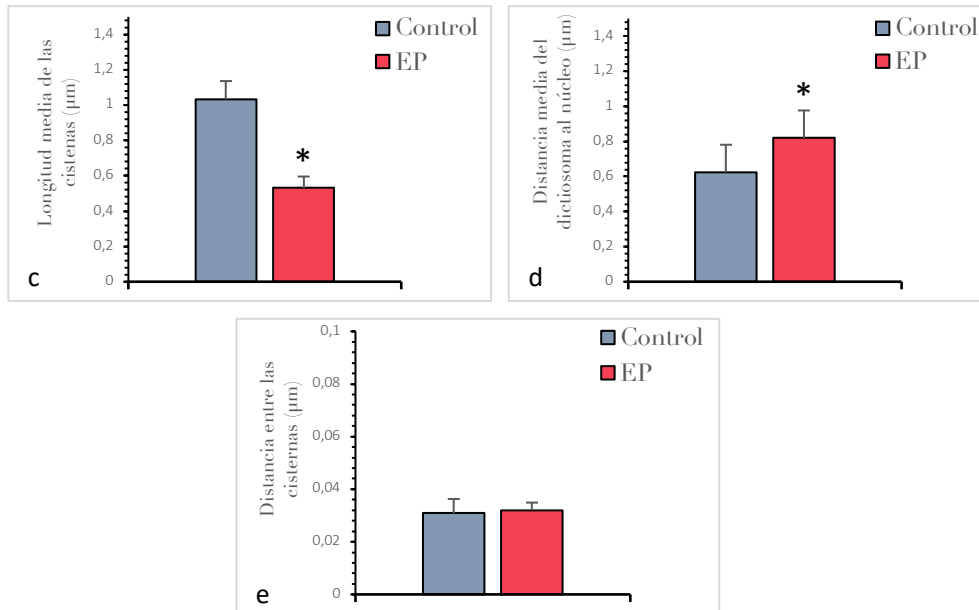


Figura 28. Análisis de imagen de la citoarquitectura del CG mediante cuantificación de diferentes variables por ImageJ. En las imágenes representativas del CG, realizadas por microscopía electrónica de transmisión, de neuronas de la SNpc del hemisferio control (a) y del hemisferio lesionado con 6-OHDA (EP)(b), se obtuvieron medidas cuantitativas de la longitud media de las cisternas (flecha amarilla), distancia media de las primeras cisternas del CG al núcleo (flecha morada) y distancia entre las cisternas de los dictiosomas (flecha roja). Los histogramas muestran una representación de las medias de cada variable, representadas en micrómetros (μm): longitud media de las cisternas (c); distancia media del dictiosoma al núcleo (d) y distancia entre las cisternas de los dictiosomas (e). Las diferencias estadísticamente significativas (t de Student, $p < 0,05$) se representan con asterisco (*). Barra 1 μm (a) y 0.5 μm (b).

1.6.2. Identificación ultraestructural de cuerpos multivesiculares en las neuronas dopaminérgicas

Debido a las alteraciones encontradas en proteínas vinculadas al transporte y exocitosis de vesículas citoplasmáticas, se realizó un análisis morfológico ultraestructural para identificar la presencia de endosomas tardíos en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Los endosomas tardíos, presentan multitud de vesículas en el espacio intraluminal, resultado de la invaginación de la membrana del endosoma, por lo que también reciben el nombre de cuerpos multivesiculares (CMV) por estar implicados en la exocitosis de exosomas y tratarse, según los resultados de algunos estudios, de una posible vía de transmisión de la proteína α -sinucleína en la EP.

Para llevar a cabo este estudio de identificación morfológica de CMVs por microscopía electrónica de transmisión, se analizó la SNpc de 3 animales distintos, examinando un total de 50 imágenes de neuronas de cada hemisferio cerebral. Finalmente, se identificaron únicamente CMVs en algunas neuronas de los hemisferios lesionados con 6-OHDA de cada animal (Figura 29).

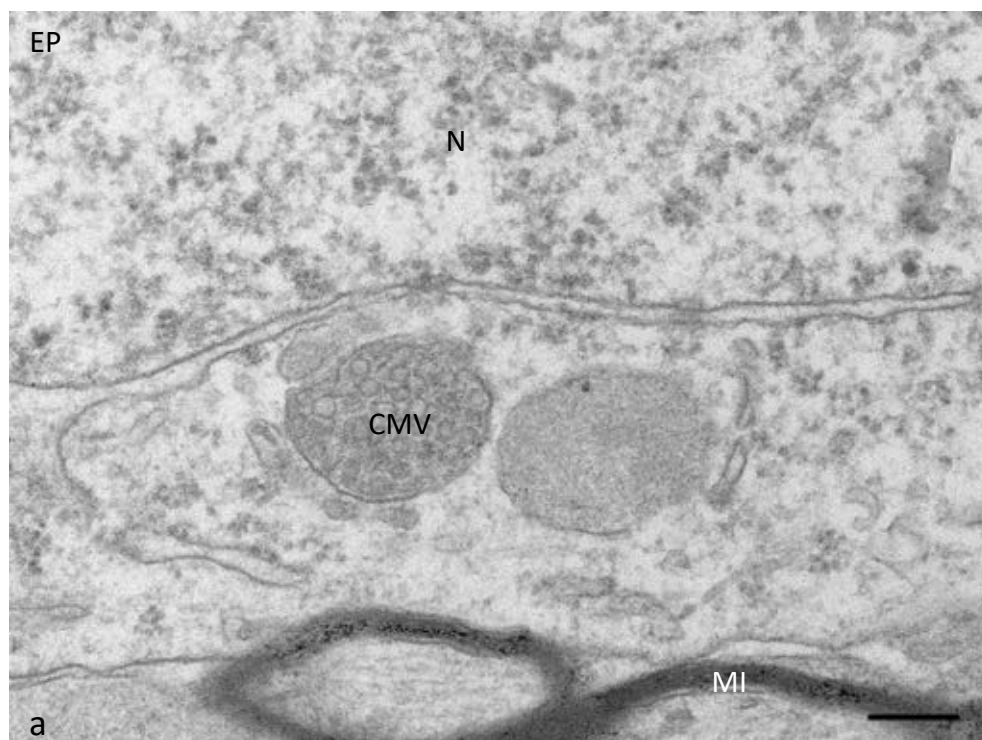


Figura 29. Imagen representativa de endosoma tardío en neurona dopaminérgica de la SNpc. Únicamente se identificaron endosomas tardíos en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio lesionado con 6-OHDA. Los endosomas tardíos, presentan multitud de vesículas en el espacio intraluminal, resultado de la invaginación de la membrana del endosoma, por lo que también reciben el nombre de cuerpos multivesiculares (CMV). N: núcleo. MI: mielina. Barra 200 nm.

1.7. Análisis morfológico de los cambios de distribución de proteínas marcadoras de exosomas en la sustancia negra pars compacta

Los exosomas son vesículas extracelulares que pueden contener proteínas, lípidos y material genético, entre otras biomoléculas, y que una vez exocitadas, pueden transportar este material entre células, facilitando la comunicación intercelular.

Esta comunicación a su vez se ha postulado como una posible vía de transmisión de la citopatología de la EP en neuronas dopaminérgicas (Ishiguro et al.,

2024). Con la finalidad de identificar y estudiar la distribución de exosomas en la SNpc, se analizaron las siguientes proteínas específicas de la membrana de exosomas e involucradas en el tráfico vesicular: Rab3a, CD63 y Rab27a.

1.7.1. Rab3a GTPasa

La Rab3 es una subfamilia dentro de las Rab GTPasas que se divide en cuatro isoformas (Rab3a, Rab3b, Rab3c y Rab3d), de las cuales, la Rab3a es casi exclusiva de neuronas. La Rab3a regula el tráfico vesicular sináptico, localizándose principalmente en las terminaciones sinápticas, dónde se produce la liberación de neurotransmisores. La α -sinucleína se encuentra especialmente abundante en este tipo de vesículas, dónde se ha descrito su interacción con la Rab3a en modelos de la EP (Lv et al., 2022).

Para el estudio morfológico de la Rab3a, se inmunodetectó esta proteína en la SNpc del hemisferio control y del hemisferio lesionado con 6-OHDA (Figura 30). El inmunomarcaje de la proteína Rab3a GTPasa, fuese similar en ambos hemisferios cerebrales (Figura 30 a, b), observándose un patrón citosólico homogéneo, con una mayor intensidad de fluorescencia y presencia de algunos pequeños agregados en disposición perinuclear. En este contexto, la Rab3a podría estar involucrada en la maduración, reciclaje o tráfico anterógrado de las vesículas sinápticas desde su biogénesis en el CG hasta los terminales presinápticos, explicándose así el mayor inmunomarcaje cerca del núcleo neuronal (Handley et al., 2007). Esta localización también puede estar vinculada a su interacción con otras proteínas Rab y moléculas reguladoras que controlan el tráfico vesicular intracelular.

El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia mostró una disminución en el marcate de la proteína Rab3a en las muestras de SNpc del hemisferio lesionado por 6-OHDA con respecto a las muestras de SNpc del hemisferio control. Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa mediante el test estadístico de U de Mann-Whitney ($p > 0.05$) (Figura 30 c).

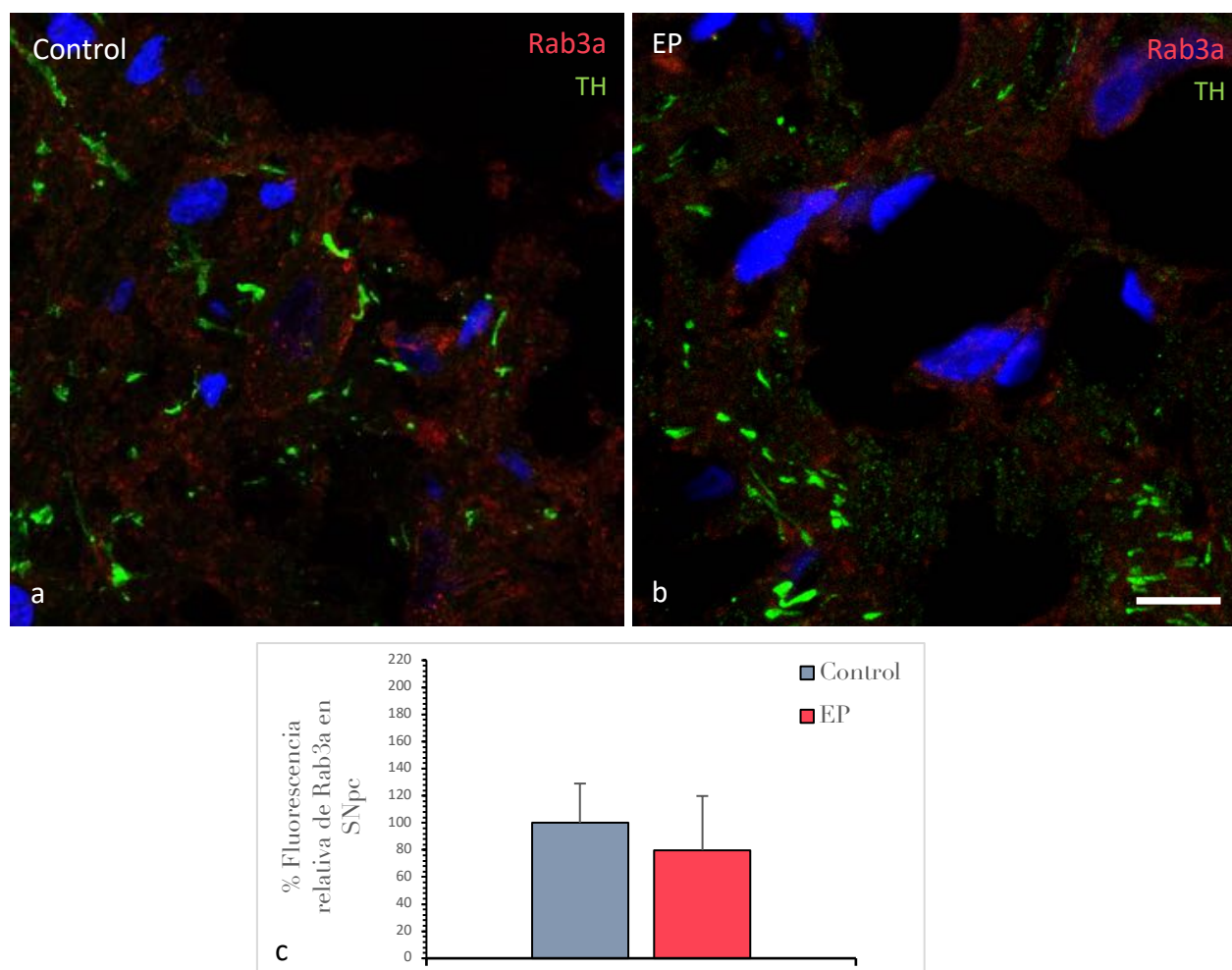


Figura 30. Imágenes representativas del inmunomarcaje de Rab3a en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control (a) y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP)(b). El inmunomarcaje de la Rab3a (rojo)(a,b) se muestra como un patrón citosólico, con un mayor inmunomarcaje en la región perinuclear, muy similar en ambos hemisferios cerebrales. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (verde) y los núcleos marcados con DAPI (azul). (c) El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia no revela diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. ($p>0.05$). Barra 10 μm .

1.7.2. Rab27a GTPasa

La Rab27 es otra subfamilia dentro de las Rab GTPasas, compuesta por dos isoformas: Rab27a y Rab27b. Esta Rab se localiza principalmente en la membrana de lisosomas, endosomas y exosomas. Puesto que esta subfamilia de Rab GTPasas, tiene un papel fundamental en la exocitosis de exosomas, se ha vinculado con la transmisión de las formas oligoméricas citotóxicas de la α -sinucleína en la EP (Pattanayak et al., 2022; Underwood, Wang, Pathak, et al., 2020)

Estudios recientes en modelos celulares y animales, han descrito que la delección de ambas isoformas de la Rab27 reduce los agregados de α -sinucleína y la toxicidad celular (Underwood, Wang, Pathak, et al., 2020). Además, un análisis en cerebros post-mortem de pacientes de EP y demencia con cuerpos de Lewy, ha revelado que la Rab27b se encuentra sobreexpresada con respecto a muestras de cerebros de pacientes sanos, indicando que estas Rab GTPasas estarían vinculadas con la liberación y patogénesis de la α -sinucleína (Underwood, Wang, Carico, et al., 2020). En nuestro estudio, la inmunodetección de la Rab27a en neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ambos hemisferios cerebrales, evidenció un marcaje citoplasmático leve y difuso, sin evidencias de diferencias entre el hemisferio control y el hemisferio lesionado con 6-OHDA (Figura 31).

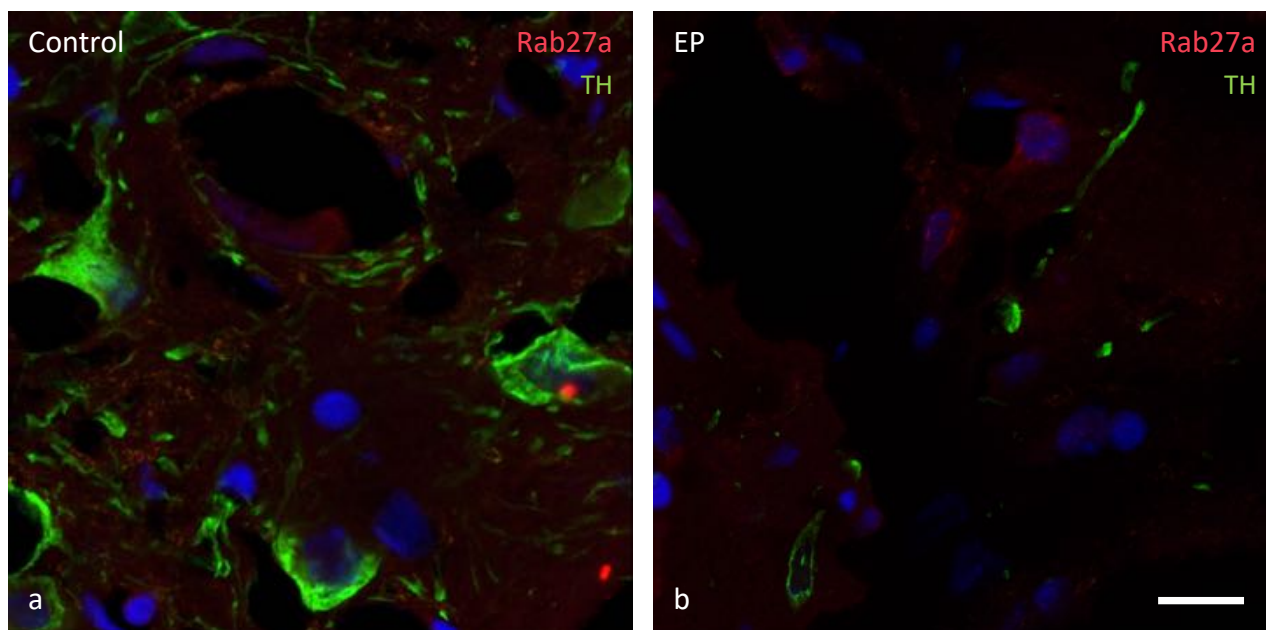


Figura 31. Imágenes representativas del inmunomarcaje de Rab27a en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control (a) y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP)(b). El inmunomarcaje de la Rab27a (rojo) en ambos hemisferios revela un patrón citosólico leve, sin mostrar diferencias aparentes en distribución o intensidad. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (verde) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barra 10 μ m.

1.7.3. CD63

Posteriormente, debido a su vinculación con el transporte y degradación de los endosomas tardíos, se procedió a analizar la distribución y la intensidad de fluorescencia del inmunomarcaje de la proteína CD63. La CD63 es una proteína de la familia de las tetraspaninas, presente en la superficie de las membranas celulares, como endosomas tardíos, lisosomas y membrana plasmática, cuya función reside en la regulación del tráfico vesicular, exocitosis, secreción y la señalización y comunicación celular. Esta proteína, además se ha usado en los últimos años como marcador de exosomas derivados de endosomas tardíos, debido a su acumulación en estas vesículas, siendo una proteína ideal para el estudio de la distribución de estos (Carmo et al., 2016; Han et al., 2023; Mathieu et al., 2021).

Tras el inmunomarcaje de la CD63 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se observó una distribución punteada y citosólica de la proteína, indicando un patrón vesicular en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas del hemisferio control mientras que el hemisferio lesionado con 6-OHDA, este patrón era más intenso y abundante (Figura 32 a, b). Este resultado se confirmó con un análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia, que mostró un aumento estadísticamente significativo (U de Mann-Whitney, $p < 0.05$), del 117% en el inmunomarcaje para CD63 en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio parkinsoniano respecto a las del hemisferio control (Figura 32 c).

En las neuronas del hemisferio control, se observó una mayor colocalización entre la TH, enzima que se encuentra principalmente en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas, y la proteína CD63, presente en las membranas de vesículas como los endosomas tardíos y exosomas. Esto sugiere la identificación de posibles áreas, tanto en el soma neuronal como en las zonas de sinapsis, involucradas en el empaquetamiento o transporte de vesículas sinápticas y exosomas. En contraste, en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado con 6-OHDA, aunque el marcaje de la proteína CD63 es más intenso, la colocalización con TH es menor, lo que podría indicar un aumento en la densidad de vesículas con diferente contenido y localización, distribuidos en áreas intracelulares y/o extracelulares.

Dados los cambios observados en la intensidad de inmunofluorescencia de la proteína CD63 y la presencia de CMVs en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc

del hemisferio lesionado, para profundizar en el análisis de la localización a nivel ultraestructural de esta proteína y poder identificar la morfología y distribución de exosomas y su proceso de formación en estas neuronas, se realizó un estudio de inmunomarcaje a nivel ultraestructural mediante crioinmunocitoquímica por MET (Figura 32 d). En este análisis, se observó la presencia de vesículas inmunomarcadas para la proteína CD63 en neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado con 6-OHDA, mientras que en el hemisferio control, no se detectó marcaje para la proteína.

A pesar de la gran limitación del estudio, por un lado, por la alta complejidad de la técnica y por ello la difícil localización de inmunoreactividad a nivel ultraestructural y, por otro lado, por la compleja identificación de exosomas en el uso de tejidos como nuestras muestras de estudio, ha sido un trabajo muy complicado y tedioso. Por ello, la disponibilidad de imágenes con inmunoreactividad positiva como la que se muestra (Figura 32 d), fue muy limitada. La figura 32 d es una imagen representativa de un inmunomarcaje de la proteína CD63 en neuronas de la SNpc del hemisferio modelo de la EP.

En la región del CG, se pueden identificar partículas de oro como puntos oscuros, adheridas específicamente a estructuras vesiculares dispersas en el citoplasma que tienen la presencia de la proteína CD63. Esta proteína es un marcador clave de exosomas debido a su alta abundancia en la membrana de estas pequeñas vesículas, que se liberan al espacio extracelular mediante la fusión de los CMVs con la membrana plasmática. Las estructuras membranosas inmunomarcadas pueden representar vesículas de transporte o estructuras en tránsito hacia los endosomas tardíos, los CMV o los lisosomas. Este resultado, podría representar el posible aumento en el proceso de formación de exosomas en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio modelo de EP, en comparación con el hemisferio control, puesto que no se consiguió identificar la proteína CD63 en las muestras de SNpc del hemisferio control. Siendo a nuestro conocimiento, el primer estudio ultraestructural que se realiza de esta tetraspanina en un modelo experimental de la EP.

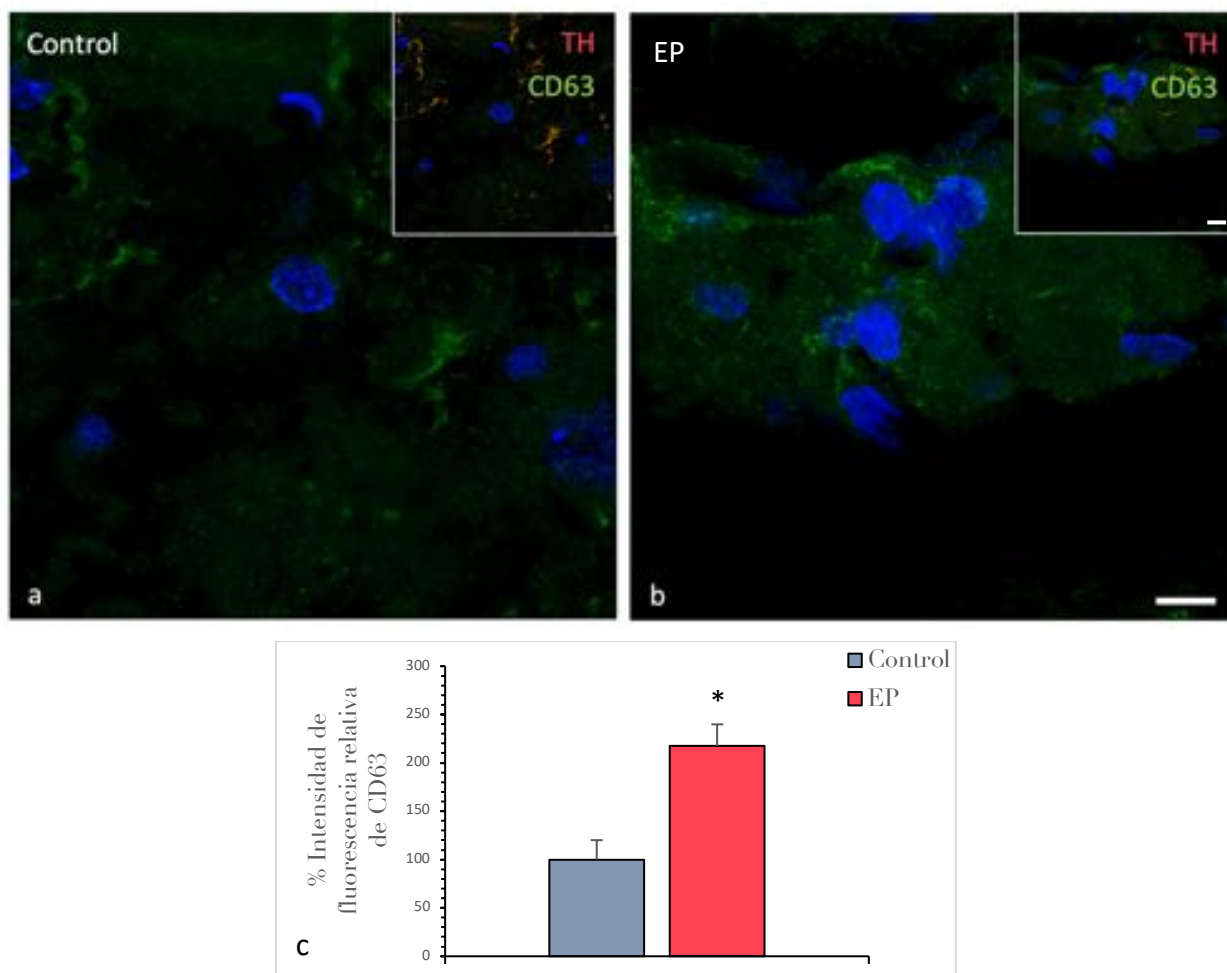


Figura 32. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de CD63 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control (a) y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP)(b). El inmunomarcaje de la CD63 (verde) se presenta como un punteado citosólico en ambos hemisferios cerebrales, este marcaje aumenta de forma considerable en el hemisferio lesionado (b) con respecto al hemisferio control mediante análisis de imagen por ImageJ (a). En la esquina superior derecha se muestran las neuronas dopaminérgicas inmunomarcadas con TH (rojo), los núcleos marcados con DAPI (azul) y la proteína CD63 (verde). (c) El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia mediante ImageJ, revela un aumento estadísticamente significativo del inmunomarcaje de la proteína CD63 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio lesionado con 6-OHDA, con respecto al hemisferio control ($p > 0.05$). Barra 10 µm.

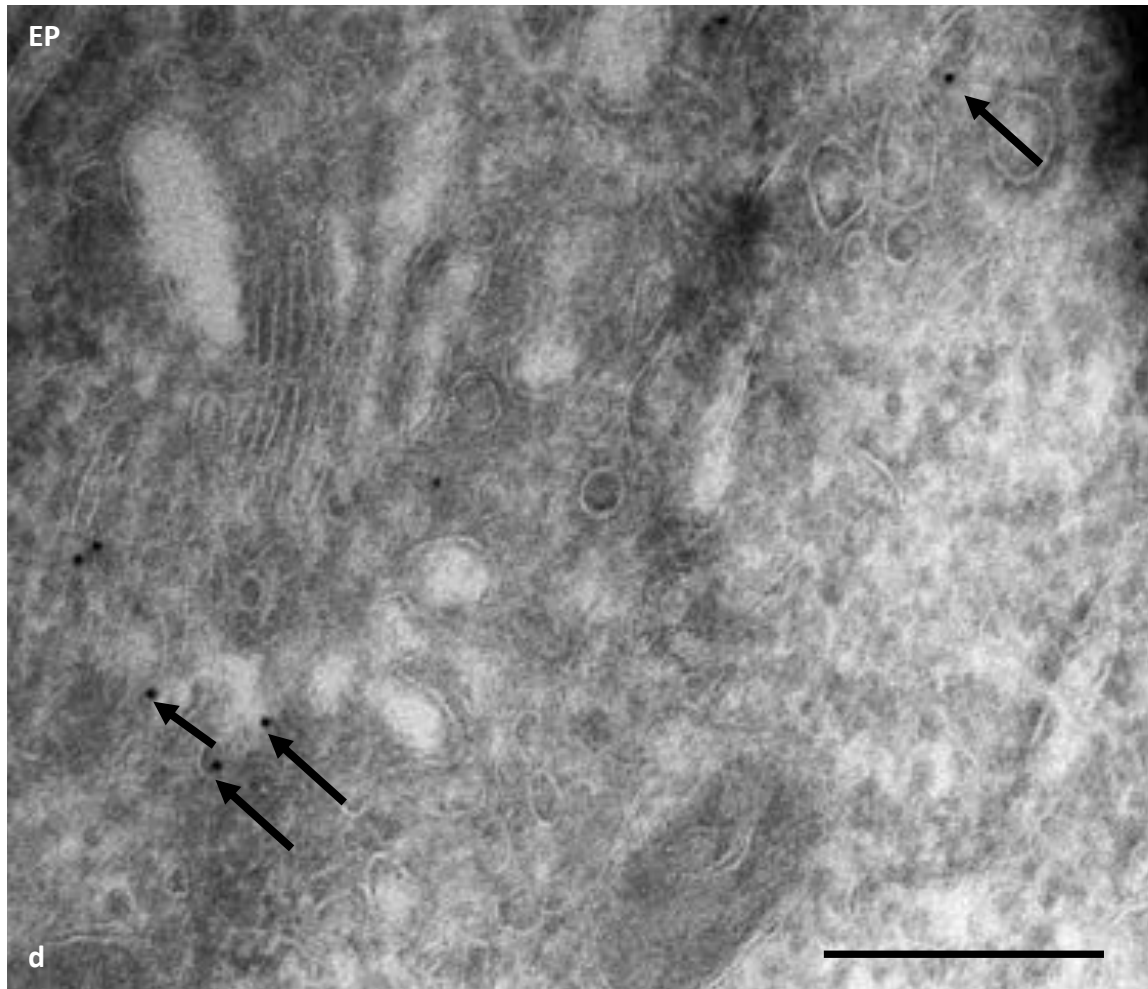


Figura 32d. Imagen representativa del crioinmunomarcaje de CD63 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP). La localización del oro coloidal (flechas negras) muestra el inmunomarcaje de la proteína CD63 cerca de la región del CG en las neuronas del hemisferio lesionado, pudiendo representar una mayor presencia de formación de vesículas intraluminales en neuronas del hemisferio lesionado con respecto al hemisferio control. Barra 500 nm.

1.8. Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas implicadas en la citoarquitectura del complejo de Golgi y en el tráfico de membranas

Tras el análisis morfológico de la citoarquitectura del CG y tras observar cambios en la intensidad y distribución del inmunomarcaje de proteínas involucradas en el transporte intracelular mediante inmunofluorescencia, realizamos un estudio densitométrico para analizar los niveles de expresión de las proteínas claves en estos procesos en la SNpc de ambos hemisferios. Para ello, se realizó un análisis de la expresión proteica inmunodetectada por la técnica de Western-blot, donde se comparó el nivel de expresión de cada proteína total entre las muestras de SNpc del hemisferio control y del hemisferio lesionado por la microinyección de la toxina 6-OHDA.

El análisis densitométrico de los inmunoblots de cada proteína analizada (Figura 33 a, b), confirmó resultados similares a los obtenidos mediante la medida de la intensidad de fluorescencia para cada proteína utilizando microscopía confocal. Inicialmente, los datos obtenidos nos revelan que, en nuestro modelo de la EP, por administración estereotáxica de la neurotoxina 6-OHDA, no se produce un incremento o alteración de la expresión de la α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas supervivientes (Figura 33 b), pero sí se produce una redistribución citoplasmática o un cambio en la organización de la proteína, posiblemente vinculados a la oligomerización de la α -sinucleína monomérica citosólica, en formas fibrilares características de la patología de la EP.

Posteriormente, dados los resultados obtenidos en el estudio morfológico, se cuantificaron los niveles de expresión de la proteína GTPasa Rab1a y de la proteína SNARE syntaxina-5, de las cuales se obtuvieron los resultados más significativos. El análisis densitométrico mostró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) del 20% en el nivel de expresión de la Rab1a en el hemisferio tratado con respecto al hemisferio control. Mientras que la densitometría de la proteína SNARE syntaxina-5, mostró una reducción de su expresión estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en un 15% en el hemisferio tratado con respecto al control (Figura 33 a, b). El análisis densitométrico de las proteínas GRASP-65 y Rab3a, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estas proteínas en ambos hemisferios.

El resto de las proteínas analizadas morfológicamente (GM130, Rab2, β -COP, CD63, NF, actina), no se consiguieron determinar densitométricamente mediante la técnica de Western-blot, debido a la imposibilidad de obtener una inmunodetección visible o cuantificable. Los anticuerpos usados para inmunodetectar estas proteínas (ver Anexo I), fueron utilizados con éxito para esta técnica en los estudios previos de nuestro grupo en el modelo celular y las muestras de SNpc (Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021). Sin embargo, no parecieron ser adecuados para la inmunodetección de estas proteínas mediante Western-blot en lisados de SNpc de rata.

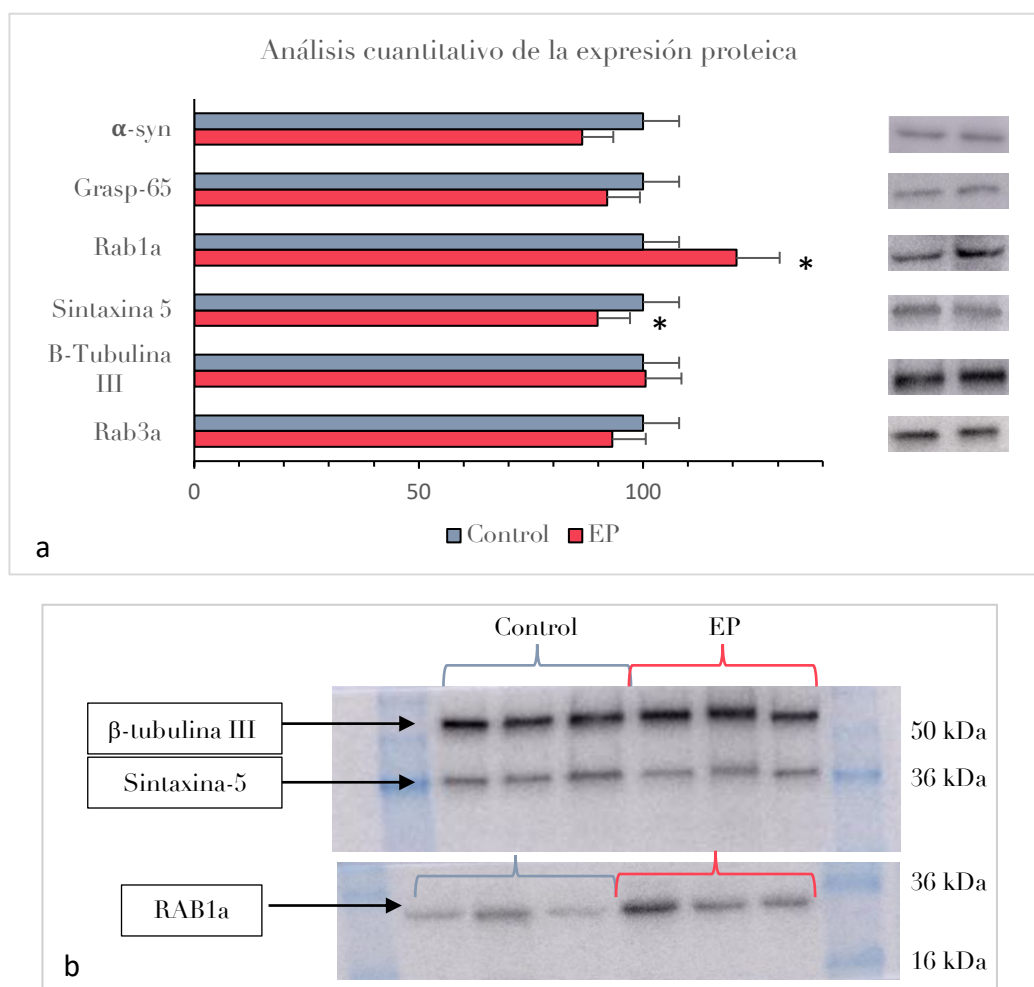


Figura 33. Representación gráfica del análisis cuantitativo de la expresión de proteínas en la SNpc del hemisferio control y del hemisferio inyectado con 6-OHDA (EP) mediante Western-blot. Se muestran los datos obtenidos de la cuantificación densitométrica por ImageJ de las bandas correspondientes a cada una de las proteínas (expresada en % + Error estándar de la media) del extracto proteico obtenido de la SNpc del hemisferio control (gris) (valor arbitrario del 100%) en comparación con el de la SNpc del hemisferio tratado con 6-OHDA (EP) (rojo). Los datos estadísticamente significativos se señalan con *. (b) Imagen representativa de la inmunodetección por Western-blot de las proteínas sintaxina-5 (35 kDa) y Rab1a (23 kDa) utilizando la proteína β -tubulina III (55 kDa) como control de carga.

Capítulo 2: Análisis morfológico de las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso entérico en el colon

2.1. Identificación de los plexos de Auerbach y de Meissner en el colon

La segunda parte de este estudio consistió en analizar los efectos de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas del SNE de nuestro modelo experimental de la EP. Realizamos un estudio comparativo de las neuronas dopaminérgicas del SNE obtenidas tanto de una porción del colon proximal, como neuronas procedentes del colon distal, para poder analizar posibles diferencias causadas por la innervación extrínseca diferenciada de ambas partes del colon.

Como primer paso, se procedió a la identificación del grupo de células que configuran los plexos nerviosos que componen la innervación intrínseca o SNE en este tejido, conocidos como plexos mientérico o de Auerbach y plexo submucoso o de Meissner. Para ello, se realizó una tinción con azul de toluidina a distintos pH entre 3 y 5.4, para diferenciar los distintos plexos nerviosos, siendo la dilución de azul de toluidina en tampón acético/acetato a pH 4.5 la más idónea para su identificación (Figura 34 a, b).

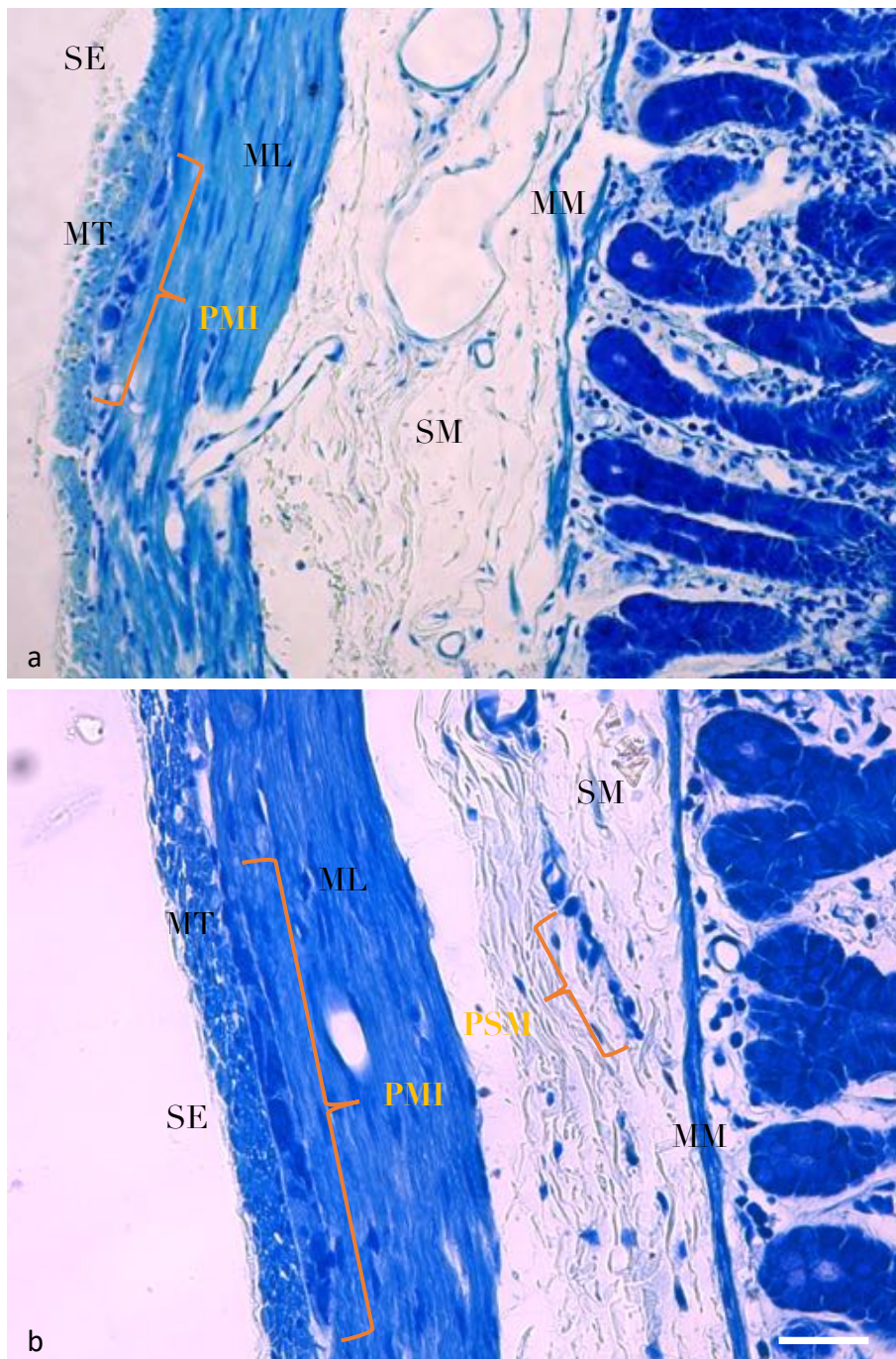


Figura 34. Imágenes representativas de la identificación de los plexos nerviosos del SNE (a, b) por microscopía óptica de campo claro, mediante tinción histológica con azul de toluidina de secciones de muestras de colon proximal. Se identifican las distintas capas del tejido: MM: capa muscular lisa de la mucosa; SM: capa submucosa; ML: capa muscular longitudinal; MT: capa muscular transversal o circular; SE: capa serosa. Entre corchetes (naranja) se identifican los plexos nerviosos. PMI: plexo mientérico o de Auerbach. PSM: plexo submucoso o de Meissner. Barra 25 μ m.

2.2. Evaluación de la lesión dopaminérgica inducida por 6-hidroxidopamina en el sistema nervioso entérico

Una vez identificados y localizados los plexos nerviosos que componen la innervación intrínseca del SNE, evaluamos la distribución de neuronas dopaminérgicas en estos plexos de las muestras de colon proximal como de las muestras de colon distal procedentes de nuestro modelo hemiparkinsoniano y muestras obtenidas de animales control. Al igual que para el estudio realizado en la SNpc, las neuronas dopaminérgicas del SNE se localizaron con el inmunomarcaje de la enzima TH (Figura 35).

De acuerdo con lo descrito en otros estudios (Mitchel et al., 2022), la densidad de neuronas totales en el plexo submucoso de Meissner fue muy inferior a la observada en el plexo mientérico de Auerbach, representando las neuronas dopaminérgicas (TH positivas) solo una pequeña porción de las células totales de ambos plexos nerviosos del SNE (Natale et al., 2017). Por lo que, dada la complejidad para su localización y la escasez de este tipo de neuronas, en este estudio comparativo para el análisis de las posibles alteraciones en neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal y distal, aunque fueron analizados ambos plexos, nos centramos en el estudio de los plexos mientéricos de Auerbach. Por lo que finalmente, la mayoría de las imágenes representativas para el estudio morfológico de las neuronas dopaminérgicas en el SNE han sido realizadas en los plexos mientéricos de Auerbach.

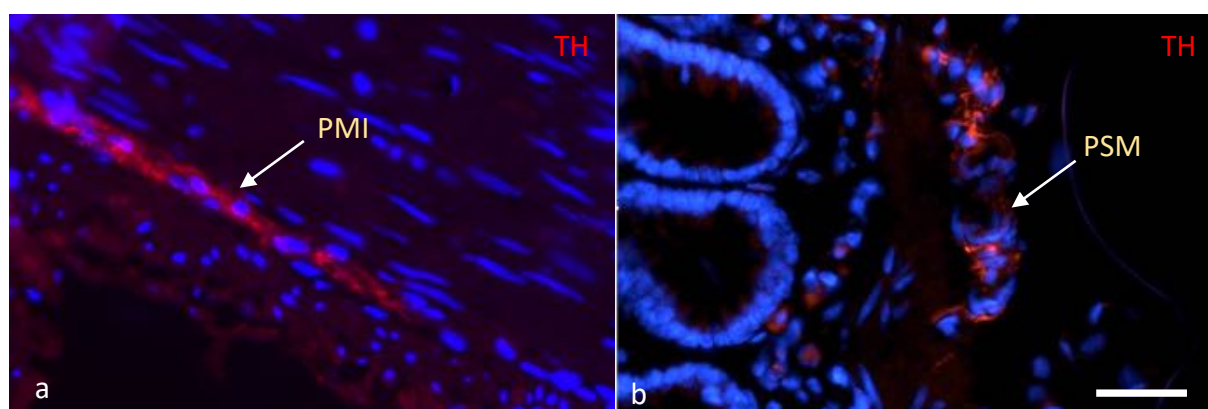


Figura 35. Imágenes representativas de la identificación de neuronas dopaminérgicas en los plexos mientérico (a) y submucoso (b) en muestras control de colon proximal, mediante microscopía óptica de fluorescencia convencional. Las neuronas dopaminérgicas se identifican mediante inmunofluorescencia de la proteína TH (rojo) y los núcleos están marcados con DAPI (azul). PMI: plexo mientérico o de Auerbach. PSM: plexo submucoso o de Meissner. Barra 25 μ m.

La cuantificación del número de neuronas TH positivas en los plexos de ambas porciones disminuyó drásticamente en las muestras del modelo experimental de la EP con respecto a los controles (Figura 36). En los plexos nerviosos de muestras de colon proximal de los animales tratados con 6-OHDA (Figura 36 b), la cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas reveló una disminución del 52% con respecto a los controles (Figura 36 a), mientras que en el colon distal se observó una reducción del 37% (Figura 36 d). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (t de Student $p < 0.05$) (Figura 36 e, f), lo que indicó, que existe una alteración en la densidad de las neuronas dopaminérgicas del SNE, tanto del colon proximal como del colon distal, vinculada a la inyección unilateral de la neurotoxina 6-OHDA en la SNpc de nuestro modelo experimental.

2.3. Análisis morfológico de la población neuroglial

Al igual que en el estudio en SNpc, analizamos la activación de células gliales mediante el inmunomarcaje de la proteína GFAP. La tinción de la GFAP en secciones de colon proximal y colon distal mostró un patrón de marcaje indicativo de la localización de las células gliales entéricas en los plexos nerviosos analizados. Mientras que el número de células gliales parecía ser más escaso en los plexos de las muestras control (Figura 37 a), tanto en muestras de colon proximal, como en las muestras de colon distal, se observó una mayor tinción de células GFAP positivas en los plexos de las muestras del modelo hemiparkinsoniano (Figura 37 b).

Esta observación cualitativa, se verificó mediante un análisis de imagen cuantitativo del marcaje de inmunofluorescencia en los plexos nerviosos del SNE, que confirmó un aumento de la intensidad de fluorescencia en las muestras del modelo hemiparkinsoniano. Este aumento fue del 85% en los plexos analizados de las muestras de colon proximal y del 73% en los plexos de las muestras de colon distal con respecto a las muestras controles (Figura 37 c, d). Estas diferencias en las intensidades medias cuantificadas fueron estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney, $p < 0.05$) (Figura 37 e, f), por lo que, al igual que observamos en SNpc, se confirma que existe una reacción de las células gliales en los plexos nerviosos del SNE de los animales que fueron sometidos a la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNpc, alteración todavía no descrita en otros estudios utilizando este modelo.

Figura 36. Imágenes representativas de la distribución de neuronas dopaminérgicas en los plexos mientéricos de colon proximal (CP) (a, b) y en los plexos mientéricos del colon distal (CD) (c, d) realizadas con microscopía confocal. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Se puede observar una disminución en el número de neuronas TH positivas en muestras del modelo experimental de la EP (b, d) con respecto a las muestras control (a, c) en ambas porciones del colon. (e, f) Histogramas que ilustran la cuantificación de neuronas dopaminérgicas del SNE de colon proximal (e) y del SNE del colon distal (f) del modelo de la EP con respecto a los controles. Se aprecia una disminución estadísticamente significativa del número de células TH positivas de tanto en las muestras de colon proximal, como en las muestras de colon distal. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) mediante la prueba estadística de t de Student. Barra 10 μm .

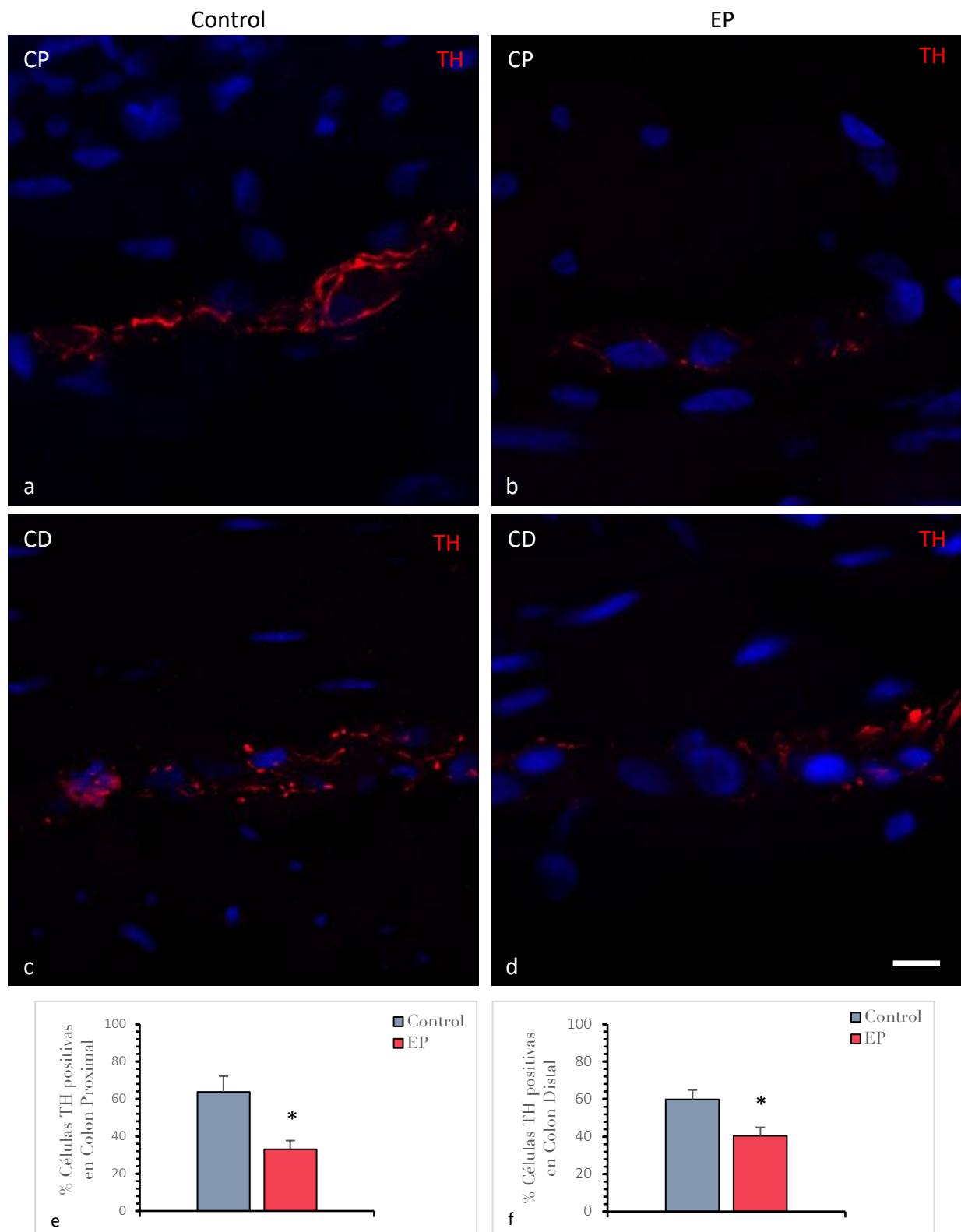


Figura 36.

Figura 37. Imágenes representativas de la distribución de las células gliales entéricas en plexos mientéricos del SNE por inmunofluorescencia de la proteína GFAP en muestras de colon proximal (CP) (a, b) y colon distal (c, d). Las imágenes, tomadas mediante microscopía confocal, muestran un aumento de la presencia de células GFAP positivas (rojo) en muestras de CP del modelo experimental (EP) (b, d) con respecto a las muestras control (a, c). Cuantificación de la fluorescencia del marcaje de GFAP en el SNE de muestras de colon proximal y distal por ImageJ. (e) En los plexos nerviosos totales analizados del colon proximal, el inmunomarcaje de GFAP aumenta un 85% en muestras del modelo EP. Barra 10 μm

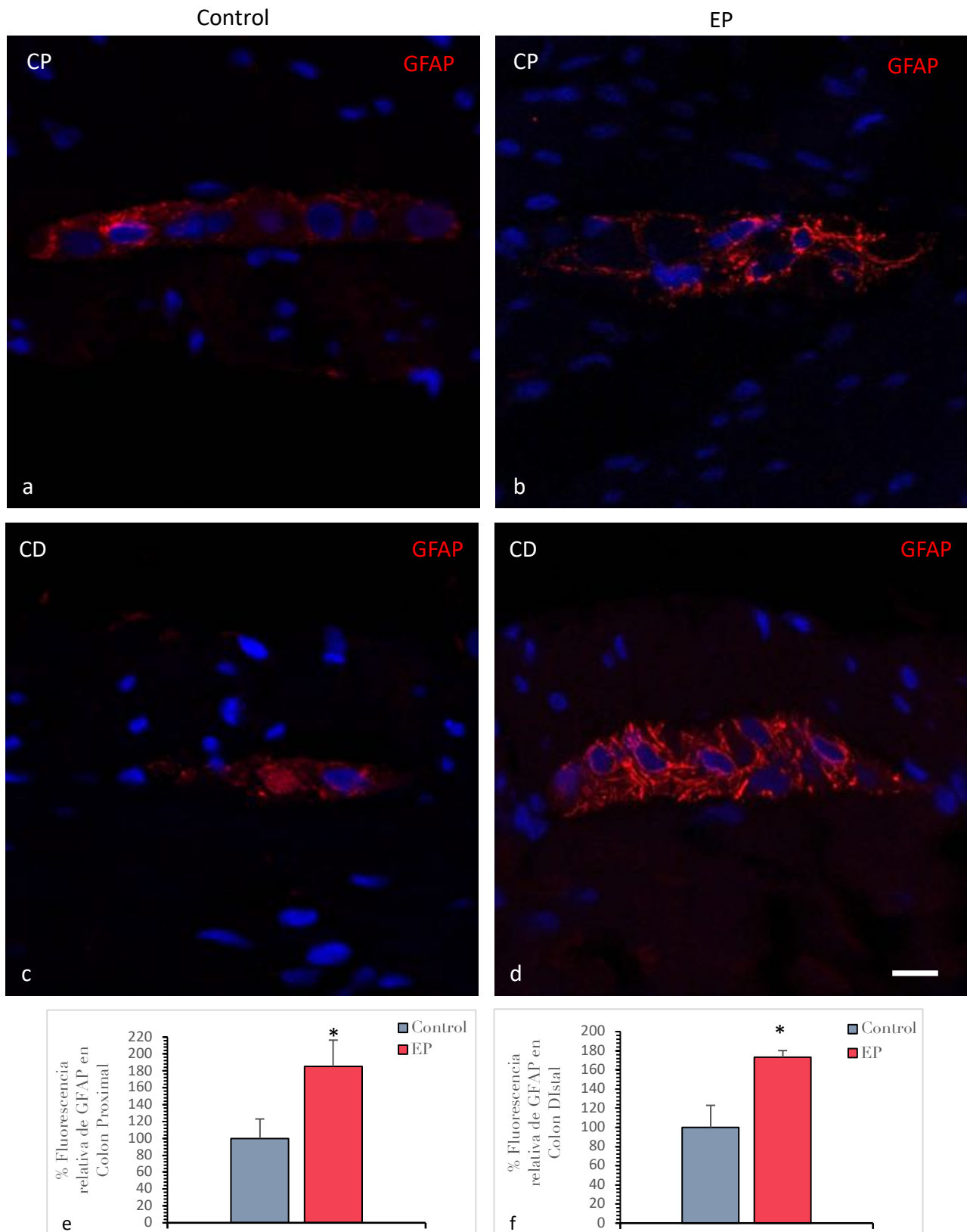


Figura 37.

2.4. Análisis morfológico de la distribución de la proteína α -sinucleína

Para analizar los posibles cambios en la distribución de la proteína α -sinucleína y la presencia o no de cuerpos de Lewy en el SNE, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia.

La observación mediante microscopía confocal de las muestras control de colon proximal, mostró una distribución difusa de la proteína, con patrón citoplasmático, en las neuronas TH positivas en los plexos nerviosos totales analizados, similar a la encontrada en las muestras control de la SNpc. La presencia de pequeños puntos fluorescentes más intensos o regiones con fluorescencia más concentrada, en las células de este tejido, fue más abundante y frecuente que la observada en las muestras de SNpc.

En las muestras de colon proximal del modelo inducido por la neurotoxina 6-OHDA, el patrón de la inmunodetección fue muy similar al observado en las muestras control, distinguiéndose una distribución difusa, pero con un patrón de mayor concentración de puntos fluorescentes en el citoplasma (Figura 38 a, b). La inmunofluorescencia para α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de los plexos nerviosos de muestras de colon distal, también mostró un patrón de fluorescencia similar al observado en las muestras de colon proximal.

Figura 38. Imágenes de microscopía confocal representativas del estudio de distribución de la proteína α -sinucleína (α -syn) (verde) en las neuronas dopaminérgicas de los plexos mientéricos de muestras de colon proximal (CP) (a, b) y muestras de colon distal (CD) (c, d). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). El inmunomarcaje de la α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de muestras control (a, c) muestra un patrón de distribución difuso y punteado en el citoplasma tanto en colon proximal (a), como en colon distal (c). En las muestras de colon del modelo experimental de la EP (b, d), se observa una distribución similar a los controles con una mayor presencia de puntos/acúmulos concentrados de fluorescencia. (e, f) La cuantificación de la fluorescencia de la proteína α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas del SNE mediante análisis de imagen por ImageJ no revela diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos casos. Barra 10 μ m.

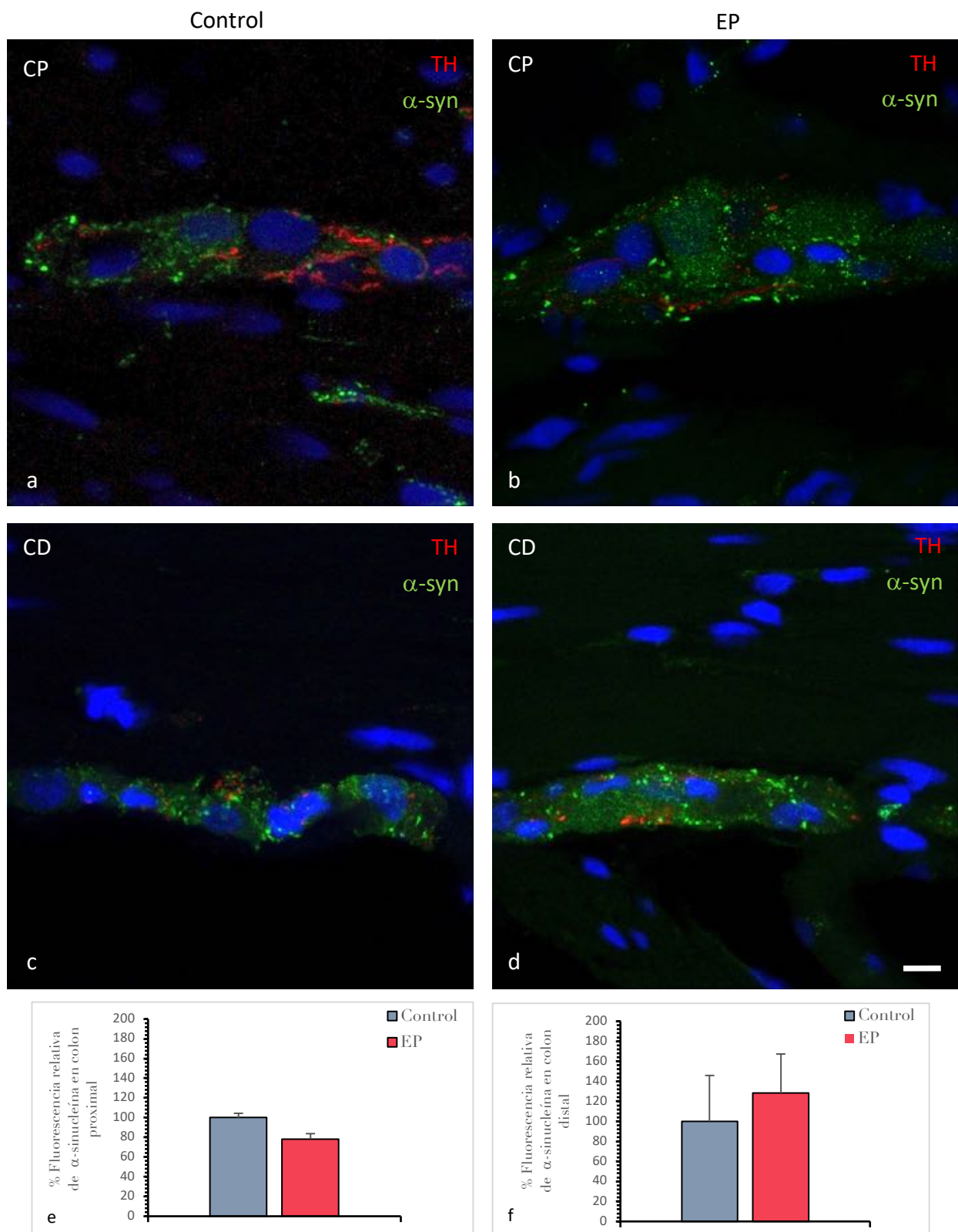


Figura 38.

El patrón de distribución de la proteína α -sinucleína en muestras control y muestras del modelo experimental de la EP fue muy similar, pero al igual que en las muestras de colon proximal, también se observó un mayor número de acúmulos citoplasmáticos con elevada intensidad de fluorescencia. (Figura 38 c, d). En ambas muestras, tanto de colon proximal, como de colon distal, no se detectaron cuerpos de Lewy en las neuronas TH positivas.

Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de la proteína en las neuronas dopaminérgicas de los plexos nerviosos obtenidos de los animales control y de los animales del modelo inducido por 6-OHDA, mostró una disminución de un 21% en las muestras de colon proximal (Figura 38 e) y presentó un aumento de 28% en las muestras de colon distal (Figura 38 f), con respecto a las muestras control, no existiendo diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Este resultado, muy similar al observado en las neuronas de la SNpc, indica que en el modelo experimental de la EP inducido por la inyección de la neurotoxina de 6-OHDA, aunque no se ha descrito la presencia de cuerpos de Lewy, también puede existir una redistribución y concentración de la proteína α -sinucleína citoplasmática en las neuronas dopaminérgicas del SNE. Al igual que en SNpc, esta alteración puede ser debida a una mayor presencia de formas oligoméricas de la proteína α -sinucleína.

2.5. Fragmentación del complejo de Golgi en neuronas dopaminérgicas

Para el estudio morfológico de la citoarquitectura y organización del CG en las neuronas dopaminérgicas del SNE, se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia de la proteína la TH, para identificar las neuronas dopaminérgicas, y de la proteína GM130 para localizar el CG.

En el modelo experimental, tras la inyección de 6-OHDA en la SNpc, el inmunomarcaje del CG en las neuronas dopaminérgicas de los plexos nerviosos de muestras de colon proximal (Figura 39 b), mostró una estructura del CG alterada, con una localización dispersa o fragmentada en el citoplasma celular a diferencia de las muestras control, donde el CG conservaba una estructura característica yuxtannuclear, tubular y compacta (Figura 39 a). El análisis cuantitativo del porcentaje de neuronas

dopaminérgicas con el “CG fragmentado”, reveló que en muestras control, solo un 14% de las neuronas dopaminérgicas mostraban un CG anormal, frente a un 82% de las neuronas TH positivas de las muestras del modelo hemiparkinsoniano. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa (t de Student, $p < 0,05$) (Figura 39).

Al analizar el SNE en las muestras de colon distal (Figura 39 c, d), encontramos un resultado similar al hallado en el estudio de muestras de colon proximal. En este caso, el CG aparece disgregado en las neuronas dopaminérgicas del modelo experimental hemiparkinsoniano (Figura 39 d), observándose incluso un patrón fragmentado, a diferencia de lo que ocurría con las muestras control, donde el CG aparecía con una organización compacta, tubular y cercano al núcleo (Figura 39 c).

El análisis del porcentaje de neuronas dopaminérgicas con el CG fragmentado también resultó similar al analizado en muestras de colon proximal, este porcentaje cambió de un 5% en las muestras control, a un 83% de las neuronas TH positivas de las muestras del modelo experimental, siendo también este resultado estadísticamente significativo (t de Student, $p < 0,05$) (Figura 39 e). Para confirmar este resultado obtenido tras el análisis morfológico del orgánulo por inmunofluorescencia, se realizó una reconstrucción 3D del CG mediante microscopía confocal con el software Imaris (Figura 40 a-d) (material complementario en Anexo III: videos 3-6 ilustrativos de la reconstrucción 3D del CG).

Esta reconstrucción, permitió analizar la dispersión del CG en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado, a diferencia de la estructura compacta y uniforme observada en las neuronas del hemisferio control.

Posteriormente, se realizaron análisis de distribución de fluorescencia (Figura 40 e, f), para analizar la dispersión o localización de la señal de fluorescencia resultante del inmunomarcaje de la proteína GM130. Se delimitaron 5 zonas concéntricas alrededor del núcleo de cada neurona y se analizó la intensidad de fluorescencia en cada área.

Este estudio se realizó en las muestras de colon proximal y colon distal control y del modelo hemiparkinsoniano, observándose resultados muy semejantes en ambos tipos de neuronas dopaminérgicas de ambas regiones de colon. La fluorescencia resultante del marcaje de la proteína GM130, en las muestras control disminuía en

áreas más alejadas del núcleo, debido a la conformación compacta que observamos, mientras que, en las muestras del modelo experimental de la EP, la fluorescencia se distribuía homogéneamente y de manera dispersa en todas las áreas, indicando la desestructuración o fragmentación del CG observada en las neuronas dopaminérgicas en el SNE. Estos resultados se analizaron cuantitativamente mediante la prueba estadística de comparación de medias de t de Student, en la que se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las áreas más alejadas al núcleo (Figura 40 e, f).

Estos resultados, evidencian por primera vez, que la citoarquitectura del CG de las neuronas dopaminérgicas del SNE y, no solo en SNpc, se encuentra alterada en el modelo de rata hemiparkinsoniana inducida por la neurotoxina 6-OHDA.

Figura 39. Imágenes representativas del estudio morfológico de la citoarquitectura del CG mediante inmunofluorescencia de GM130 (verde) en plexos mientéricos de muestras de colon proximal (CP) (a, b) y distal (CD) (c, d). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). En muestras control (a, c), se observa un CG perinuclear, compacto y tubular. Mientras que en modelo hemiparkinsoniano (b, d), se observa un CG con cisternas desconectadas en el citoplasma, indicando la posible fragmentación del orgánulo. (e) Cuantificación de los CG fragmentados en neuronas dopaminérgicas del SNE. Los histogramas representan el porcentaje de CG fragmentados en neuronas TH positivas de plexos nerviosos de muestras de colon proximal y distal. Estos resultados, son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) tras la prueba estadística de t de Student. Barra 10 μm .

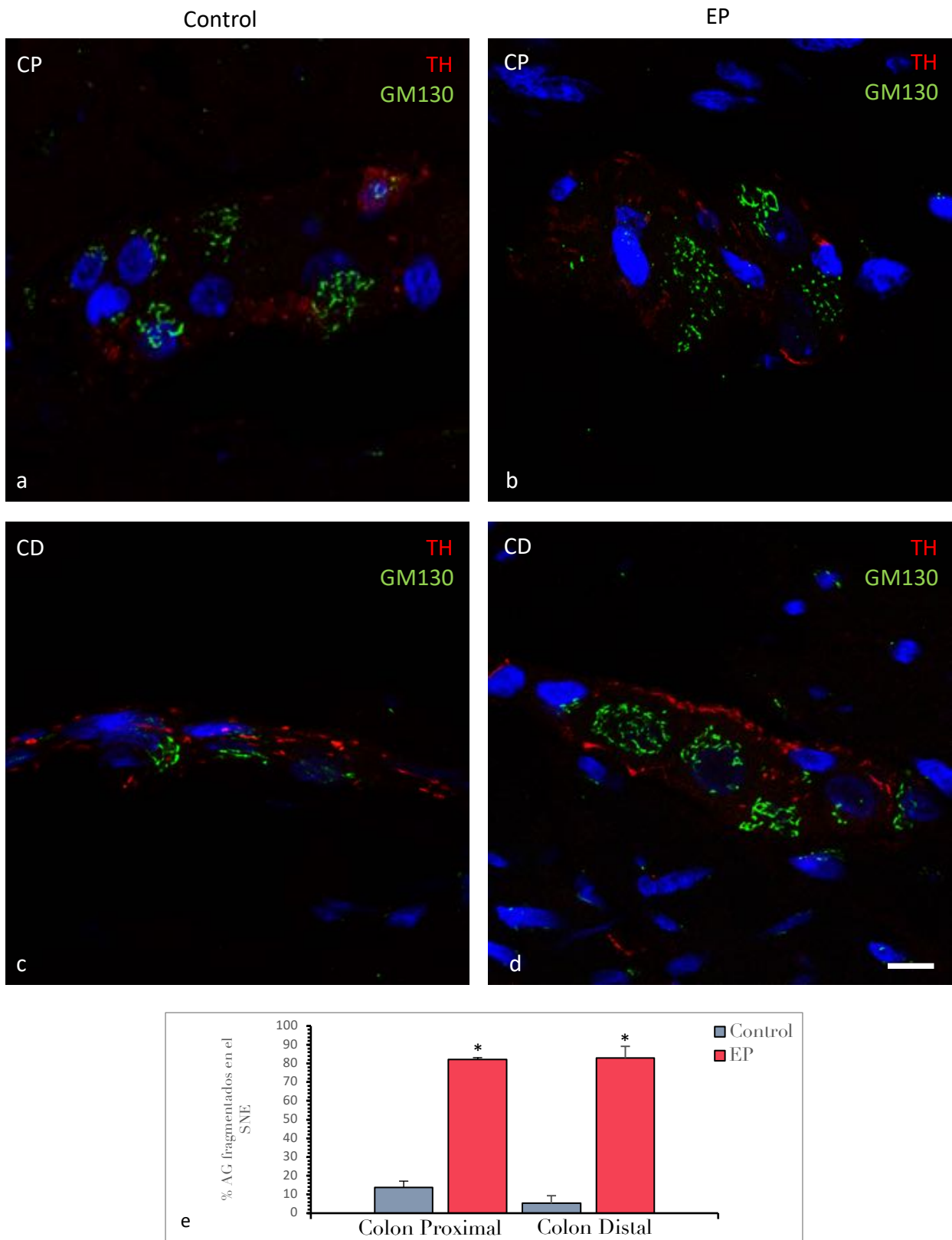


Figura 39.

2.6. Estudio morfológico del complejo de Golgi en otros tipos neuronales

A diferencia de la SNpc, donde las neuronas dopaminérgicas suponen la mayor parte de la población celular, en el SNE se han descrito diversos tipos neuronales (Furness, 2000), de los cuales las neuronas dopaminérgicas suponen una minoría (10%) (Z. S. Li et al., 2004). Con motivo de esclarecer si las alteraciones observadas en el CG de neuronas dopaminérgicas son específicas de este tipo neuronal, analizamos la estructura del CG en otros tipos neuronales presentes en el SNE. Para ello, se identificaron los dos grupos de neuronas más abundantes en los plexos mientéricos del SNE, las neuronas NOS positivas (>20%) (Bódi et al., 2019; Furness et al., 1994) y ChAt positivas (>40%) (Erickson et al., 2014; Johnson et al., 2018), mediante técnicas inmunocitoquímicas junto con la inmunodetección de la proteína GM130 para localizar el CG. Inicialmente, analizamos el porcentaje de neuronas positivas para estas dos proteínas específicas en los plexos nerviosos de colon proximal y del colon distal, de muestras control y muestras obtenidas del modelo hemiparkinsoniano.

El porcentaje de neuronas NOS positivas, en muestras de colon proximal y colon distal, fue similar en controles (12% y 12.5% respectivamente) y en muestras del modelo de la EP (15% y 12.5% respectivamente). El análisis cuantitativo de neuronas ChAt positivas de forma similar, reveló que en plexos de muestras control de colon proximal y distal el porcentaje fue un 23% y un 27% respectivamente, en las muestras del modelo experimental de EP, encontramos un 31% y un 14% respectivamente, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 41).

Figura 40. Imágenes representativas de la reconstrucción 3D del CG en neuronas dopaminérgicas de los plexos del SNE de muestras de colon, realizadas por microscopía confocal. El CG está identificado por la inmunofluorescencia para GM130 (verde) y los núcleos están marcados con DAPI (azul). En las neuronas de los plexos del colon proximal (a, b) y del colon distal (c, d), del modelo de EP, el CG (verde) pierde su imagen tubular y compacta y se confirma la fragmentación del CG disperso (b, d). (e, f) Análisis cuantitativo de la dispersión del inmunomarcaje de la proteína GM130 mediante ImageJ. Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia relativa en zonas concéntricas al núcleo (1-5). Tanto en muestras control de colon proximal (e), como de colon distal (f), el inmunomarcaje de la proteína GM130 en neuronas dopaminérgicas disminuye en zonas más alejadas al núcleo (3-5). En muestras de colon en el modelo experimental de EP, este marcaje se dispersa en el citoplasma homogéneamente, observándose una distribución similar en todas las zonas concéntricas al núcleo. Estos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) tras la prueba estadística de t de Student. Barra 4 μm .

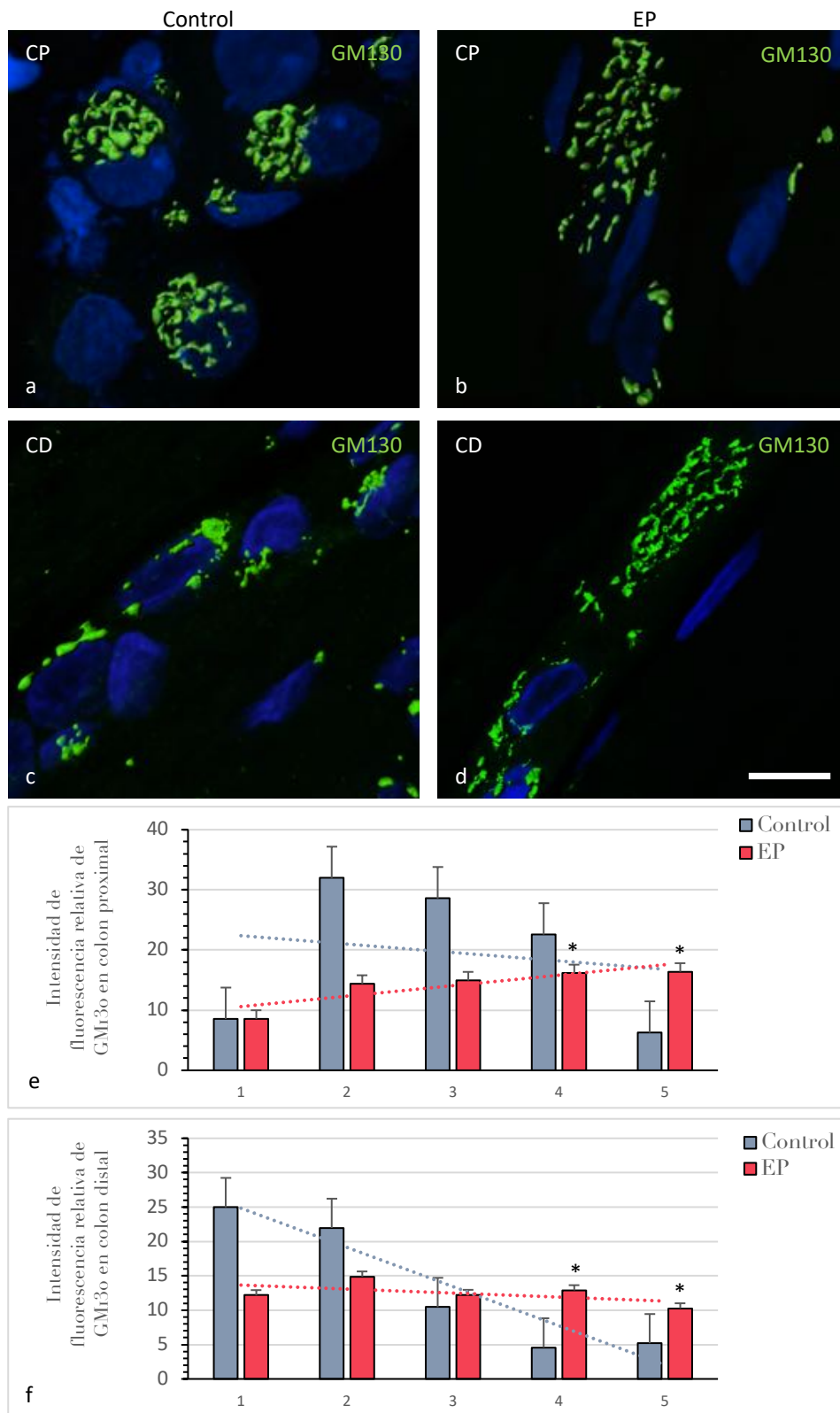


Figura 40.

Estos resultados indican que la inyección unilateral de la neurotoxina 6-OHDA en SNpc, no parece tener un efecto en la densidad de neuronas NOS y ChAt positivas en el SNE, a diferencia de su efecto en la población de neuronas dopaminérgicas (Figura 41).

A su vez, en neuronas ChAT positivas de colon proximal, se observó un 20% de neuronas con el CG fragmentado en muestras control, en comparación a un 21% en muestras EP. En colon distal, se cuantificaron un 23% de CG fragmentados en muestras control, frente a un 15% en plexos del modelo EP en neuronas ChAT positivas (Figura 42 c, d, e). Estos resultados indican que la microinyección unilateral de 6-OHDA parece no afectar a la integridad del CG en estos tipos neuronales.

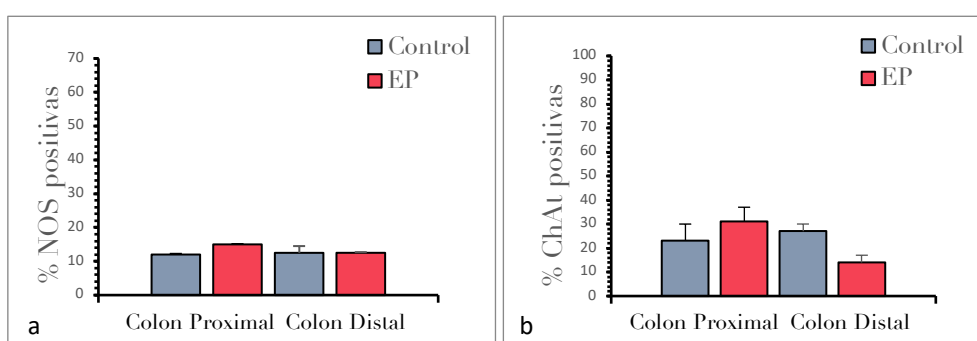


Figura 41. Cuantificación de neuronas NOS y ChAt positivas en el SNE por inmunofluorescencia. Los histogramas ilustran la cuantificación representada en porcentaje del número de neuronas NOS positivas (a) y ChAt positivas (b) en plexos nerviosos de colon proximal y colon distal. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el número de neuronas cuantificadas del modelo hemiparkinsoniano (EP) con respecto a los controles.

Figura 42. Imágenes de microscopía confocal representativas del análisis morfológico mediante inmunofluorescencia, de la citoarquitectura del CG en diferentes tipos neuronales en plexos mientéricos de colon proximal (CP) por microscopía confocal (a, b). El CG inmunomarcado con GM130 (verde) en neuronas NOS positivas (rojo) aparece con su estructura perinuclear característica en muestras control y de nuestro modelo experimental (EP). (c, d) En neuronas ChAt positivas (verde), el CG inmunomarcado con GM130 (rojo) también muestra una morfología característica en muestras control y EP. La cuantificación de CG fragmentados en neuronas NOS y ChAt positivas (e) revela que no existen diferencias estadísticamente significativas (t de Student, $p < 0.05$) entre células de muestras control y del modelo de EP, a diferencia del resultado obtenido en las neuronas TH positivas donde el porcentaje de CG fragmentados aumenta de forma estadísticamente significativa en las muestras de EP inducidas por 6-OHDA. Barra 10 μm .

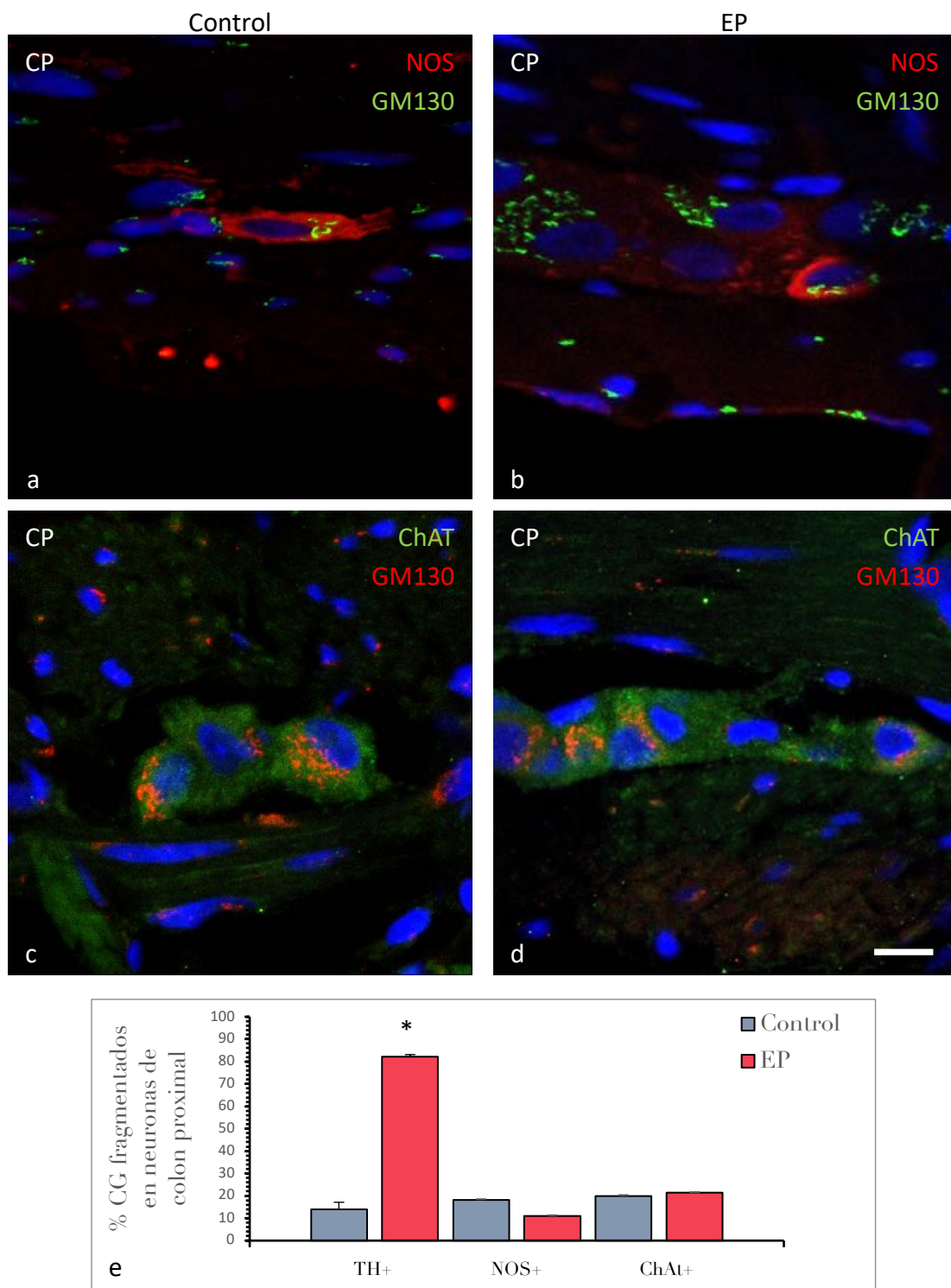


Figura 42.

2.7. Análisis de la distribución de proteínas involucradas en el tráfico de membranas en las neuronas dopaminérgicas

De igual forma que se realizó el estudio en muestras de SNpc, nos planteamos el estudio morfológico de la distribución de proteínas implicadas en el tráfico intracelular de membranas en las neuronas dopaminérgicas del SNE para valorar posibles cambios que pudieran estar relacionadas con los cambios descritos en la citoarquitectura del CG.

2.7.1. Syntaxina-5

La tinción de la syntaxina-5, proteína de la familia SNARE, reveló un patrón punteado con gran intensidad de fluorescencia en el citoplasma de neuronas dopaminérgicas del SNE de las muestras control de colon proximal (Figura 43 a). Este inmunomarcaje, disminuyó drásticamente en las neuronas dopaminérgicas del modelo hemiparkinsoniano inducido por 6-OHDA, donde el patrón de tinción observado fue más difuso y de menor intensidad (Figura 27 b). Este cambio en la intensidad de fluorescencia del inmunomarcaje observado en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal, también se observó en los plexos de muestras de colon distal (Figura 43 c, d). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia confirmó una disminución estadísticamente significativa del 55% en la intensidad de fluorescencia total de la proteína syntaxina-5 en las muestras de colon proximal y un 47% en las muestras de colon distal del modelo de la EP, con respecto a los controles. Este análisis se realizó mediante la prueba U de Mann Whitney, con un valor de $p < 0.05$ (Figura 43 e).

Figura 43. Imágenes representativas de la distribución de la proteína syntaxina-5 (sin-5) (verde) en el SNE de muestras de colon, mediante inmunofluorescencia por microscopía confocal y cuantificación de la intensidad de fluorescencia por análisis de imagen por ImageJ. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). El inmunomarcaje de la Sin-5 en muestras control (a, c) y en muestras del modelo inducido por 6-OHDA (EP) (b, d) muestra una reducción en la intensidad del marcaje en las neuronas TH positivas de los plexos nerviosos del colon proximal (CP) (b) y del colon distal (CD) (d) del modelo EP con respecto a los controles. Esta diferencia se verifica tras el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia, en la que se observa una disminución estadísticamente significativa en las muestras de colon proximal y las muestras de colon distal del modelo EP, con respecto a las muestras controles (valor arbitrario del 100%) (e). Los valores representan el porcentaje relativo de intensidad de fluorescencia ($\pm$ Error estándar de la media). Barra 10 μ m.

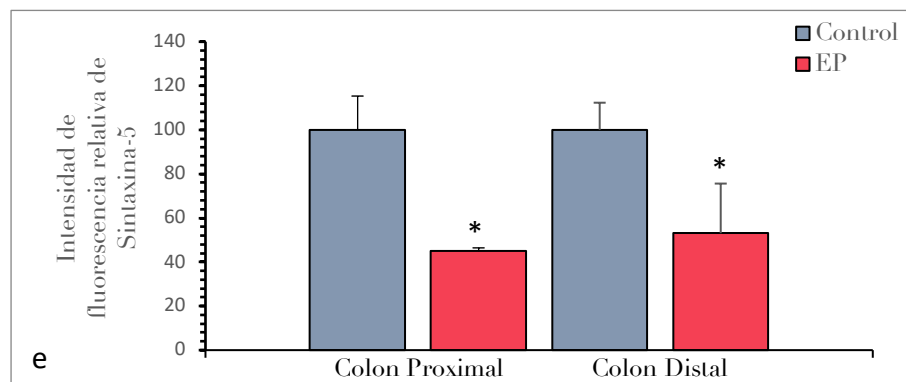
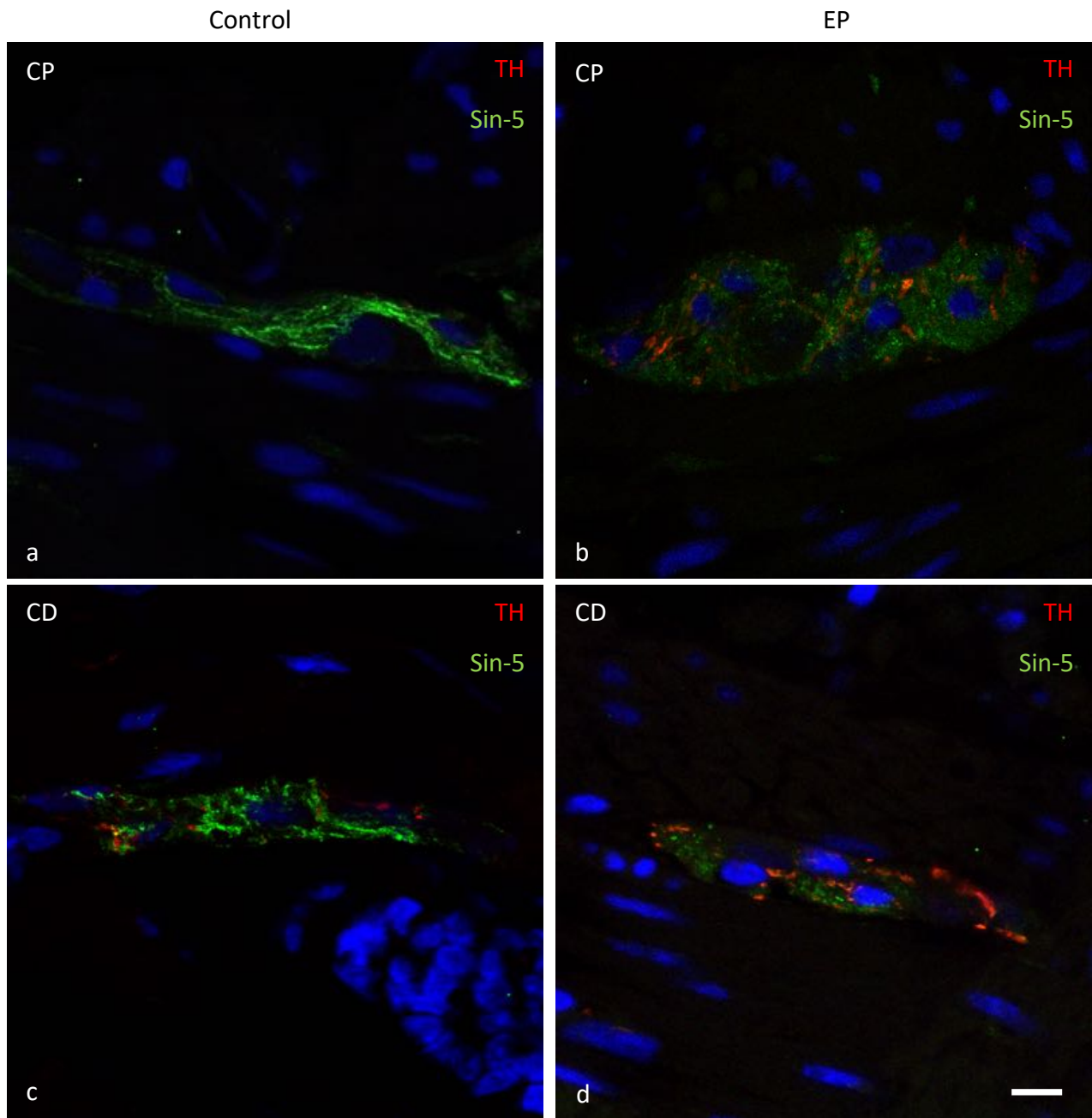


Figura 43.

2.7.2. Rab1a GTPasa

La inmunodetección de la proteína Rab1a GTPasa, en neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras control de colon proximal, mostró un mayor marcaje en la posición yuxtannuclear, debido a su localización anclada a la cara cis-Golgi, junto a un patrón citosólico difuso característico de la proteína (Figura 44 a). Las neuronas dopaminérgicas de los plexos en las muestras del modelo inducido por 6-OHDA, presentaron una mayor intensidad de fluorescencia en la región del CG, además del patrón citosólico, indicando una posible retención de la proteína en el orgánulo o un posible aumento de expresión de la Rab1a (Figura 44 b).

Este aumento de la intensidad del inmunomarcaje, se observó también tras el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia, resultando en un aumento del 17% en la inmunodetección de la Rab1a en las neuronas de los plexos de las muestras del modelo experimental inducido por 6-OHDA con respecto a los controles (Figura 44 e). Este resultado se repitió en el estudio de la proteína Rab1a en muestras de colon distal (Figura 44 c, d), donde se cuantificó un aumento del 20% en el nivel de intensidad de fluorescencia en las muestras EP con respecto a las muestras control (Figura 44 e). Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p > 0.05$) tras la prueba estadística de U de Mann-Whitney.

Figura 44. Imágenes representativas, tomadas por microscopía confocal, de la distribución de la proteína GTPasa Rab1a (rojo) por inmunofluorescencia en los plexos analizados del SNE de muestras de colon. Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (verde) y los núcleos marcados con DAPI (azul). El inmunomarcaje de Rab1a (rojo) muestra una distribución citosólica leve con mayor intensidad de marcaje en la región del CG en los plexos analizados de las muestras control (a, c). Este marcaje se hace más visible en muestras del modelo hemiparkinsoniano (b, d), indicando una posible retención en la región del CG o un posible aumento en la expresión de la proteína. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia del inmunomarcaje de la Rab1a (e) mediante análisis de imagen por ImageJ, muestra un ligero aumento no estadísticamente significativo, de la intensidad del inmunomarcaje en muestras del modelo de la EP inducido por 6-OHDA, tanto en el SNE del colon proximal (CP), como en el SNE del colon distal (CD) (U de Mann-Whitney, $p > 0.05$). Barra 10 μm .

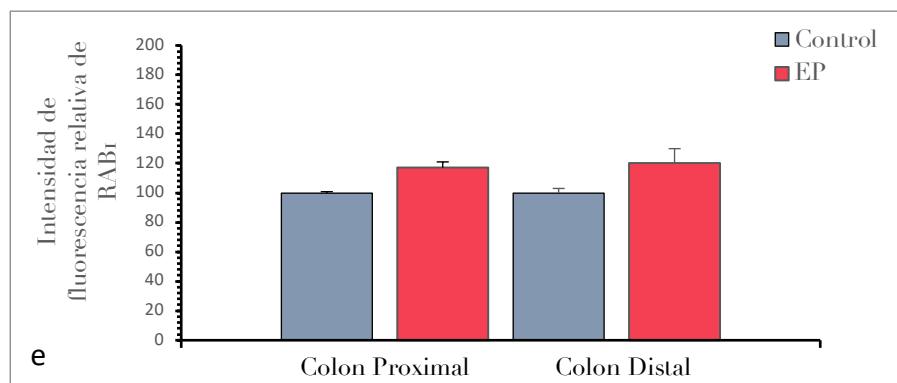
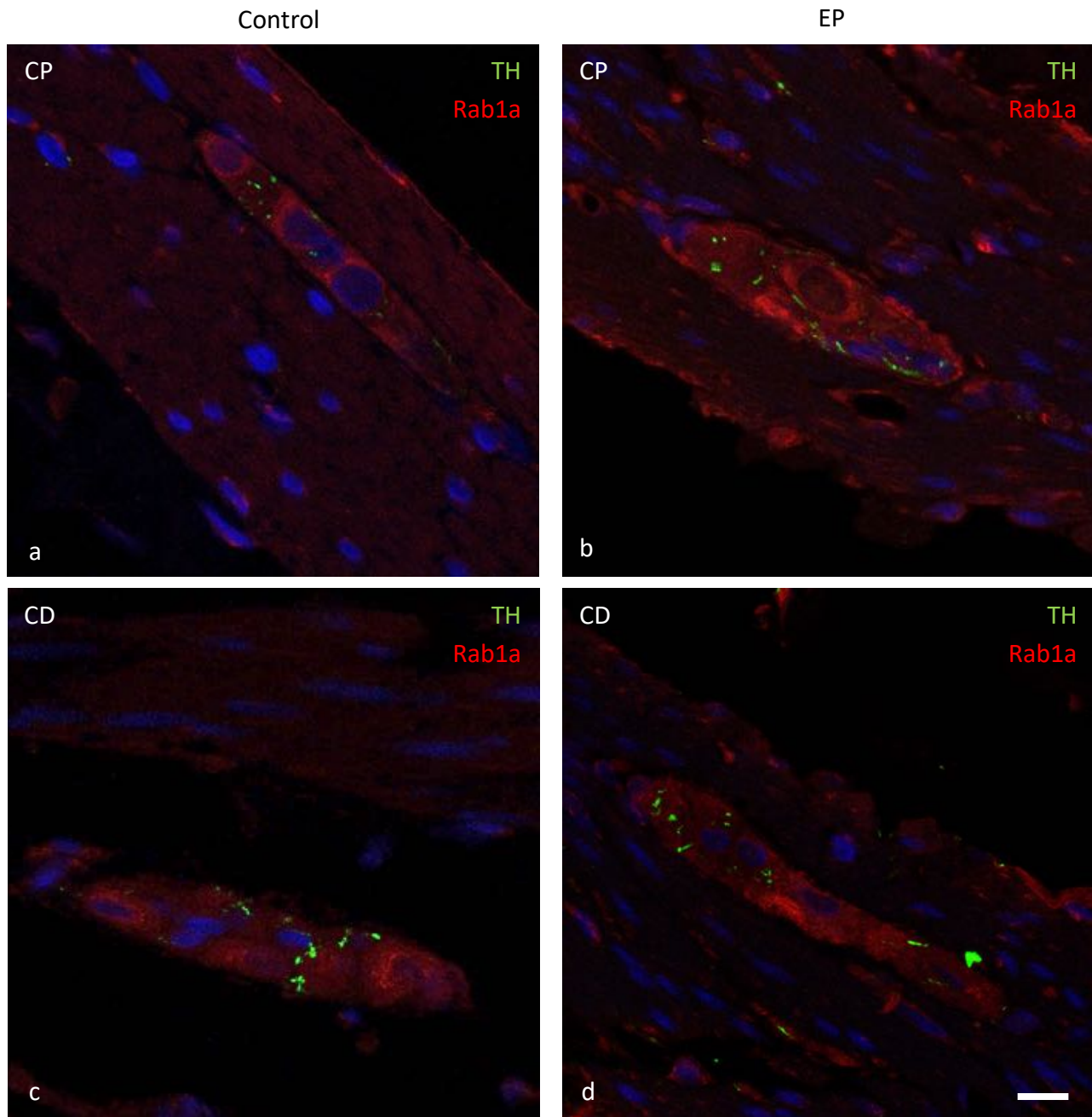


Figura 44.

2.7.3. GRASP65

El estudio de la distribución de la proteína GRASP65, mediante técnicas de inmunofluorescencia, en neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal reveló diferencias apreciables de tinción, similares a las observadas en las neuronas de la SNpc. El patrón de distribución de la proteína fue difuso por el citoplasma y con regiones de mayor intensidad fluorescente. Estas regiones se corresponden con la localización del CG alrededor del núcleo en las células control, debido a la formación del complejo GM130-GRASP65. Por el contrario, el inmunomarcaje de la GRASP65 ocupa una mayor área del citoplasma en las neuronas del modelo experimental de EP, reflejando una correspondencia con el patrón observado en la inmunodetección de GM130 para el estudio del CG (Figura 45 a, b).

El estudio cuantitativo de la intensidad de fluorescencia por célula analizada no reveló diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y del modelo inducido por 6-OHDA de colon proximal. A su vez, el análisis de la distribución de GRASP65 en las neuronas dopaminérgicas de las muestras de colon distal fueron similares a los observados en las muestras de colon proximal. El patrón de distribución de la proteína fue difuso por el citoplasma y con regiones de mayor intensidad fluorescente en las zonas perinucleares. Estas regiones de mayor intensidad corresponden a una localización del CG más compacta y alrededor del núcleo en las células control que, por el contrario, ocupa gran parte del soma, sin mostrar una tinción específica en las neuronas dopaminérgicas del modelo experimental de EP (Figura 45 c, d). En cuanto a los niveles de intensidad de fluorescencia, el análisis cuantitativo de esta proteína en las neuronas dopaminérgicas del SNE del modelo experimental no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a las neuronas dopaminérgicas del SNE de las muestras control (Figura 45 e). Estos resultados indican solo un cambio en la distribución de la proteína en las neuronas dopaminérgicas del SNE, tanto en plexos del colon proximal como distal, sin indicios de una alteración en la expresión de la GRASP-65.

Figura 45. Imágenes de microscopía confocal representativas de la inmunofluorescencia para la proteína GRASP65 (verde) en plexos de colon proximal (CP) (a, b) y colon distal (CD) (c, d). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). El patrón de distribución de la proteína GRASP65 muestra regiones de mayor intensidad de fluorescencia perinuclear en neuronas dopaminérgicas de las muestras control (a, c), mientras que el inmunomarcaje ocupa la mayor parte del citoplasma en las neuronas del modelo experimental de EP en ambos tramos de colon (b, d). (e) No se observan diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de fluorescencia relativa entre las muestras control y del modelo de EP, mediante análisis de imagen por ImageJ. Barra 10 μ m.

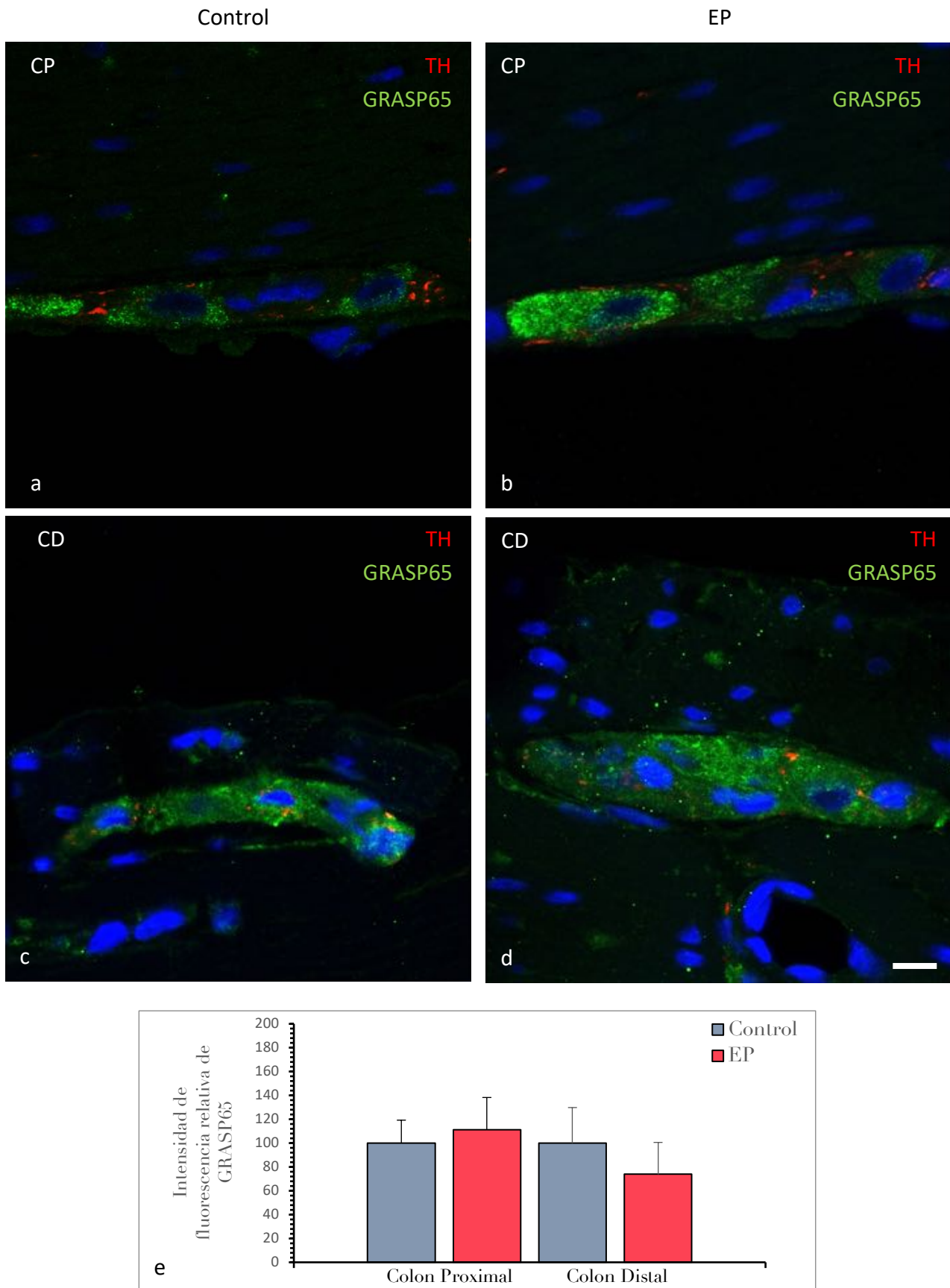


Figura 45.

2.7.4. β -tubulina III y neurofilamentos

Por último, analizamos la distribución de proteínas marcadoras de componentes del citoesqueleto en las neuronas dopaminérgicas del SNE. Con este propósito, realizamos el estudio de proteínas específicas de los microtúbulos y de los neurofilamentos, componentes clave del citoesqueleto involucrados en la citoarquitectura del CG y en el transporte intracelular. En el estudio en las neuronas dopaminérgicas de muestras control de colon proximal, la proteína β -tubulina III, específica de microtúbulos de neuronas, mostró un patrón intenso y fibrilar característico de los microtúbulos, en las neuronas de los plexos nerviosos. Este patrón lo observamos también en los plexos nerviosos de las secciones del modelo inducido por 6-OHDA, sin diferencias aparentes en el nivel intensidad de la fluorescencia con respecto a los controles (Figura 46 a, b). A su vez, el análisis realizado en las muestras de colon distal reveló el mismo patrón de distribución de la β -tubulina III en las neuronas dopaminérgicas de las muestras control y de las muestras del modelo inducido por 6-OHDA (Figura 46 c, d).

Figura 46. Imágenes de microscopía confocal representativas, del análisis morfológico por inmunofluorescencia de la proteína β -tubulina III (B-tub III) (verde) en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal (CP) y colon distal (CD). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Se distingue un marcaje fibrilar en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas de los plexos nerviosos analizados, no existiendo diferencias aparentes ni en la distribución ni en los niveles de intensidad de fluorescencia de la proteína entre las muestras obtenidas de los animales control y del modelo EP, por análisis de imagen por ImageJ. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (e), confirma que no existen diferencias estadísticamente significativas en el inmunomarcaje de la B-tub III entre las células analizadas. Los valores representan el porcentaje, en base a un valor arbitrario del 100% para muestras control ($\pm$ Error estándar de la media). Barra 10 μ m.

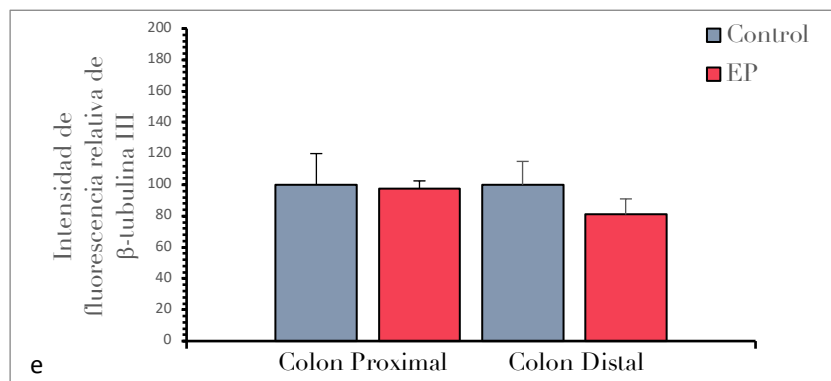
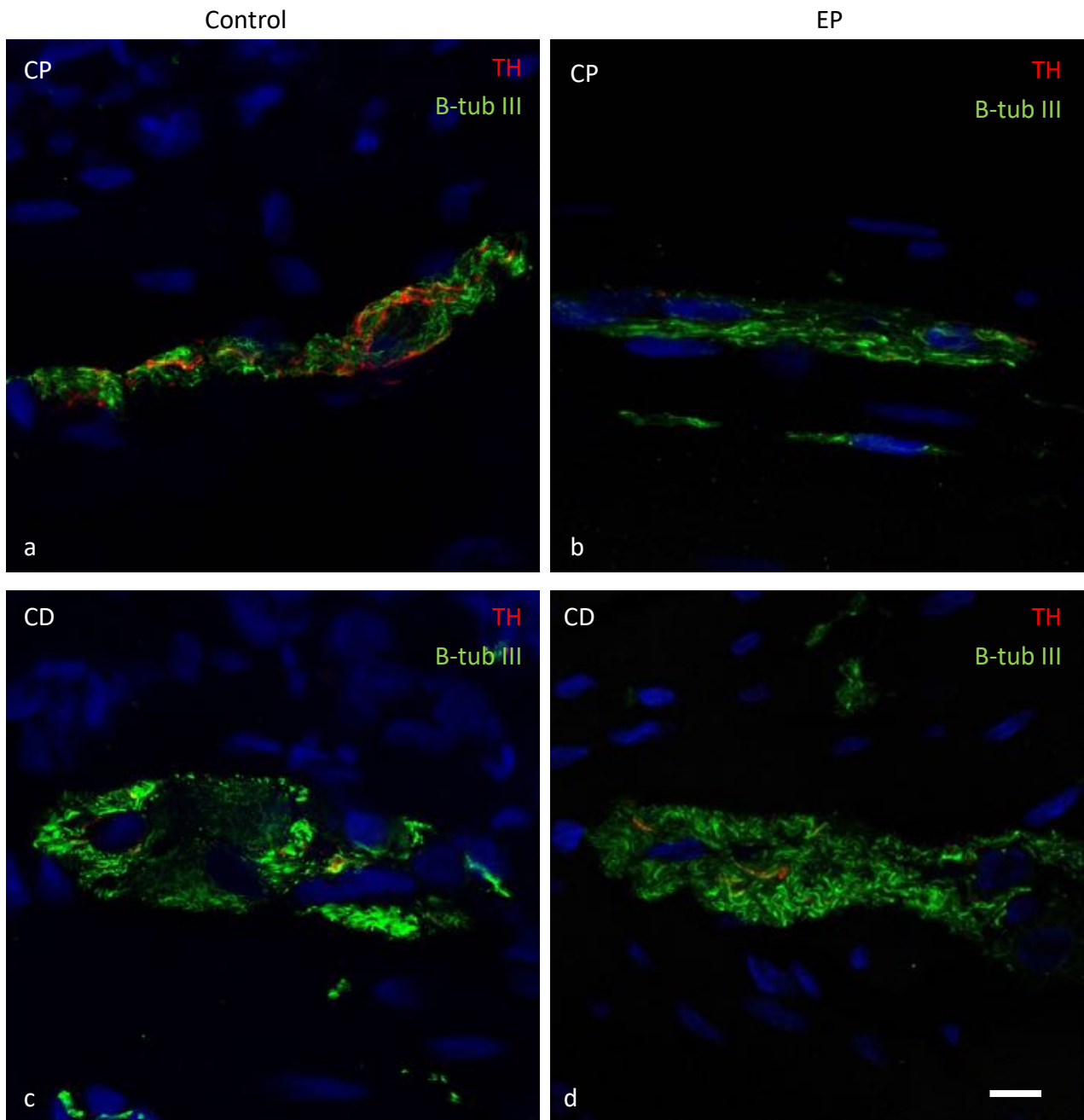


Figura 46.

Según las condiciones de este estudio, no parece existir diferencias morfológicas en la organización de los microtúbulos de las neuronas dopaminérgicas del SNE del modelo de la EP, siendo un resultado similar al observado en nuestro estudio de la SNpc. El análisis cuantitativo de los niveles de fluorescencia de la β -tubulina III en las neuronas dopaminérgicas del SNE, tanto de las muestras de colon proximal como de colon distal analizadas, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos de las muestras controles y de las muestras modelo experimental de la EP (Figura 46 e).

Finalmente, tras el inmunomarcaje de los neurofilamentos de las neuronas dopaminérgicas del colon proximal, se observó un patrón de distribución fibrilar característico, tanto en muestras control como en muestras del modelo experimental inducido por 6-OHDA (Figura 47 a, b). Esta distribución, se conservó en las muestras de colon distal, sin existir diferencias aparentes en la intensidad de fluorescencia entre muestras controles y muestras de nuestro modelo de EP (Figura 47 c, d).

Figura 47. Imágenes de microscopía confocal representativas, del análisis morfológico por inmunofluorescencia de los neurofilamentos (NF) (verde) en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal (CP) y muestras de colon distal (CD). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). La inmunodetección revela un marcaje fibrilar, no existiendo diferencias aparentes en la distribución ni en los niveles de fluorescencia entre muestras control y muestras EP por análisis de imagen por ImageJ. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (e), confirma que no existen diferencias estadísticamente significativas en el inmunomarcaje entre las células analizadas. Los valores representan el porcentaje, en base a un valor arbitrario del 100% para muestras control ($\pm$ Error estándar de la media). Barra 10 μ m.

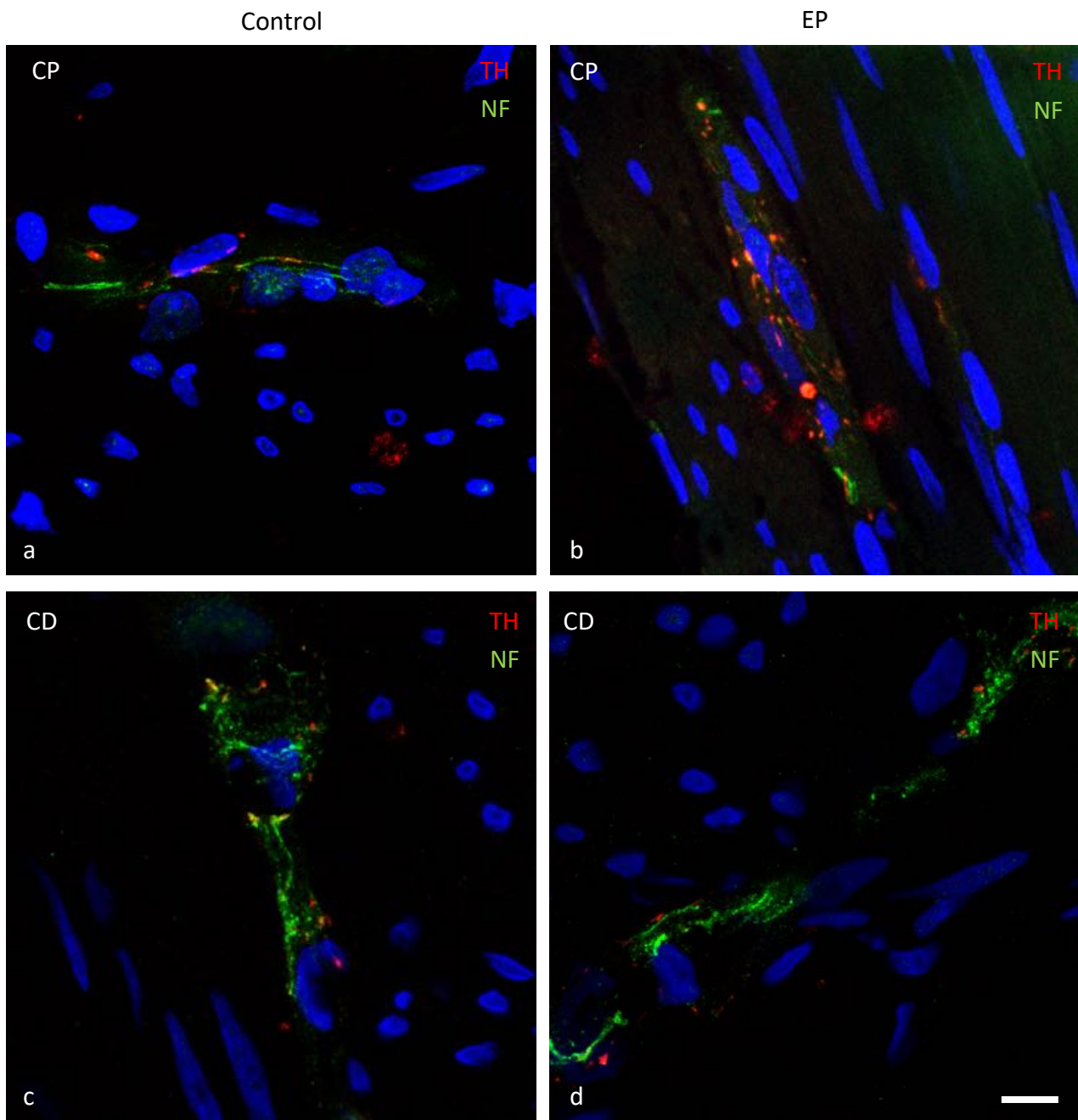


Figura 47.

2.8. Análisis de proteínas marcadoras de exosomas en neuronas dopaminérgicas

Debido a los recientes hallazgos sobre la localización de la proteína α -sinucleína a nivel extracelular, en asociación a vesículas sinápticas y exosomas, analizamos la implicación de estas estructuras vesiculares membranosas en los plexos del SNE, mediante un análisis morfológico de la distribución de proteínas marcadoras de exosomas, de acuerdo con la misma la línea de investigación seguida en las muestras de la SNpc. Para ello, analizamos la distribución de tres proteínas marcadoras de membrana y tráfico de exosomas, la Rab3a GTPasa, la tetraspanina CD63, y la Rab27a.

2.8.1. Rab3a GTPasa

La Rab3a GTPasa, proteína involucrada en la exocitosis neuronal post-CG, además de estar presente en la membrana de exosomas, interacciona con la proteína α -sinucleína en la membrana celular, teniendo la α -sinucleína un papel inhibidor en la hidrólisis de la Rab3a (Lv et al., 2022). En el caso del análisis de distribución de la proteína Rab3a, en el SNE de muestras de colon proximal de animales control, el inmunomarcaje de la proteína muestra una distribución punteada vesicular a nivel de citoplasma, en paralelo a una tinción homogénea y difusa en el citosol de las neuronas dopaminérgicas, patrón característico de la localización de esta proteína por su implicación en el transporte vesicular y en el proceso de la exocitosis (Figura 48 a). Mientras que en las neuronas dopaminérgicas del SNE de las muestras de colon proximal del modelo experimental de la EP (Figura 48 b), el patrón de distribución cambia, mostrando regiones de mayor intensidad a nivel citoplasmático.

Figura 48. Imágenes de microscopía confocal representativas de la inmunodetección mediante inmunofluorescencia de la Rab3a en plexos mientéricos de colon proximal (CP) (a, b) y colon distal (CD) (c, d). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (verde) y los núcleos marcados con DAPI (azul). La distribución de Rab3a en las neuronas TH positivas de las muestras control (a, c) revela un patrón punteado y homogéneo en el citoplasma, característico del proceso de exocitosis vesicular. En las neuronas TH positivas de las muestras de EP (b,d), se observa una mayor concentración del marcate intracitoplasmático en los plexos de las muestras de CP y CD. (e) Este resultado se confirma tras el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia por análisis de imagen por ImageJ. Los valores representan el porcentaje, en base a un valor arbitrario del 100% para muestras control ($\pm$ Error estándar de la media). Barra 10 μ m.

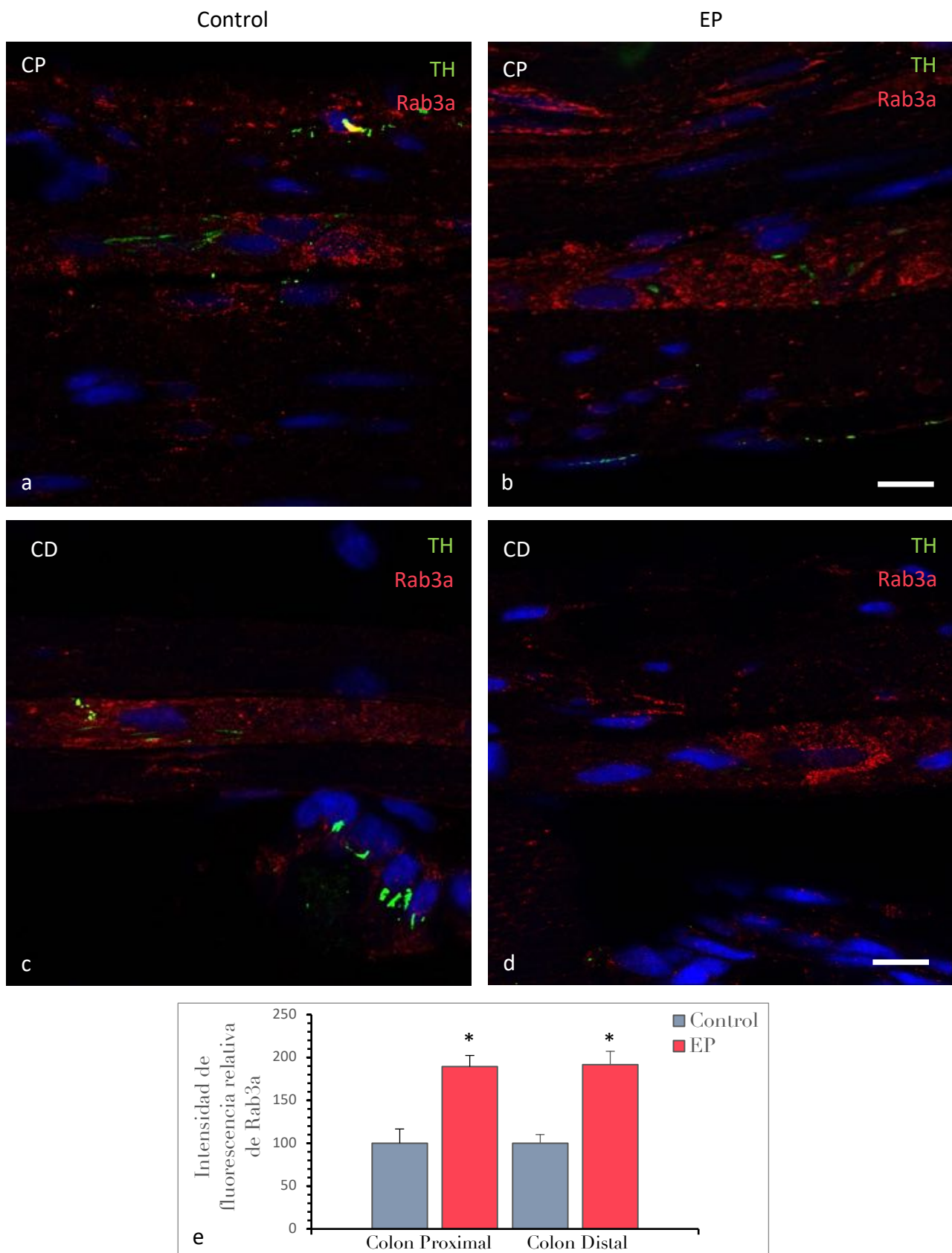


Figura 48.

Esto podría indicar un aumento de expresión o una retención de la proteína en estructuras subcelulares como es la región de salida del TGN, debido a una posible inactivación de la Rab3a por parte de la acumulación de α -sinucleína. Este patrón de distribución se repite en neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon distal (Figura 48 c, d). Este resultado, se verificó tras realizar un análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia. En las muestras de colon proximal, se detectó un aumento del 89% en la inmunodetección de la Rab3a en los plexos de las muestras del modelo experimental inducido por 6-OHDA con respecto a los controles, mientras que en las muestras de colon distal este aumento fue del 91%.

Esta diferencia en la intensidad del inmunomarcaje de la Rab3a, resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el estudio de los plexos de ambas secciones del colon, tras la prueba de U de Mann-Whitney (Figura 48 e).

2.8.2. CD63

Los resultados iniciales del estudio de la distribución de la CD63, proteína transmembrana presente en los exosomas, en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal y colon distal, fueron similares a los resultados obtenidos y descritos en la SNpc. El inmunomarcaje de la CD63, mostró un patrón característico citoplasmático con una distribución punteada y citosólica de la proteína, indicando un patrón vesicular en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas de los plexos (Figura 49 a, c). En muestras de colon proximal y colon distal del modelo hemiparkinsoniano inducido por 6-OHDA (Figura 49 b, d), el inmunomarcaje presenta un aumento de intensidad de fluorescencia en regiones específicas del citoplasma.

Figura 49. Imágenes de microscopía confocal representativas de la inmunofluorescencia de la proteína CD63 (verde) en plexos mientéricos de colon proximal (CP) y colon distal (CD) en muestras control (a, c) y del modelo inducido por 6-OHDA (EP) (b, d). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). La inmunodetección de CD63 en muestras control revela un patrón característico vesicular en el citoplasma con más intensidad de fluorescencia en la proximidad de la membrana plasmática (a, c), mientras que en las muestras EP, se observa una mayor tinción citosólica (b, d). Este resultado morfológico se confirma tras el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia mediante ImageJ (e). Los valores representan el porcentaje, en base a un valor arbitrario del 100% para muestras control ($\pm$ Error estándar de la media). Barra 10 μ m.

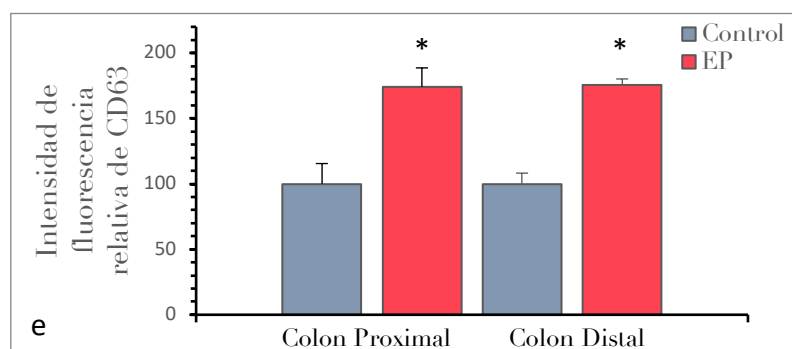
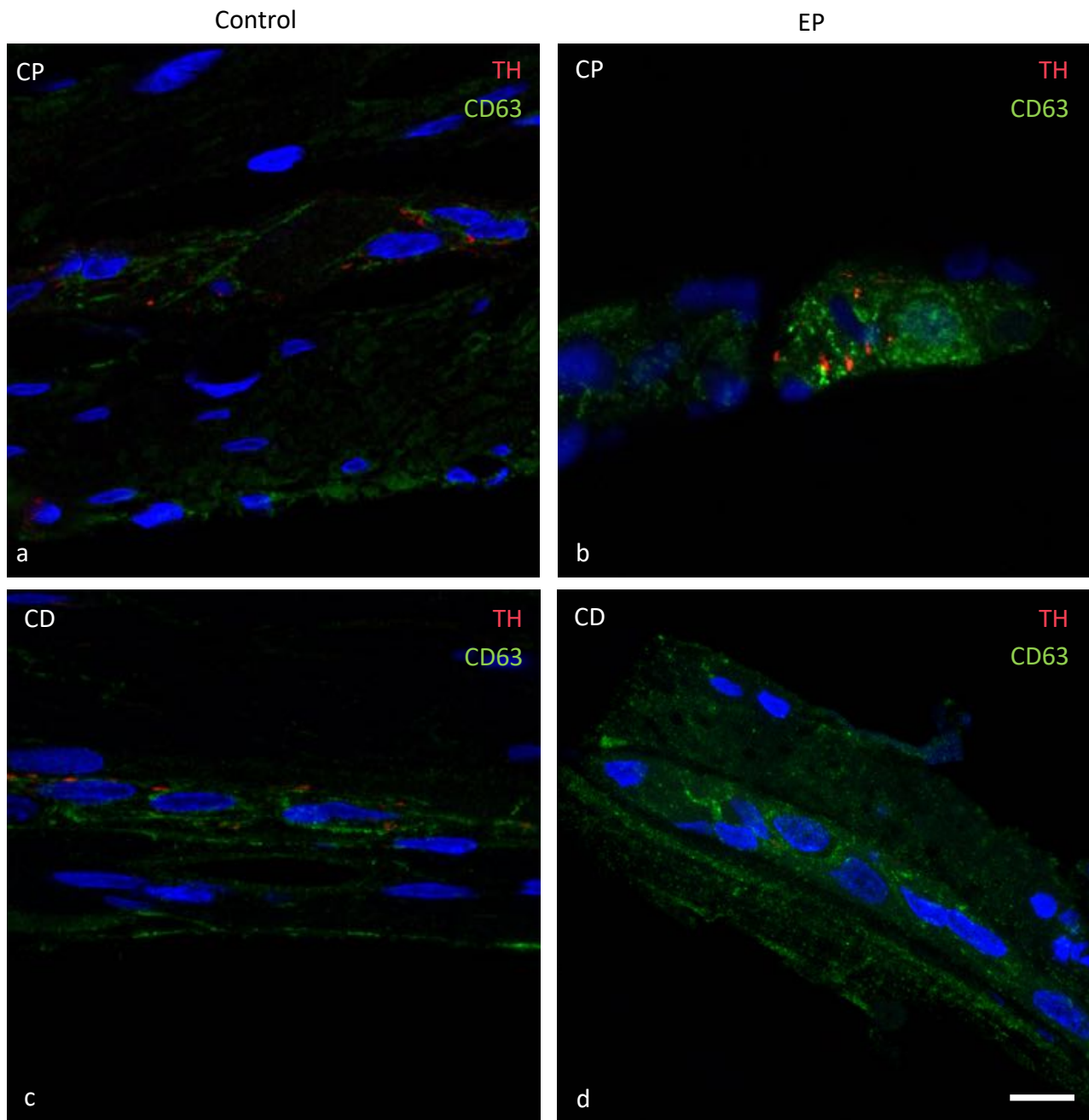


Figura 49.

Este resultado podría indicar la localización en vesículas que se están fusionando con la membrana plasmática para liberar su contenido y podría ser debida a la presencia de exosomas adheridos a la membrana para ser liberados al espacio extracelular. A su vez, este resultado podría deberse a una alteración en el transporte de exosomas, activación del proceso de secreción o una mayor expresión de la proteína que podría dar lugar a un mayor número de estos componentes vesiculares en los plexos nerviosos tanto en las muestras de colon proximal como de colon distal del modelo de EP.

Posteriormente, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia confirmó un aumento del 74% en el inmunomarcaje de CD63 en los plexos analizados de las muestras del modelo experimental inducido por 6-OHDA con respecto a los plexos analizados de las muestras de colon proximal en los controles, mientras que en los plexos de colon distal se observó un aumento del 75%. Esta diferencia en la intensidad del inmunomarcaje de la proteína CD63, resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en ambas secciones del colon, tras la prueba de U de Mann-Whitney (Figura 49 e).

2.8.3. Rab27a GTPasa

El análisis morfológico de la distribución de la GTPasa Rab27a en neuronas dopaminérgicas del SNE, mostró una tinción similar a la observada en las muestras de SNpc. En las muestras control, tanto en las secciones de colon proximal como de colon distal, el inmunomarcaje de la Rab27a mostró un patrón citosólico difuso y leve, con algunos punteados característicos del transporte vesicular, debido a la localización de esta proteína en la membrana de lisosomas, endosomas y exosomas (Figura 50 a, c). Esta distribución de la proteína, a su vez, pareció ser semejante en muestras del modelo inducido por 6-OHDA, sin cambios aparentes de distribución o intensidad del inmunomarcaje (Figura 50 b, d).

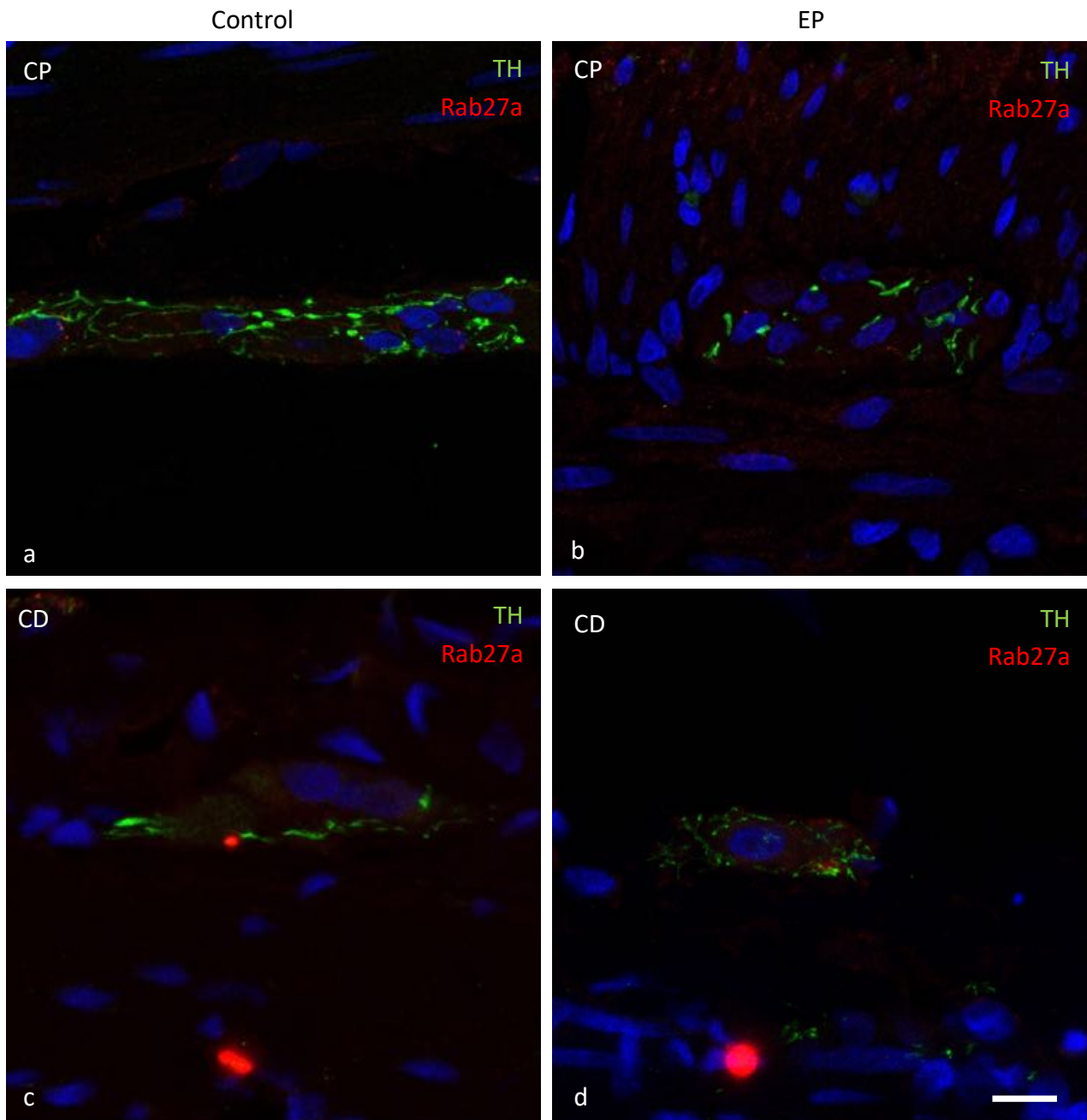


Figura 50. Imágenes de microscopía confocal representativas de la inmunofluorescencia de la proteína Rab27a (rojo) en plexos mientéricos de colon proximal (CP) y colon distal (CD) en muestras control (a,c) y del modelo inducido por 6-OHDA (EP) (b, d). Las neuronas dopaminérgicas están inmunomarcadas con TH (verde) y los núcleos marcados con DAPI (azul). La inmunodetección de Rab27a en muestras control revela un patrón vesicular y difuso en el citoplasma, sin diferencias aparentes entre las muestras control y las muestras del modelo de EP de colon proximal y colon distal. Barra 10 μ m.

VI

DISCUSIÓN

V. Discusión

1. La microinyección unilateral de 6-hidroxidopamina en la sustancia negra de rata como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson

Desde que se introdujo en 1968 (Ungerstedt, 1968) el uso de 6-OHDA para producir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc de rata, son múltiples las investigaciones que se han basado en este modelo para el estudio de la EP. La elección de esta toxina para producir el modelo de rata hemiparkinsoniana en nuestro estudio, ha aportado nueva información para el entendimiento de la citopatología relativa al tráfico intracelular tanto en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc como en las neuronas dopaminérgicas periféricas durante el desarrollo de la EP. Además, el uso de este modelo para el estudio de las neuronas dopaminérgicas como las principales neuronas catecolaminérgicas del SNE, ha permitido ampliar el conocimiento sobre el desarrollo de los mecanismos citopatológicos de la EP fuera del SNC.

La identificación y el estudio de las neuronas dopaminérgicas en lugar de otros tipos neuronales para comprender la citopatología de la EP en el SNC y en el SNE, es fundamental, no solamente debido a que la degeneración de las neuronas dopaminérgicas es una característica central de la EP. Según los estudios previos, las neuronas dopaminérgicas serían las únicas neuronas catecolaminérgicas presentes en el SNE, debido a que las neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas estarían limitadas a las terminaciones nerviosas simpáticas extrínsecas (Natale et al., 2021). En este contexto, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el SNE estaría estrechamente relacionada con un déficit dopaminérgico en pacientes de la EP, que explicaría alteraciones en funciones como la regulación de la motilidad y de la secreción gastrointestinal. En nuestro modelo experimental de la EP, investigaciones anteriores indican que el tiempo necesario para que se produzcan los primeros síntomas característicos de la EP tras la microinyección unilateral de 6-OHDA en la SNpc, es de al menos dos semanas, en nuestro trabajo, tras 15-21 días, la muerte celular observada fue del 39%, por lo que fue consistente con otros estudios en condiciones similares (Campos et al., 2013; Su et al., 2018).

Anteriormente se ha descrito que los procesos de inflamación y las alteraciones en el sistema inmune, están presentes en el desarrollo de la patofisiología de la EP, existiendo evidencia de que las enfermedades inflamatorias crónicas del sistema digestivo incrementan el riesgo de padecer enfermedades como la EP (Cui et al., 2023). En nuestro estudio, la evaluación de las células gliales en la SNpc mediante el inmunomarcaje de la proteína GFAP, nos reveló un aumento estadísticamente significativo del 40% en la inmunodetección de esta proteína en el hemisferio lesionado tras la microinyección de 6-OHDA.

La activación de la neuroglia se considera como un indicador de disfunción neuronal y de neurodegeneración, pero también es una respuesta a cualquier daño cerebral. El papel neuroprotector o neurodegenerativo de las células gliales en el transcurso de la EP, ha sido objeto de discusión en las últimas décadas. En algunos estudios, como los llevados a cabo por Wachter et al. (2010) y Walsh et al. (2011), se ha observado que la activación de la microglía precede a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Este efecto, puede desencadenar la liberación de moléculas proinflamatorias y neurotóxicas, exacerbando la neurodegeneración en la EP (Domingues et al., 2020). Sin embargo, investigaciones recientes en el modelo inducido por 6-OHDA, sugieren que la activación de la neuroglía produce la liberación de factores neurotróficos como el BDNF, ejerciendo una labor de protección ante la neurodegeneración producida por esta toxina (Datta et al., 2018).

A pesar de este debate, la proliferación de las células gliales en la EP es un fenómeno que se ha descrito en múltiples estudios en el modelo inducido por 6-OHDA (Batassini et al., 2015; Wachter et al., 2010; Walsh et al., 2011; Zhu et al., 2017). Este efecto citopatológico sobre la población de células gliales, junto con la degeneración de neuronas dopaminérgicas observada en las muestras de SNpc de nuestro modelo, indican la validez del modelo inducido por 6-OHDA para la reproducción de los eventos citopatológicos iniciales en la EP.

2. La proteína α -sinucleína en la sustancia negra pars compacta como indicador de la enfermedad de Parkinson

En nuestro modelo hemiparkinsoniano inducido por 6-OHDA, no se observaron cuerpos de Lewy, siendo esta una característica común descrita en otros estudios en el mismo modelo (Matsui et al., 2010; Vercammen et al., 2006), y también

en algunos casos de muestras post-mortem de pacientes (Gaig et al., 2009; Johansen et al., 2018), por lo que su utilidad como biomarcador para la EP, es limitada.

A pesar de no identificar agregados similares a cuerpos de Lewy, tras el inmunomarcaje de la α -sinucleína en la SNpc, observamos un cambio de distribución y/o organización de la proteína, apreciándose por la técnica de inmunofluorescencia, un marcaje puntiforme citoplasmático con una elevada concentración de “puntos fluorescences” en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado con 6-OHDA en contraste al patrón fluorescente citosólico observado en las células del hemisferio control.

Este cambio de distribución puede deberse a una posible alteración en el plegamiento de la α -sinucleína, como se ha observado en otros estudios, dónde la forma monomérica de la proteína disminuye drásticamente, debido a la formación de formas oligoméricas y poliméricas fibrilares. Los oligómeros se consideran formas patogénicas de la proteína, siendo formas reversibles altamente tóxicas para las células, ya que pueden interactuar con las membranas lipídicas, alterando la permeabilidad y conduciendo a la disrupción celular (Espay y Lees, 2024). Además, estas formas oligoméricas, interrumpen el tráfico axonal y sináptico, exacerbando el daño celular (Lashuel et al., 2013). A su vez, las formas fibrilares de la α -sinucleína, son formas intermedias más avanzadas en el proceso de agregación de la proteína, formadas por cadenas de oligómeros de α -sinucleína que empiezan a adquirir un mayor grado de organización estructural, pudiendo ser citotóxicas para la célula, pero en menor medida que las formas oligoméricas iniciales. Estas formas fibrilares, a pesar de ser las formas previas los cuerpos de Lewy, actualmente se consideran menos dañinas para la célula debido a su mayor estabilidad estructural, considerándose las formas oligoméricas las principales responsables de la degeneración neuronal durante el proceso de agregación (Winner et al., 2011).

En contraste con este resultado, es llamativa la reducción en la expresión total de la α -sinucleína tras el análisis cuantitativo mediante Western-blotting, ya que múltiples estudios tras la administración de 6-OHDA, reportan un aumento estadísticamente significativo en la expresión de la α -sinucleína en el cuerpo estriado y/o en la SN (Athari et al., 2023; Cui et al., 2023). Sin embargo, una característica común de estos estudios es un mayor tiempo de estabulación tras la microinyección unilateral de 6-OHDA.

Estudios anteriores han descrito que el efecto citopatológico de la 6-OHDA es dependiente del tiempo transcurrido desde la microinyección de la toxina (Alvarez-Fischer et al., 2008; Dovonou et al., 2023; Rentsch et al., 2019) y que el aumento o disminución en la expresión de la α -sinucleína es dependiente de la dosis de 6-OHDA y del lugar en el que se origina la lesión dopaminérgica (Ganapathy et al., 2016; Zeng et al., 2002).

En este contexto, en el estudio llevado a cabo por Zeng et al. (2002), donde se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de α -sinucleína tras la microinyección de 6-OHDA en SNpc, en el cuerpo estriado y en el núcleo accumbens, se detectó una menor expresión del mRNA en la SNpc en comparación con las otras dos zonas del SNC, siendo un resultado similar al obtenido en nuestro estudio. Además, en estos casos, el tiempo para la producción de la lesión dopaminérgica antes del sacrificio y extracción del tejido, es de 21-35 días o superior (Kim et al., 2022; Solis et al., 2007), mientras que, en nuestro estudio, para observar las alteraciones iniciales en la citopatología de la EP, el tiempo estimado fue entre 15-21 días. Este menor tiempo de estabulación, se podría relacionar con la disminución en el nivel de expresión de la α -sinucleína detectada en nuestro modelo, ya que estudios previos en modelos celulares y animales, como los llevados a cabo por Oaks, Frankfurt, et al., (2013) y Oaks, Marsh-Armstrong, et al., (2013), indican que la acumulación de la α -sinucleína intracelular no es un evento citopatológico temprano en la EP, sino que se produce de forma progresiva en el transcurso de la citopatología, y que esta, además, estaría vinculada a la interrupción del transporte RE-CG. Por lo que un menor nivel de expresión de la α -sinucleína en nuestro estudio, podría deberse a la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, mientras que la sobreproducción de α -sinucleína observada habitualmente en las neuronas dopaminérgicas supervivientes, podría deberse a una respuesta compensatoria ante esta neurodegeneración, o a una acumulación debida a la interrupción del propio tráfico intracelular de proteínas.

Cabe destacar, que en el ensayo llevado a cabo por Alvarez-Fischer et al. (2008), los ratones modificados genéticamente para inactivar la síntesis de α -sinucleína, eran más resistentes a la neurodegeneración provocada por la 6-OHDA, sugiriendo que es poco probable que la sobreexpresión de la α -sinucleína sea un mecanismo compensatorio ante la citopatología, sino más bien una consecuencia de

los procesos citopatológicos que se producen durante la neurodegeneración, como la fragmentación del complejo de Golgi y/o la interrupción del transporte intracelular.

3. La fragmentación del complejo de Golgi en las neuronas dopaminérgicas como sello citopatológico de la enfermedad de Parkinson.

3.1. ¿Causa o consecuencia de la muerte celular?

Uno de los eventos citopatológicos más notables en las neuronas dopaminérgicas de la SN afectadas de la EP, es la fragmentación del CG (Coune et al., 2011; Fujita et al., 2006; Furlong et al., 2020; Gosavi et al., 2002; Kim et al., 2022; Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021). El CG es un orgánulo esencial en el transporte intracelular, siendo el responsable de las modificaciones post-traduccionales y la clasificación de proteínas y lípidos antes de su destino final. Mientras que la fragmentación del CG es un evento fisiológico habitual durante la mitosis, se ha documentado como un fenómeno patológico temprano en las enfermedades neurodegenerativas como la EP, la esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Alzheimer (Coune et al., 2011). Esta citopatología ha suscitado un considerable interés en la comunidad científica, ya que se encuentra en debate si esta fragmentación es una causa primaria de la degeneración neuronal o una consecuencia de los procesos celulares de apoptosis que ocurren en la EP.

Cuando se desencadena el mecanismo fisiológico de la apoptosis, este involucra una cascada de caspasas (caspasa-3,7,8,9) que promueven la desintegración de la matriz proteica del CG, a través de la degradación de proteínas estructurales como la GM130, la giantina, la P115, la GRASP-65 o la syntaxina-5 (He et al., 2020). La fragmentación del CG por apoptosis es un proceso irreversible, mientras que, en modelos de la EP, la fragmentación es parcialmente reversible a partir de la sobreexpresión de proteínas reguladoras del transporte y estructura del CG, como son la Rab1 o la GRASP65 (Coune et al., 2011; Rendón et al., 2013; Shirai y Yamauchi, 2024). Además, a nivel estructural también existen diferencias morfológicas en la fragmentación del CG entre los procesos de apoptosis y de estrés.

Estudios sobre la citoarquitectura del CG durante el proceso de apoptosis, han revelado que la desintegración de proteínas estructurales del orgánulo por la

acción de caspasas conlleva una fragmentación total del CG en vesículas pequeñas (Chiu et al., 2002). Mientras que la fragmentación del CG debido al estrés celular, como el inducido por agentes que alteran el tráfico vesicular o por condiciones como la hipoxia o el estrés del RE, origina estructuras tubulares o ministacks, sin la desintegración de las proteínas estructurales claves en el CG (Machamer, 2015; Rendón et al., 2013). Por lo que, actualmente, existe evidencia de que la fragmentación del CG en las enfermedades neurodegenerativas como la EP, muy probablemente no sea debida a procesos apoptóticos, o a un estrés secundario del RE, sino al plegamiento erróneo de proteínas, a la presencia de proteínas mutantes que desencadenan este fenómeno o a un desajuste en los niveles de las proteínas reguladoras del tráfico intracelular, como las proteínas SNARE o Rab GTPasas (Gonatas et al., 2006; Martínez-Menárguez et al., 2019).

En nuestro estudio, observamos un claro aumento estadísticamente significativo, del número de neuronas dopaminérgicas con el CG fragmentado en la SNpc del hemisferio lesionado, en comparación con el hemisferio control. A su vez, al no producirse cuerpos de Lewy en el modelo inducido por 6-OHDA, este fenómeno podría considerarse previo a la formación de las inclusiones, siendo un resultado similar al descrito anteriormente por nuestro grupo en el modelo celular de la EP (Rendón et al., 2013).

Además, nuestros resultados del análisis ultraestructural de la citoarquitectura del CG mediante microscopía electrónica de transmisión nos confirmaron la fragmentación del CG en ministacks en las neuronas de la SNpc de las muestras del modelo inducido por 6-OHDA. Estos resultados morfológicos indican que la fragmentación del CG puede no deberse a la acción de agentes proapoptóticos como las caspasas, cuya acción concluye en la desintegración de la matriz del orgánulo. Algunos autores indican que la fragmentación del CG en ministacks, puede deberse a un intento de compensación en el transporte intracelular ante eventos de estrés previos a la apoptosis (Hicks y Machamer, 2005; Li et al., 2019).

Los estudios más recientes apuntan a que las formas prefibrilares de la α -sinucleína, penetran en el CG para ser transportadas en vesículas y que son estas formas, las que causarían la fragmentación del CG (Serratos et al., 2022). Recientemente, en un modelo celular de la EP, se ha descrito la unión anómala de la α -sinucleína con la proteína GM130, inhibiendo la formación de complejos GM130-

p115 y GM130-Rab1a, necesarios para el transporte de vesículas intra-Golgi mediado por COPII, esta alteración, a su vez, se ha vinculado con la fragmentación del CG (B. Huang et al., 2021; Mazzulli et al., 2016). En este contexto, estas formas anómalas o agregadas de la α -sinucleína, inducen una respuesta ante proteínas mal plegadas en el CG, provocando un estrés en el orgánulo, que induciría finalmente a la apoptosis celular (Bigi et al., 2023). Los últimos estudios apuntan a que la fragmentación del CG reversible por respuesta a estrés estaría mediada por quinasas tales como Cdc2, GSK3 β , RAF/MEK1/ERK1c, Plk1, Plk3. Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce esta respuesta ante un estrés en el CG no se ha dilucidado actualmente (Shirai y Yamauchi, 2024).

Cabe destacar, que se ha descrito anteriormente la presencia de las formas prefibrilares de la α -sinucleína en la SN tras 15 días desde la microinyección unilateral de 6-OHDA en el modelo animal de rata (Hadi et al., 2021), y que estudios recientes indican que la fragmentación del CG sería un evento previo a la formación de inclusiones y cuerpos de Lewy (Gosavi et al., 2002; Rendón et al., 2013).

Estos hallazgos junto con los resultados obtenidos en nuestro estudio, tras el análisis morfológico y bioquímico de la proteína α -sinucleína y de la citoarquitectura del CG, refuerzan la teoría de que las alteraciones en el tráfico intracelular y en la estructura del CG serían eventos citopatológicos tempranos en la EP.

3.2. La alteración en la expresión de proteínas implicadas en el tráfico intracelular y el complejo de Golgi en la búsqueda de nuevas dianas moleculares

Tras el estudio de la citoarquitectura del CG en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, procedimos al análisis morfológico y bioquímico de proteínas involucradas en la homeostasis de este orgánulo y de la regulación del transporte intracelular, relacionadas con la citopatogénesis de la EP.

La organización de la estructura del CG se mantiene por medio de un entramado complejo que incluye proteínas de la matriz del Golgi (GRASP55, GRASP65, GM130, Giantin, entre otras golginas), proteínas de anclaje, miembros de la familia de las Rab GTPasas, proteínas SNARE asociadas al CG, proteínas involucradas en la interacción del CG con el citoesqueleto y proteínas de señalización, entre otras (Fan et al., 2008; Gonatas et al., 2006; Martínez-Menárguez et al., 2019).

A partir de los análisis genéticos y los estudios experimentales, se ha evidenciado una fuerte vinculación entre la citopatología de la EP y alteraciones en estas proteínas asociadas al transporte intracelular (Abeliovich y Gitler, 2016). Análisis morfológicos como el llevado a cabo por (Shahmoradian et al., 2019) utilizando técnicas de microscopía electrónica para el análisis ultraestructural de los cuerpos de Lewy, han revelado que estos estarían compuestos por abundante material membranoso agregado, con membranas que parecen originarse de vesículas y orgánulos fragmentados, incluidas las mitocondrias. Estas observaciones corroboran la idea de que la patología de los cuerpos de Lewy en la EP podría estar asociada con un trastorno generalizado del tráfico intracelular y de la citoarquitectura del CG, como consecuencia de un estrés vinculado a la acumulación o a la agregación de la α -sinucleína.

Por ello, en nuestro estudio, se analizaron algunas de las proteínas esenciales y reguladoras de la citoarquitectura del CG y del tráfico de membranas, para examinar las posibles alteraciones morfológicas y su posible impacto en la fragmentación del CG y en la degeneración neuronal. Los resultados obtenidos, mostraron que el mayor efecto citopatológico producido en las proteínas vinculadas al transporte intra-Golgi en la SNpc de nuestro modelo de la EP, fue el observado en la SNARE sintaxina-5 y en la proteína Rab1a GTPasa.

Sintaxina-5

En el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, estudios recientes en modelos celulares y animales, han revelado que tanto la sobreexpresión como la delección de la proteína SNARE sintaxina-5 produce la fragmentación del CG (Kat et al., 2022; Suga et al., 2005, 2015, 2022; Zhao et al., 2015), sugiriendo, además, que debe interferir en la modulación de la respuesta al estrés en este orgánulo.

El análisis cualitativo y cuantitativo del inmunomarcaje y de la expresión de la sintaxina-5 en la SNpc, nos reveló una disminución estadísticamente significativa de esta proteína en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio lesionado con 6-OHDA con respecto al hemisferio control.

La syntaxina-5, es una SNARE presente en el transporte anterógrado y retrógrado entre el RE-CG asociada a las vesículas COPII, en el transporte retrógrado entre cisternas intra-Golgi mediado por vesículas COPI y en el transporte retrógrado de endosomas al TGN formando complejos con SNARE con otras proteínas como GosR1, Bet1 y Ykt6 (Linders et al., 2019). En los estudios llevados a cabo por Linders et al. (2020) y Renna et al. (2011), se observó en modelos celulares, que la depleción de la syntaxina-5 en un modelo celular en fibroblastos, producía alteraciones en la estructura del CG, en el proceso de glicosilación y en la autofagia. En la EP, la disrupción de la glicosilación y la autofagia, ambos procesos estrechamente regulados por la actividad del CG en la vía secretora impiden la degradación de sustratos por la vía lisosomal, favoreciendo la acumulación de compuestos citotóxicos como la α -sinucleína. Otros estudios, indican que ante procesos de estrés en el RE y en el CG, se produce una sobreexpresión de la syntaxina-5 (Suga et al., 2015, 2022).

Si bien, estos resultados son similares a los observados por nuestro grupo de investigación en muestras post-mortem de SNpc de pacientes de EP, dónde se observaron acumulaciones ricas en syntaxina-5, similares a las placas amiloides presentes en la enfermedad de Alzheimer, esta agregación y/o sobreexpresión de la SNARE syntaxina-5, podría ser resultado del proceso de agregación proteica resultante de la interrupción del transporte intracelular o como mecanismo de sobrecompensación ante el estrés en el CG (Tomás et al., 2021). En estudios previos de nuestro grupo de investigación, utilizando un modelo celular de la EP, analizamos el efecto de la sobreexpresión y la delección de la syntaxina-5 sobre la citoarquitectura del CG, y observamos que solo se producía una restauración de la morfología del orgánulo en las células que se modificaron para eliminar la expresión de esta SNARE (Rendón et al., 2013). Por lo que es poco probable que la sobreexpresión o acumulación de la syntaxina-5 observada en muestras post-mortem de pacientes de la EP y en modelos celulares, sea dada como un mecanismo de compensación ante la disrupción de la citoarquitectura del CG, sino más bien como un producto de la interrupción del transporte intracelular.

Por tanto, la disminución en la expresión de la syntaxina-5 encontrada en nuestro modelo podría estar relacionada directamente con la alteración inicial en la citoarquitectura del CG y en el proceso de exocitosis, pudiendo favorecer la acumulación de compuestos citotóxicos como la α -sinucleína.

Rab1a

La fragmentación del CG en modelos celulares de la EP es un fenómeno que se revierte con la sobreexpresión de la Rab1a GTPasa (Coune et al., 2011; Galea et al., 2015; Saraste, 2016). Si bien la sobreexpresión de Rab1a no puede detener completamente la neurodegeneración, mejora la función motora en modelos animales de la EP (Coune et al., 2011). La LRRK2, una de las proteínas que más se han vinculado con el desarrollo de la EP, en concreto, la LRRK2 con la mutación G2019A, interactúa y fosforila a la Rab1a, favoreciendo la neurodegeneración en modelos celulares (Caracci et al., 2019), indicando la importancia de esta GTPasa en el mantenimiento de la citoarquitectura del CG y del tráfico intracelular en la citopatología de la EP.

La Rab1 es una pequeña GTPasa que juega un papel crucial en el transporte vesicular entre el RE y el CG, así como en el mantenimiento de la estructura y función del CG. Esta proteína se localiza principalmente anclada a las cisternas de las regiones cis y medial del Golgi. Su principal función reside en la regulación de la formación de vesículas en el RE, su transporte a través del ERGIC y el CG (Saraste, 2016).

El estudio morfológico de la distribución de la Rab1a GTPasa, mostró diferencias significativas en el marcaje de la proteína entre las muestras de SNpc del hemisferio control y el hemisferio modelo de la EP. En este caso, observamos como el patrón yuxtannuclear y citosólico característico de la proteína en las neuronas dopaminérgicas del hemisferio control, cambiaba a una marcaje de pequeños agregados. Esta distribución, estaría principalmente vinculada a la fragmentación del CG en cuyas membranas se encuentra anclada la Rab1a GTPasa. Además, en nuestro estudio, el análisis cuantitativo de la señal de inmunofluorescencia reveló un aumento en la intensidad del inmunomarcaje en la región perinuclear, que posteriormente se confirmó mediante análisis bioquímico de la expresión de la Rab1a en la SNpc.

Por lo que concluimos que en el modelo de rata hemiparkinsoniana inducido por 6-OHDA, al igual que en estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en el modelo celular inducido por 6-OHDA y en muestras post-mortem de SNpc de pacientes con la EP (Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021), la Rab1a se encuentra ligeramente sobreexpresada en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc afectadas de la EP. Este dato, no es sorprendente, debido a que la Rab1a, es una GTPasa que se ha vinculado fuertemente con la fragmentación del CG y el

progreso de la citopatología de la EP. El mecanismo por el cual la Rab1a interviene en la recuperación de la estructura del CG, reside en su interacción con varias proteínas de anclaje y complejos unión intra-Golgi, como son p115 y GM130, que facilitan la fusión de vesículas y la organización de las cisternas del CG (Saraste, 2016).

Nuestros resultados apoyan la teoría de que la sobreexpresión de esta proteína en la SNpc, puede ser resultado de un mecanismo de compensación ante la fragmentación del CG, pudiendo ser esta última, debida a la presencia de las formas oligoméricas citotóxicas de la α -sinucleína en la EP, previas a la formación de cuerpos de Lewy, que interrumpen el tráfico de proteínas en el orgánulo (Cooper et al., 2006; Coune et al., 2011; Lashuel y Hirling, 2006; Rendón et al., 2013), o a otras condiciones citopatológicas como la desregulación de otras proteínas vinculadas al transporte intracelular. Además, se ha observado que la fragmentación del CG causa un déficit lisosomal, que afectaría a la actividad de degradación proteica por medio de enzimas proteolíticas como la catepsina-D, favoreciendo la acumulación de proteínas como la dopamina o la α -sinucleína (Sevlever et al., 2008).

GRASP65

Otra de las proteínas alteradas en las muestras del modelo de EP, fue la GRASP65. A pesar de existir diversos estudios que analizan el papel de la GRASP65 como proteína de anclaje esencial en la estructura del CG, son escasos los trabajos de investigación en la EP que incluyen un análisis de esta proteína. Siendo este estudio, a nuestro conocimiento, el primero en el que se evalúa la GRASP65 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, en el modelo hemiparkinsoniano de rata inducido por 6-OHDA.

La GRASP65 es una proteína de anclaje presente en el cis-Golgi en estrecha vinculación con la GM130, y cuya depleción o fosforilación tiene como consecuencia la fragmentación del CG (Ahat et al., 2022; He et al., 2020; Joshi et al., 2015), mientras que su sobreexpresión inhibe parcialmente la fragmentación del CG (Shirai y Yamauchi, 2024). El inmunomarcaje de la GRASP65 en neuronas dopaminérgicas de la SNpc tras la microinyección de 6-OHDA, mostró una distribución alterada de la proteína, correspondiéndose con un patrón difuso citosólico, en contraste con el marcate más concentrado en la región perinuclear observado en las células de las muestras control. Esta distribución, debido a la localización en la cara cis-Golgi del

complejo GRASP65-GM130, se correlaciona con la fragmentación y dispersión del CG en el citoplasma.

Tras el análisis bioquímico, observamos una ligera reducción en el nivel de expresión de la GRASP65 en el hemisferio lesionado por la 6-OHDA, con respecto al hemisferio control, similar a los resultados obtenidos en muestras humanas post-mortem de SN (Tomás et al., 2021). Esta disminución en el nivel de expresión de la proteína GRASP65 podría deberse a la degeneración de neuronas dopaminérgicas observada en las muestras de SNpc del modelo inducido por 6-OHDA o, de forma similar, a lo que se produce en el proceso de mitosis, podría ocurrir una fosforilación en la proteína que favoreciese la fragmentación del CG (Wei y Seemann, 2017).

Proteínas del citoesqueleto

Actualmente, existe evidencia de que, en condiciones normales, una de las funciones de la α -sinucleína, consiste en su unión con las tubulinas para inducir la polimerización de los microtúbulos (Alim et al., 2004).

En la EP, algunas mutaciones en la α -sinucleína, como la A53T y E46K, en la LRRK2 o en la Parkin, incrementan la afinidad de estas proteínas para unirse a los microtúbulos que componen el citoesqueleto neuronal, interfiriendo en la estabilidad de su estructura y en el transporte axonal, procesos esenciales en la función neuronal. Estas alteraciones contribuyen a la desestabilización de los microtúbulos, lo que afecta negativamente al transporte de vesículas sinápticas y orgánulos como las mitocondrias, favoreciendo la acumulación de agregados proteicos (Calogero et al., 2019; Pellegrini et al., 2017).

Además, estudios como el llevado a cabo por Chen et al. (2007) en un modelo celular de la EP, evidencian la vinculación del citoesqueleto con las alteraciones presentes en la citopatología de la EP. En este estudio, se describió que las formas oligoméricas de la α -sinucleína presentes en el medio extracelular, penetran en las células dopaminérgicas con mayor afinidad que las formas monoméricas. Estas formas oligoméricas aberrantes de la α -sinucleína, a su vez, se relacionaron de forma significativa con la interrupción de la polimerización de los microtúbulos, favoreciendo la degeneración neuronal.

Actualmente, son escasos los trabajos en modelos animales de la EP que incorporen el análisis del citoesqueleto, siendo este estudio, a nuestro conocimiento, el primer estudio basado en el modelo animal de la EP inducido por 6-OHDA, que incorpora el análisis de proteínas del citoesqueleto en las neuronas dopaminérgicas. En el estudio llevado a cabo por Lu et al. (2014) en un modelo celular de la EP inducido por 6-OHDA, observaron la desestabilización de los microtúbulos en los axones de las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, en este mismo estudio, descartaron la posibilidad de que las alteraciones en el citoesqueleto fuesen eventos iniciales en la citopatología producida por la 6-OHDA, puesto que tan solo 30 minutos después del tratamiento con la toxina, observaron diversas alteraciones en el transporte vesicular y la actividad mitocondrial, mientras que la desestabilización de los microtúbulos no fue significativa hasta pasadas las 24 horas de exposición a la 6-OHDA. Estos resultados, indican que, si bien la estructura del citoesqueleto puede verse comprometida en el transcurso de la EP, en el modelo inducido por 6-OHDA, podría tratarse de una consecuencia de otras alteraciones previas.

En el presente estudio, al igual que observamos en estudios previos de nuestro grupo con un modelo celular de la EP y en los estudios con muestras post-mortem de la SN humana de pacientes de EP, el citoesqueleto de las neuronas dopaminérgicas no pareció presentar alteraciones en la distribución o en la expresión de proteínas claves de sus diferentes componentes, sugiriendo que es poco probable que el citoesqueleto se encuentre alterado en este tipo de neuronas en el modelo de rata inducido por la microinyección unilateral de 6-OHDA, según nuestras condiciones de estudio. Con este resultado podemos descartar que la causa de la fragmentación del CG y de la alteración en la distribución de proteínas involucradas en el transporte intracelular pueda ser debida exclusivamente al estado o a la organización del citoesqueleto (Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021).

4. El sistema nervioso entérico como nuevo tejido de estudio en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson: Nueva perspectiva holística

4.1. La propagación de la α -sinucleína: Teoría del "bottom-up" vs "top-down"

Desde que (Braak et al., 2003) presentaron la hipótesis de que la patología de la EP esporádica se propaga desde SNE a través del nervio vago hacia el núcleo motor dorsal del vago y luego hacia la SN y las estructuras corticales, han surgido múltiples

estudios que apoyan la propagación "bottom-up" o "top-down" de la patología. Estas teorías se basan en que el SNC está conectado bidireccionalmente con el SNE por fibras aferentes (80%-90%) y eferentes (10%-20%) del nervio vago, cuyos somas se encuentran en los ganglios vagales periféricos y en el núcleo dorsal del nervio vago respectivamente (Derkinderen et al., 2011; Uesaka et al., 2016). En relación con estas teorías, en el estudio llevado a cabo por Kordower et al. (2008), se realizó un análisis post-mortem del tejido cerebral de pacientes de EP que se sometieron a un trasplante de neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado con el fin de mitigar los efectos de la patología. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que las neuronas trasplantadas presentaban cuerpos de Lewy, respaldando firmemente la idea de que la α -sinucleína podría propagarse entre las células próximas.

"Bottom-up"

En los últimos años, se han realizado múltiples investigaciones para demostrar la propagación de la proteína α -sinucleína entre neuronas desde el SNE al SNC a través del nervio vago, respaldando la teoría del "bottom-up".

Estudios como el llevado a cabo por Holmqvist et al. (2014) en un modelo animal de rata, describieron la presencia de formas fibrilares patogénicas de la α -sinucleína en el núcleo dorsal del nervio vago tras solo 12 horas desde su inyección en las paredes del duodeno de los animales, indicando la posibilidad de la propagación de la proteína desde el SNE hasta el SNC. Esta teoría, además, es respaldada por estudios recientes en pacientes en los que la vagotomía troncal resulta en un menor riesgo de desarrollar EP en comparación con la población normal (Svensson et al., 2015), mientras que, en el modelo animal de ratón, se ha observado que esta vagotomía impide la propagación de α -sinucleína mal plegada inyectada en el tracto gastrointestinal (Kim et al., 2019). Algunos estudios indican que la desregulación del sistema inmunológico, la inflamación o los cambios en el microbioma y la permeabilidad de la mucosa entérica, podrían ser los factores inductores de la citopatología en el SNE (Balestrino y Schapira, 2020).

"Top-down"

También existe una fuerte evidencia a favor de la teoría "top-down". Por ejemplo, la inyección bilateral en la SNpc de α -sinucleína humana en un modelo de

rata a través de un vector vírico, indujo alteraciones significativas en el SNE y en el microbioma intestinal. Sin embargo, en este estudio la α -sinucleína humana no se detectó en el SNE, incluso varios meses después de su administración (O'Donovan et al., 2020). En un estudio similar en modelo de rata, la inyección unilateral de α -sinucleína humana en la SNpc y en el núcleo dorsal del nervio vago, mostró en ambos casos que la α -sinucleína se transmitía desde estas regiones al tracto gastrointestinal (Ulusoy et al., 2017).

Recientemente, en el modelo de rata de la EP inducido por la microinyección unilateral de 6-OHDA en el cuerpo estriado, se han detectaron niveles elevados de la proteína GFAP y de α -sinucleína en el colon tras la lesión en el SNC, lo que sugiere que las interacciones entre el SNE y el SNC en la EP son bidireccionales y que el proceso perjudicial podría iniciarse en el cerebro (Cui et al., 2023).

En nuestro estudio, los resultados obtenidos apoyan la teoría de la transmisión de la citopatología de la EP del SNC al SNE, revelando que los efectos citopatológicos y la degeneración en las neuronas dopaminérgicas producidos por la microinyección unilateral de 6-OHDA en la SNpc de rata, se reproducen de forma similar en las neuronas dopaminérgicas de los plexos nerviosos del SNE. A pesar de los posibles orígenes de la citopatología de la EP, las neuronas dopaminérgicas nigroestriales y entéricas expresan factores de transcripción y patrones de excitabilidad similares.

Además, hemos observado que la degeneración neuronal en los plexos entéricos de colon proximal y de colon distal, de las muestras lesionadas con 6-OHDA, está específicamente restringida a las neuronas dopaminérgicas, no observándose diferencias significativas en la densidad de otras poblaciones neuronales (NOS y ChAt positivas), lo que demuestra que nuestros resultados no están relacionados con un daño inespecífico de las neuronas en el SNE. La razón por la cual las neuronas dopaminérgicas se ven particularmente afectadas en la EP sigue siendo objeto de estudio. Una de las posibles causas de la afectación de la patología de la EP en las neuronas dopaminérgicas del SNE podría deberse a que, como señalaron Braak et al. (2003) las neuronas con axones no mielinizados o pobremente mielinizados son más sensibles a la patología de los cuerpos de Lewy.

Además, las neuronas dopaminérgicas del SNE, podrían ser más sensibles a las toxinas debido a la falta de una barrera hematoencefálica (Chalazonitis et al., 2022).

Nuestros resultados revelan que la microinyección unilateral de 6-OHDA en la SNpc, también origina una respuesta proinflamatoria en el SNE, con un aumento significativo del inmunomarcaje de células gliales en plexos nerviosos del colon proximal y del colon distal, en comparación con las muestras control.

Esta respuesta inflamatoria en plexos nerviosos de colon en el modelo de rata inducido por 6-OHDA, también se ha descrito muy recientemente en el estudio llevado a cabo por Thomasi et al. (2022) en las primeras 48 horas tras la lesión dopaminérgica en la SNpc. Este estudio, junto con los resultados obtenidos en nuestro análisis, podrían indicar que la neuroinflamación en el SNE es un evento temprano en la citopatología de la EP, al igual que se ha descrito en la SNpc (Wachter et al., 2010; Walsh et al., 2011). Sin embargo, el papel de la glía en la patología de la EP es controvertido. Las células gliales entéricas son similares a los astrocitos del SNC y representan un punto de unión entre el SNC y el SNE (Sharkey y Mawe, 2023). Ante la presencia de moléculas patogénicas como podría ser las formas oligoméricas de la α -sinucleína, se produce una proliferación de células gliales entéricas, que tendría como consecuencia la liberación de citoquinas y factores neurotróficos que a su vez podrían ser dañinos para las células adyacentes como las neuronas dopaminérgicas (Walsh et al., 2011), lo que podría exacerbar la lesión dopaminérgica.

Históricamente, el marcador citopatológico de la EP ha sido la agregación de la α -sinucleína en las neuronas nigroestriales, aunque la formación de cuerpos de Lewy no está restringida a estas neuronas. Diversos estudios han descrito la presencia de cuerpos de Lewy en el núcleo motor dorsal del nervio vago y en áreas fuera del SNC, incluyendo el SNE (Travagli et al., 2020). Estudios iniciales de la citopatología de la EP en el SNE, describieron la presencia de cuerpos de Lewy en los plexos entéricos de pacientes con la enfermedad (Qualman et al., 1984; Wakabayashi et al., 1988, 1989), sugiriendo que el SNE podría ser un tejido idóneo de estudio para favorecer un diagnóstico pre-mortem adecuado para la enfermedad. Sin embargo, estos resultados no se correlacionaron con la disfunción gastrointestinal, describiendo cuerpos de Lewy también presentes en individuos sanos. Otros estudios apoyan el hecho de que la cuantificación únicamente de los niveles de α -sinucleína en el tracto GI, podría llevar a un diagnóstico erróneo de EP (Bu et al., 2019).

En nuestro modelo animal inducido por 6-OHDA, no se observaron cuerpos de Lewy en neuronas dopaminérgicas de plexos nerviosos de colon proximal y de

colon distal, siendo un resultado muy similar al observado en el estudio de la SNpc. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en este modelo sí puede existir una redistribución y concentración citoplasmática de la proteína α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas del SNE.

Hasta la fecha, estos hallazgos reflejan la cuestionable validez de la α -sinucleína como único biomarcador de la patología de la EP, mostrando la necesidad de extender el análisis a otros aspectos de la enfermedad y así por ello, la importancia de encontrar otros indicadores citopatológicos (Fricova et al., 2020; Harsanyi et al., 2020). También sería necesario analizar si las formas patogénicas de la α -sinucleína en el tracto GI están restringidas a los pacientes con EP (Fricova et al., 2020). A diferencia de los estudios llevados a cabo en muestras humanas post-mortem de SNpc donde se han detectado cuerpos de Lewy en individuos sanos, algunos estudios sugieren que estas formas oligoméricas aberrantes de la α -sinucleína podrían estar presentes únicamente en el SNE de pacientes de EP (Sprenger et al., 2015; Vascellari et al., 2023). En este contexto, en nuestro modelo animal inducido por 6-OHDA, tampoco se detectaron alteraciones en la distribución de la proteína α -sinucleína en las muestras de colon proximal y de colon distal de los animales control.

Estos resultados podrían indicar que las conformaciones oligoméricas aberrantes de la α -sinucleína serían formas citotóxicas iniciales en la patología de la EP, con un origen en las neuronas dopaminérgicas del SNE. Mientras que los cuerpos de Lewy se originarían como subproducto de la interrupción del transporte intracelular, conformándose por α -sinucleína y otras proteínas como desechos no eliminables, pudiendo ser así indicadores de una inminente muerte celular. De esta forma, los cuerpos de Lewy podrían estar presentes en neuronas dopaminérgicas y en otros tipos neuronales en individuos sin la patología de la EP.

4.2. La fragmentación del complejo de Golgi y alteraciones en el tráfico intracelular en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso entérico

Los resultados obtenidos del estudio de la citoarquitectura del CG en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal y de colon distal, revelan por primera vez, que el CG de estas neuronas se encuentra alterado tras la microinyección de 6-OHDA en el SNC. Se describen resultados similares a los obtenidos en el estudio de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de este mismo

modelo y en el modelo celular llevado a cabo por nuestro grupo (Rendón et al., 2013), observando que esta alteración parece preceder a la formación de cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas del SNE en nuestro modelo experimental. Este resultado, indica que la fragmentación de la estructura del CG también podría tratarse de un evento temprano en la citopatología del SNE. A su vez, esta alteración sería exclusiva de las neuronas dopaminérgicas, tras el estudio de la citoarquitectura del CG en otros tipos neuronales. Por ende, se procedió a realizar el estudio morfológico comparativo en las neuronas dopaminérgicas del SNE, entre las muestras de colon proximal y de colon distal, analizando las posibles alteraciones en las proteínas vinculadas a la citopatología del CG descritas en el estudio de la SNpc.

Sintaxina-5

Al igual que en el análisis previo de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y en estudios de nuestro grupo en el modelo celular y en muestras post-mortem de pacientes de EP (Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021), detectamos cambios en la distribución y la intensidad del inmunomarcaje de la SNARE sintaxina-5 en las neuronas dopaminérgicas del SNE de muestras de colon proximal y de colon distal.

Nuestro estudio reveló una reducción significativa del inmunomarcaje de la proteína SNARE sintaxina-5, en las neuronas dopaminérgicas del SNE de las muestras de colon proximal y de colon distal, resultado similar al descrito en los estudios de nuestro grupo con el modelo celular de la EP (Rendón et al., 2013). Por el contrario, no se detectaron los agregados extracelulares enriquecidos con sintaxina-5 descritos en las muestras post-mortem de SN de pacientes afectados por EP (Tomás et al., 2021).

En este contexto, estudios recientes han descrito la sobreexpresión de la sintaxina-5 como potencial respuesta ante el estrés del CG en modelos celulares, indicando que esta SNARE podría ser un factor de respuesta a las alteraciones en el tráfico RE-CG (Suga et al., 2015). La ausencia de estas inclusiones y de cuerpos de Lewy en nuestro modelo animal puede deberse a que, en este modelo, al igual que en los pacientes de EP, estos agregados proteicos podrían tardar un mayor tiempo en formarse.

Esta proteína SNARE no solo está involucrada en el transporte RE-CG (Hay y Chao, 1997; Hui et al., 1997), sino también en las etapas finales de la autofagia. Por

lo tanto, la depleción de esta proteína SNARE favorecería una disfunción lisosomal y la acumulación de autofagosomas (Renna et al., 2011), promoviendo la acumulación de proteínas como la α -sinucleína y aumentando la vulnerabilidad de estas neuronas. Curiosamente, esta proteína SNARE también está involucrada en la eliminación de inclusiones proteicas insolubles (Babazadeh et al., 2019).

Rab1a

A diferencia de la sintaxina-5, solo se observaron diferencias leves en la distribución de la Rab1a en las neuronas dopaminérgicas de los plexos entéricos tras la inyección de 6-OHDA, en comparación con las muestras control. Por lo tanto, el uso de esta GTPasa en este modelo animal como un indicador para el diagnóstico temprano de la enfermedad en el SNE, es limitado. Sin embargo, no sabemos si este resultado también sucede en los pacientes de EP, ya que la enfermedad se desarrolla durante un período muy prolongado. Como se indicó anteriormente, la proteína Rab1a GTPasa se ha descrito como un factor protector ante la neurodegeneración, recuperando mediante su sobreexpresión la morfología del CG, protegiendo contra la toxicidad de la α -sinucleína y previniendo la formación de agregados (Martínez-Menárguez et al., 2021; Rendón et al., 2013).

Por lo que, los niveles de expresión relativamente bajos de esta proteína en nuestro modelo podrían estar relacionados con la ausencia de cuerpos de Lewy y la degeneración inicial de neuronas dopaminérgicas en los animales de nuestro estudio.

GRASP-65

Al igual que en las muestras de SNpc del modelo inducido por 6-OHDA, la distribución de la GRASP65 también se observó alterada en las neuronas dopaminérgicas del SNE en muestras de colon proximal y de colon distal, en comparación con las neuronas de muestras control. Estos resultados sugieren que la GRASP-65 se distribuye de forma dispersa en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas del modelo de la EP debido a la estrecha unión a la proteína estructural GM130 y a la fragmentación del CG.

Sin embargo, la cuantificación de la intensidad del inmunomarcaje no reveló diferencias entre las neuronas dopaminérgicas del SNE del modelo inducido por 6-

OHDA y las neuronas de las muestras control, indicando que es poco probable que se encuentren alterados los niveles de expresión de esta proteína en el SNE en nuestro modelo experimental de la EP.

Citoesqueleto

A su vez, el análisis del citoesqueleto de las neuronas dopaminérgicas de las muestras de colon proximal y de colon distal, no mostró alteraciones, siendo un resultado similar al obtenido en la SNpc, por lo que es poco probable que la organización del citoesqueleto pueda estar involucrada directamente en las alteraciones del tráfico intracelular y la organización estructural del CG descritas en el SNE.

5. Posibles vías de transmisión de la enfermedad de Parkinson: Nuevas perspectivas futuras

5.1. Vía nerviosa autónoma

En nuestro estudio encontramos que la microinyección unilateral de 6-OHDA en la SNpc, indujo el mismo efecto intracelular en las neuronas dopaminérgicas de las muestras de colon proximal y de las muestras de colon distal.

Los nervios espláncnicos pélvicos son los responsables de la innervación parasimpática del colon distal, a diferencia del colon proximal que es el nervio vago, por lo que, si la transmisión de la citopatología de la EP fuese exclusivamente a través de la vía autónoma del nervio vago, no esperaríamos observar alteraciones citopatológicas en las neuronas dopaminérgicas de los plexos nerviosos de la porción distal del colon. Sin embargo, estudios recientes muestran la evidencia que el nervio vago participaría también en la innervación del colon distal en modelos murinos. En este contexto, gracias al uso de trazadores neuronales en modelos animales de rata y ratón, se han identificado proyecciones aferentes del colon distal en el núcleo dorsal del nervio vago (Herrity et al., 2014; Wang et al., 2024).

A su vez, en el estudio en ratón, se observaron que algunas de estas vías aferentes innervaban núcleos catecolaminérgicos del SNC, indicando una conexión bidireccional entre el colon distal y el SNC a través del nervio vago.

Estas fibras a su vez no parecen estar involucradas en la percepción del dolor, función la cual se atribuyen a los nervios esplácnicos pélvicos, sino en funciones como la motilidad y los reflejos autonómicos (Herrity et al., 2014). Siendo esta, una posible explicación de la similitud de nuestros resultados en las muestras de colon proximal y de colon distal, así como de la transmisión de la citopatología desde el SNC al SNE y viceversa. Este hallazgo, desafía el modelo tradicional de inervación extrínseca del SNE del colon distal, sugiriendo que el colon distal podría constar de una inervación aferente dual de fibras nerviosas de los nervios pélvicos esplácnicos y del nervio vago. En este contexto, las fibras vagales podrían estar involucradas en la detección de estímulos específicos como podrían ser señales químicas o de distensión leve, mientras que las fibras procedentes de los nervios pélvicos podrían estar relacionadas con estímulos nociceptivos o distensiones severas.

Esta teoría podría respaldarse por estudios como el llevado a cabo por Liu et al. (2017) en una cohorte retrospectiva, en el que se reveló que la vagotomía solo produce un efecto positivo en la reducción del riesgo de padecer EP en pacientes que se han sometido a una vagotomía troncal completa, a diferencia de los que se han sometido a una vagotomía selectiva en el estómago para el tratamiento de úlceras peptídicas, indicando la implicación de otras regiones del SNE en la transmisión de la patología.

En este contexto, en un estudio experimental en ratones, Kim et al. (2019) inyectaron formas fibrilares de la α -sinucleína en las capas musculares del duodeno y el píloro, regiones del tracto GI que están inervadas por el nervio vago. Un mes después de la inyección, se identificaron estas formas de la α -sinucleína en el núcleo dorsal del nervio vago y posteriormente en las regiones caudales del tronco encefálico. Finalmente, describieron que el procedimiento de vagotomía bloqueó casi por completo la propagación de la α -sinucleína desde el tracto GI al SNC, apoyando la teoría de la propagación de formas patogénicas de la proteína a través de la vía autónoma por el nervio vago. La amplia distribución de los agregados de la α -sinucleína en los nervios autónomos y la comunicación bidireccional del SNE con el SNC aportan evidencia sólida que respalda esta hipótesis. A su vez, en condiciones in vivo, las formas fibrilares patogénicas de la α -sinucleína previas a la formación de cuerpos de Lewy en el SNC, podrían propagarse a los nervios autónomos y luego transferirse a tejidos periféricos mediante mecanismos como el transporte de macromoléculas, endocitosis, exocitosis o procesos neuroendocrinos (Yang y Zhang,

2024). Por el contrario, en base a este mismo razonamiento, la α -sinucleína patogénica originada en el SNE también podría cruzar la barrera hematoencefálica y transportarse al SNC a través de la vías vagal.

Sin embargo, existen estudios que indican que la densidad de innervación vagal disminuye distalmente y experimentos utilizando trazado neuronal han demostrado que el colon distal puede recibir una innervación vagal limitada (Vizzard et al., 2000), por lo que esta se encuentra en debate actualmente. Esto resalta la complejidad de la innervación extrínseca del SNE y abre nuevas áreas de investigación para profundizar en el conocimiento de la comunicación entre el SNE y el SNC.

Estos hallazgos, junto con la similitud en los resultados obtenidos en nuestro estudio en las muestras de colon proximal y de colon distal, nos condujeron a la hipótesis de la posible existencia de vías alternativas de transmisión de la citopatología producida por la microinyección de la toxina 6-OHDA desde el punto de inyección.

5.2. Exosomas

En este contexto, las formas de la α -sinucleína mal plegadas podrían ser secretadas al entorno extracelular, induciendo el mal plegado en las neuronas vecinas de manera similar a los priones, lo que apoya la hipótesis de Braak et al. (2003) (Savitt y Jankovic, 2019; Zhang et al., 2018). Los mecanismos moleculares de la internalización de la α -sinucleína extracelular no se comprenden bien, pero la endocitosis mediada por receptores parece ser un posible mecanismo (Hasegawa et al., 2017).

Además de la endocitosis, algunos estudios recientes han teorizado que parte de la α -sinucleína extracelular podría ser transferida de célula a célula a través de exosomas, que son pequeñas vesículas de origen endosomal (Hasegawa et al., 2017). Estas contienen proteínas, lípidos y ARN específicos de la célula y se encuentran implicados en la comunicación intercelular en el SNC, así como en el mantenimiento celular al eliminar materiales no deseados.

Las neuronas y las células gliales pueden liberar exosomas que se encuentran en el plasma sanguíneo y el líquido ceforraquídeo, pudiendo ser una forma de permitir que las formas citotóxicas de la α -sinucleína alterada salga del medio

intracelular (Hasegawa et al., 2017; Mavroeidi et al., 2022; Stefanis et al., 2019). Esto ha llevado al estudio de exosomas de muestras de saliva, orina o sangre de pacientes de la EP como posibles biomarcadores prematuros de la enfermedad (Rastogi et al., 2023).

En nuestro estudio, el análisis morfológico y bioquímico de proteínas presentes en la membrana de exosomas, reveló un cambio de distribución junto con el aumento significativo en el inmunomarcaje de la proteína Rab3a GTPasa en las muestras del SNE de muestras tanto de colon proximal como de colon distal del modelo inducido por 6-OHDA.

Sin embargo, de forma llamativa, no detectamos diferencias apreciables en la distribución de la proteína Rab3a entre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control y el hemisferio modelo de la EP, y el análisis bioquímico no reveló diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína entre las muestras de SNpc de controles y del modelo de EP. En el estudio llevado a cabo por Lv et al. (2022), se describió la unión de las formas aberrantes fosforiladas de la α -sinucleína con la Rab3a en los terminales sinápticos, la cual inhibía la función de hidrólisis de la GTPasa, inhibiendo la liberación de las vesículas. Por lo que el aumento del inmunomarcaje de esta GTPasa en nuestro modelo animal tras la microinyección de 6-OHDA en la SNpc, en las neuronas dopaminérgicas del SNE, podría deberse a este acúmulo intracitoplasmático de vesículas sinápticas. A su vez, esta acumulación de vesículas positivas para el inmunomarcaje de la Rab3a también podría estar vinculada a la disrupción del transporte vesicular en el TGN y de la actividad lisosomal producida por la fragmentación del CG y la alteración de proteínas como la syntaxina-5.

Posteriormente, el estudio morfológico y ultraestructural de la distribución de la tetraspanina CD63, la cual se encuentra especialmente enriquecida en la membrana de exosomas, también reveló un aumento significativo en su inmunomarcaje en neuronas dopaminérgicas de la SNpc y del SNE de las muestras del modelo inducido por 6-OHDA. En este caso, el análisis ultraestructural también mostró una mayor presencia de endosomas tardíos y de vesículas inmunomarcadas para la CD63 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de animales del modelo inducido por 6-OHDA en comparación con las muestras de los animales control. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios anteriores en muestras de saliva de pacientes de

EP, donde se ha observado una mayor presencia de vesículas extracelulares inmunomarcadas con anticuerpos para la proteína CD63 (Rastogi et al., 2023). Este aumento del inmunomarcaje de la CD63, podría indicar también un aumento de la densidad de estos intermediarios de transporte en las neuronas dopaminérgicas tanto de SNpc como en las neuronas dopaminérgicas del SNE de nuestro modelo experimental. Además, el contenido de los exosomas también parece variar entre las muestras biológicas de individuos sanos y pacientes de la EP. El estudio llevado a cabo por Tong et al. (2022), evidenció el aumento en distintos micro RNAs en exosomas de muestras de sangre y fluido cerebroespinal de pacientes de EP en comparación con las muestras de pacientes sanos.

Algunos de los genes vinculados a la patología de la EP descritos anteriormente, como el gen para la LRRK2, también se han vinculado con la regulación de la biogénesis y la liberación de exosomas. Actualmente, se ha descrito que la LRRK2 alterada, interacciona con las proteínas Rab5b y Rab7 GTPasas, de las cuales, la Rab5b participa en la formación de los endosomas tempranos, mientras que la Rab7 interviene en la maduración de los endosomas tardíos y su fusión con los lisosomas (Mavroicidi et al., 2022).

Recientemente, se ha descrito que las vesículas extracelulares derivadas del SNC de pacientes de la EP, contienen proteínas SNARE y formas citotóxicas de la α -sinucleína (Agliardi et al., 2021; Shi et al., 2014). Estas vesículas pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Shi et al., 2014), por lo tanto, podrían ser un mecanismo que facilite la comunicación celular entre el SNC y el SNE y una posible vía alternativa de transmisión de las formas citotóxicas de la α -sinucleína en la EP.

Otros estudios, indican que los niveles de α -sinucleína fosforilada, tanto en el interior de los glóbulos rojos como en las membranas eritrocitarias de pacientes con EP, son mucho más altos que los de los controles sanos. Existiendo evidencia de que la presencia de α -sinucleína oligomérica en eritrocitos podría ser indicativa de una progresión acelerada de la enfermedad, pudiendo transmitirse de la sangre al SNC mediante vesículas extracelulares eritrocitarias a través de la fusión de membranas con la barrera hematoencefálica (Matsumoto et al., 2017; Yang y Zhang, 2024).

Sin embargo, también existen estudios que cuestionan el papel de los exosomas en la transmisión de proteínas citotóxicas o priones, en el desarrollo de las

enfermedades neurodegenerativas. En el estudio de Karampetsou et al. (2020), se aislaron exosomas del cerebro de ratones transgénicos A53T, un modelo animal usado para el estudio de la EP por expresar formas patogénicas de la α -sinucleína. Estos exosomas a su vez, fueron inyectados en el cuerpo estriado de ratones sanos, y los resultados obtenidos mostraron que, a pesar de la presencia de las formas oligoméricas patogénicas de la α -sinucleína en los exosomas administrados, no se detectó una acumulación significativa de α -sinucleína en el cerebro de los ratones receptores tras siete meses desde la microinyección.

Este hallazgo cuestiona la hipótesis de que los exosomas son vectores de transmisión de citopatologías, pudiendo ser una forma de defensa ante el estrés originado por los procesos citopatológicos que engloban la EP.

6. El complejo de Golgi y el tráfico de membranas: Una nueva perspectiva en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson

A pesar de los avances en la investigación de los procesos citopatológicos derivados de la EP, actualmente se cree que el origen de la enfermedad se debe a un conjunto de factores genéticos y ambientales que parecen contribuir a la aparición de alteraciones en el tráfico intracelular, disfunción mitocondrial, agregación proteica, exposición a estrés oxidativo, deterioro de la autofagia y aparición de neuroinflamación. Aunque el 90% de los casos de EP son de origen esporádico, gran parte de las mutaciones en proteínas asociadas al desarrollo de la EP, como las descritas en el gen de la LRRK2, VPS35 o la Parkin, se han vinculado con alteraciones en el transporte intracelular y la formación y acumulación de proteínas citotóxicas como las formas oligoméricas de la α -sinucleína.

La eliminación genética de VPS35, no solo induce la acumulación de especies oligoméricas de la α -sinucleína en el SNC, sino que también agrava los deterioros motores y la degeneración neuronal en modelos animales transgénicos para la α -sinucleína. Mientras que estudios de localización subcelular de la LRRK2, han indicado su asociación con endosomas, lisosomas y CMV en el cerebro de roedores. Además, se ha demostrado que la LRRK2 interactúa con varias Rab GTPasas, incluidas Rab7, Rab32 y Rab38 (Hasegawa et al., 2017). En conjunto, estos hallazgos genéticos respaldan fuertemente la idea de que los defectos en el tráfico intracelular y las funciones lisosomales son mecanismos implicados en la patogénesis de la EP.

Las alteraciones en el tráfico de membranas mediado por el CG también son una característica distintiva de los trastornos neurodegenerativos. Los modelos animales de la EP demuestran cómo la interrupción del tráfico de membranas del RE al CG por parte de la α -sinucleína contribuye a la degeneración de neuronas dopaminérgicas.

Para entender los cambios relacionados con el CG con potencial terapéutico en diversas enfermedades, es crucial identificar factores moleculares que afecten a sus características estructurales y los procesos de regulación que estén relacionados. Numerosos estudios han identificado moléculas estructurales del CG y mediadoras del transporte intracelular como son la GM130, la GRASP65, o las Rab GTPasas y SNAREs que podrían ser objeto de una investigación más detallada, por su vinculación con la fragmentación del CG, para así conocer mejor las bases celulares en el desarrollo de la EP. Además, el aumento de la expresión de algunas proteínas como la Rab1 o la GRASP65, puede proteger a estas neuronas contra la degeneración inducida por α -sinucleína, mejorando la supervivencia y el control de la función motora con un beneficio terapéutico mejorado (Mohan et al., 2023; Shirai y Yamauchi, 2024). Las condiciones de estrés, los procesos proapoptóticos y el daño al ADN, también comprometen la estructura y función del CG mediante la escisión de sus proteínas estructurales. Recientemente, se han identificado seis vías de respuesta al estrés del CG en células de mamíferos, como la vía TFE3, que podrían llevar a la fragmentación del orgánulo y a la interrupción del transporte intracelular (Shirai y Yamauchi, 2024). Sin embargo, son necesarios más estudios que se centren en desarrollar estrategias para modular de manera específica el estrés del CG y aplicar estos hallazgos en aplicaciones terapéuticas.

Además, el tráfico intracelular regula estrictamente la captación y secreción de proteínas como la α -sinucleína, influyendo así en el fenómeno de propagación transcelular de la citopatología de la EP. Dado el posible papel de las formas oligoméricas patogénicas de la α -sinucleína como los vectores de la propagación de la citopatología de forma similar a los priones, actualmente se están desarrollando terapias basadas en anticuerpos para la eliminación de las especies transmisibles de la α -sinucleína (Lee y Lee, 2016).

De manera alternativa, algunas investigaciones indican la posibilidad de prevenir la entrada de α -sinucleína en las células bloqueando los procesos de

endocitosis, ya que cuando los niveles intracelulares de α -sinucleína alcanzan niveles tóxicos o si la vía de clasificación de los CMV tardíos, se bloquea por alguna razón, la α -sinucleína podría liberarse a través de la vía endosomal (Hasegawa et al., 2017).

Además de la posible transmisión como prión de la α -sinucleína, varios estudios han sugerido que los exosomas podrían servir como vehículos extracelulares para la propagación de proteínas en las enfermedades neurodegenerativas como la EP (Agliardi et al., 2021; Ishiguro et al., 2024; Rastogi et al., 2023; Shi et al., 2014), destacando de esta forma, el papel del tráfico intracelular en la aparición y transmisión de la citopatología de la EP. Siguiendo esta línea, las formas citotóxicas de la α -sinucleína podrían transmitirse no solo únicamente a través del contacto neuronal gracias a la conexión bidireccional entre el SNC y el SNE a través del nervio vago, sino también a través de vesículas extracelulares. Siendo esta, una posible explicación de la similitud de nuestros resultados en las muestras de colon proximal y colon distal, así como de la transmisión de la citopatología desde el SNC al SNE y viceversa.

En este contexto, diversos estudios respaldan el uso de biopsias de colon como herramienta para el diagnóstico precoz de la EP, centrados principalmente en la detección de la acumulación de α -sinucleína. El estudio llevado a cabo por Hilton et al. (2014), demostró que la α -sinucleína se acumula en las fibras nerviosas y ganglios de biopsias del tracto GI, hasta ocho años antes de la aparición de los síntomas motores, mostrando la utilidad de las biopsias de colon como potencial tejido de estudio para confirmar un diagnóstico temprano de la EP. En la revisión realizada por Cersosimo (2015), se destacó la existencia de un gradiente rostrocaudal en la distribución de los agregados de la α -sinucleína en el tracto GI, pudiendo relacionarse con la influencia y la extensión del nervio vago a lo largo del tracto. En conjunto, estos hallazgos sugieren que las biopsias de colon no solo tienen potencial diagnóstico, sino que también podrían identificar etapas tempranas de la enfermedad, contribuyendo significativamente a la implementación de intervenciones preventivas.

Sin embargo, es necesario recordar, que debido a la cuestionable validez de la α -sinucleína como único biomarcador de la patología de la EP, otros estudios apoyan el hecho de que la cuantificación únicamente de los niveles de α -sinucleína en el tracto GI, podría llevar a un diagnóstico erróneo de EP, siendo necesario ampliar el análisis de la citopatología a otros aspectos (Bu et al., 2019; Fricova et al., 2020; Harsanyiova et al., 2020). Entre ellos, la búsqueda de otros indicadores patológicos

implicados en la citopatología celular inicial de la EP para facilitar un diagnóstico temprano en muestras accesibles como son las biopsias de colon o muestras de fluidos biológicos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio y en estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en el modelo celular y en muestras postmortem de pacientes de la EP, indican que esta fragmentación del CG es un evento citopatológico temprano en la EP, el cual es poco probable que sea debido a procesos de apoptosis (Rendón et al., 2013; Tomás et al., 2021).

Aunque los mecanismos exactos asociados con la fragmentación del CG aún no se comprenden completamente, los estudios actuales destacan varias áreas de investigación específicas que podrían desempeñar un papel crucial tanto en la identificación de objetivos terapéuticos, como en la comprensión de los mecanismos que impulsan esta patogénesis. Basándonos en los resultados de este estudio, la fragmentación del CG y las alteraciones en proteínas esenciales para el mantenimiento del tráfico intracelular podrían representar componentes clave en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico. Asimismo, estas alteraciones podrían consolidarse como una diana prometedora para futuras investigaciones sobre la citopatología de la EP.

VII

CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, podemos concluir que:

1. El modelo animal de rata hemiparkinsoniana inducido por microinyección unilateral de 6-OHDA, produce alteraciones en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central y del sistema nervioso entérico, siendo un modelo válido para el estudio de las bases celulares y moleculares de la enfermedad de Parkinson.
2. El estudio morfológico del complejo de Golgi en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso entérico como de la sustancia negra pars compacta confirma la fragmentación del orgánulo como un evento citopatológico común en nuestro modelo experimental.
3. El estudio morfológico y bioquímico de proteínas involucradas en la citoarquitectura del complejo de Golgi y en el mantenimiento del tráfico intracelular, revela alteraciones en el patrón de distribución y expresión de las proteínas Rab1a GTPasa y la SNARE syntaxina-5, en neuronas dopaminérgicas, confirmando la relación de estas proteínas con la fragmentación del complejo de Golgi observada en la citopatología de la enfermedad de Parkinson.
4. La microinyección unilateral de 6-OHDA en la sustancia negra pars compacta, produce alteraciones citopatológicas similares en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso entérico tanto de muestras de colon proximal como de colon distal. Estos hallazgos sugieren la existencia de una vía alternativa para la transmisión de la citopatología de la enfermedad de Parkinson, además de la inervación vagal.
5. El estudio morfológico y ultraestructural de intermediarios vesiculares y el análisis de la distribución de proteínas presentes en la membrana de exosomas, muestra un aumento de estas microvesículas en la sustancia negra y en el sistema nervioso entérico de colon de este modelo experimental. Este resultado respalda la continuidad del estudio de estas vesículas como posible vía alternativa para la transmisión de la citopatología asociada a la enfermedad de Parkinson.

6. En su conjunto, nuestros resultados confirman que las alteraciones en la citoarquitectura del complejo de Golgi y en la regulación de proteínas esenciales en el tráfico intracelular, en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta y del sistema nervioso entérico, son eventos iniciales en la citopatología de la enfermedad de Parkinson. Estos resultados, sustentan el estudio clínico de biopsias de colon como alternativa para la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan mejorar el diagnóstico precoz de la enfermedad.

VIII

REFERENCIAS

VII. Referencias

- Abeliovich, A., & Gitler, A. D. (2016). Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. In *Nature* (Vol. 539, Issue 7628, pp. 207–216). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature20414>
- Agliardi, C., Meloni, M., Guerini, F. R., Zanzottera, M., Bolognesi, E., Baglio, F., & Clerici, M. (2021). Oligomeric α -Syn and SNARE complex proteins in peripheral extracellular vesicles of neural origin are biomarkers for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 148, 105185. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105185>
- Ahat, E., Song, Y., Xia, K., Reid, W., Li, J., Bui, S., Zhang, F., Linhardt, R. J., & Wang, Y. (2022). GRASP depletion-mediated Golgi fragmentation impairs glycosaminoglycan synthesis, sulfation, and secretion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(4). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04223-3>
- Alim, M. A., Ma, Q.-L., Takeda, K., Aizawa, T., Matsubara, M., Nakamura, M., Asada, A., Saito, T., Kaji, H., Yoshii, M., Hisanaga, S., & Ueda, K. (2004). Demonstration of a role for α -synuclein as a functional microtubule-associated protein. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 6). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/jad-2004-6412>
- Alonso Cánovas, A., Luquin Piudo, R., García Ruiz-Espiga, P., Burguera, J. A., Campos Arillo, V., Castro, A., Linazasoro, G., López del Val, J., Vela, L., & Castrillo, J. C. M. (2014). Agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson. In *Neurología* (Vol. 29, Issue 4, pp. 230–241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.04.012>
- Alvarez-Fischer, D., Henze, C., Strenzke, C., Westrich, J., Ferger, B., Höglinger, G. U., Oertel, W. H., & Hartmann, A. (2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. *Experimental Neurology*, 210(1), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.012>
- Antony, P. M. A., Diederich, N. J., Krüger, R., & Balling, R. (2013). The hallmarks of Parkinson's disease. In *FEBS Journal* (Vol. 280, Issue 23, pp. 5981–5993). <https://doi.org/10.1111/febs.12335>
- Appenzeller-Herzog, C., & Hauri, H. P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): In search of its identity and function. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2173–2183. <https://doi.org/10.1242/jcs.03019>
- Athari, S. Z., Farajdokht, F., Sadigh-Eteghad, S., Mohajeri, D., Nourazar, M. A., & Mohaddes, G. (2023). Hydroxychloroquine attenuated motor impairment and oxidative stress in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *International Journal of Neuroscience*, 133(11), 1252–1261. <https://doi.org/10.1080/00207454.2022.2074848>

- Atik, A., Stewart, T., & Zhang, J. (2016). Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathology*, 26(3), 410–418. <https://doi.org/10.1111/bpa.12370>
- Babazadeh, R., Ahmadpour, D., Jia, S., Hao, X., Widlund, P., Schneider, K., Eisele, F., Edo, L. D., Smits, G. J., Liu, B., & Nystrom, T. (2019). Syntaxin 5 Is Required for the Formation and Clearance of Protein Inclusions during Proteostatic Stress. *Cell Reports*, 28(8), 2096–2110.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.053>
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. In *European Journal of Neurology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 27–42). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Batassini, C., Broetto, N., Tortorelli, L. S., Borsoi, M., Zanotto, C., Galland, F., Souza, T. M., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. (2015). Striatal injury with 6-OHDA transiently increases cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/387028>
- Beard, M., Satoh, A., Shorter, J., & Warren, G. (2005). A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25840–25848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503925200>
- Behl, T., Kumar, S., Althafar, Z. M., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Badavath, V. N., Yadav, S., Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Almoshari, Y., Almikhlaifi, M. A., & Bungau, S. (2022). Exploring the Role of Ubiquitin-Proteasome System in Parkinson's Disease. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 59, Issue 7, pp. 4257–4273). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02851-1>
- Beitz, J. M. (2014). Parkinson's disease: a review. *Frontiers in Bioscience*, 6, 65–74. <https://doi.org/10.2741/s415>
- Bernal-Conde, L. D., Ramos-Acevedo, R., Reyes-Hernández, M. A., Balbuena-Olvera, A. J., Morales-Moreno, I. D., Argüero-Sánchez, R., Schüle, B., & Guerra-Crespo, M. (2020). Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01399>
- Bidesi, N. S. R., Vang Andersen, I., Windhorst, A. D., Shalgunov, V., & Herth, M. M. (2021). The role of neuroimaging in Parkinson's disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 159, Issue 4, pp. 660–689). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.15516>
- Bigi, A., Cascella, R., & Cecchi, C. (2023). α -Synuclein oligomers and fibrils: partners in crime in synucleinopathies. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 18, Issue 11, pp. 2332–2342). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.371345>
- Bjorklund, G., Stejskal, V., Urbina, M. A., Dadar, M., Chirumbolo, S., & Mutter, J. (2018). Metals and Parkinson's Disease: Mechanisms and Biochemical Processes. *Current Medicinal Chemistry*, 25(19), 2198–2214. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171129124616>

- Blesa, J., Foffani, G., Dehay, B., Bezdard, E., & Obeso, J. A. (2022). Motor and non-motor circuit disturbances in early Parkinson disease: which happens first? In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 23, Issue 2, pp. 115–128). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00542-9>
- Bódi, N., Szalai, Z., & Bagyánszki, M. (2019). Nitroergic enteric neurons in health and disease-focus on animal models. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20082003>
- Boncompain, G., & Perez, F. (2013). The many routes of Golgi-dependent trafficking. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 140, Issue 3, pp. 251–260). <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1124-7>
- Borghammer, P., & Hamani, C. (2017). Preventing Parkinson disease by vagotomy: Fact or fiction? In *Neurology* (Vol. 88, Issue 21, pp. 1982–1983). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003969>
- Braak, H., De Vos, R. A. I., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*, 396(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012>
- Braak, H., Tredici, K. Del, Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. In *Neurobiology of Aging* (Vol. 24). [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00065-9)
- Braakman, I., & Bulleid, N. J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 71–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062209-093836>
- Brehmer, A. (2021). Classification of human enteric neurons. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 156, Issue 2, pp. 95–108). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02002-y>
- Brierley, S. M., Hibberd, T. J., & Spencer, N. J. (2018). Spinal afferent innervation of the colon and rectum. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00467>
- Bu, J., Liu, J., Liu, K., & Wang, Z. (2019). Diagnostic utility of gut α -synuclein in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 364, pp. 340–347). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.039>
- Burbulla, L. F., Song, P., Mazzulli, J. R., Zampese, E., Wong, Y. C., Jeon, S., Santos, D. P., Blanz, J., Obermaier, C. D., Strojny, C., Savas, J. N., Kiskinis, E., Zhuang, X., Krüger, R., Surmeier, D. J., & Krainc, D. (2017). Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*, 357(6357), 1255–1261. <https://doi.org/10.1126/science.aam9080>

- Burd, C. G. (2021). Grasping for consensus about the golgi apparatus. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 220, Issue 5). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103117>
- Butler, B., Sambo, D., & Khoshbouei, H. (2017). Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. In *Journal of Chemical Neuroanatomy* (Vols. 83–84, pp. 41–49). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.06.001>
- Buttery, P. C., & Barker, R. A. (2020). Gene and Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease: Where Are We? *Neurotherapeutics*, 17, 1539–1562. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00940-4/Published>
- Calogero, A. M., Mazzetti, S., Pezzoli, G., & Cappelletti, G. (2019). Neuronal microtubules and proteins linked to Parkinson's disease: A relevant interaction? In *Biological Chemistry* (Vol. 400, Issue 9, pp. 1099–1112). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0142>
- Campos, F. L., Carvalho, M. M., Cristovão, A. C., Je, G., Baltazar, G., Salgado, A. J., Kim, Y. S., & Sousa, N. (2013). Rodent models of Parkinson's disease: Beyond the motor symptomatology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, NOV. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00175>
- Caracci, M. O., Fuentealba, L. M., & Marzolo, M. P. (2019). Golgi complex dynamics and its implication in prevalent neurological disorders. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7, Issue May). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00075>
- Carballo-Carbajal, I., Laguna, A., Romero-Giménez, J., Cuadros, T., Bové, J., Martínez-Vicente, M., Parent, A., Gonzalez-Sepulveda, M., Peñuelas, N., Torra, A., Rodríguez-Galván, B., Ballabio, A., Hasegawa, T., Bortolozzi, A., Gelpi, E., & Vila, M. (2019). Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08858-y>
- Carmo, L. A. S., Bonjour, K., Ueki, S., Neves, J. S., Liu, L., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., Weller, P. F., & Melo, R. C. N. (2016). CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(2), 391–401. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A1015-480R>
- Cartelli, D., & Cappelletti, G. (2017). Microtubule Destabilization Paves the Way to Parkinson's Disease. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 54, Issue 9, pp. 6762–6774). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0188-5>
- Cersosimo, M. G. (2015). Gastrointestinal biopsies for the diagnosis of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. In *Gastroenterology Research and Practice* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/476041>

- Chakrabarti, S., & Bisaglia, M. (2023). Oxidative Stress and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: The Role of Dopamine Oxidation Products. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox12040955>
- Chalazonitis, A., & Rao, M. (2018). Enteric nervous system manifestations of neurodegenerative disease. In *Brain Research* (Vol. 1693, pp. 207–213). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.01.011>
- Chalazonitis, A., Rao, M., & Sulzer, D. (2022). Similarities and differences between nigral and enteric dopaminergic neurons unravel distinctive involvement in Parkinson's disease. In *npj Parkinson's Disease* (Vol. 8, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00308-9>
- Chen, L., Jin, J., Davis, J., Zhou, Y., Wang, Y., Liu, J., Lockhart, P. J., & Zhang, J. (2007). Oligomeric α -synuclein inhibits tubulin polymerization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(3), 548–553. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.163>
- Chen, R. H. C., Wislet-Gendebien, S., Samuel, F., Visanji, N. P., Zhang, G., Marsilio, D., Langman, T., Fraser, P. E., & Tandon, A. (2013). α -Synuclein membrane association is regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7438–7449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439497>
- Chia, S. J., Tan, E. K., & Chao, Y. X. (2020). Historical perspective: Models of Parkinson's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21072464>
- Chiu, R., Novikov, L., Mukherjee, S., & Shields, D. (2002). A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 159(4), 637–648. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208013>
- Church, F. C. (2021). Review treatment options for motor and non-motor symptoms of parkinson's disease. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11040612>
- Climmer, L. K., Hendrix, R. D., & Lupashin, V. V. (2018). Conserved oligomeric golgi and neuronal vesicular trafficking. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 245, pp. 227–247). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/164_2017_65
- Colla, E., Coune, P., Liu, Y., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Iwatsubo, T., Schneider, B. L., & Lee, M. K. (2012). Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo. *Journal of Neuroscience*, 32(10), 3306–3320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5367-11.2012>
- Colla, E., Jensen, P. H., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Glabe, C., & Lee, M. K. (2012). Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. *Journal of Neuroscience*, 32(10), 3301–3305. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012>

- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., Labaer, J., Rochet, J.-C., Bonini, N. M., & Lindquist, S. (2006). α -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models NIH Public Access. In *Science* (Vol. 313, Issue 5785). <https://doi.org/10.1126/science.1129462>
- Coune, P. G., Bensadoun, J. C., Aebischer, P., & Schneider, B. L. (2011). Rab 1 A over-expression prevents golgi apparatus fragmentation and partially corrects motor deficits in an alpha-synuclein based rat model of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 1(4), 373–387. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11058>
- Cui, H., Elford, J. D., Alitalo, O., Perez-Pardo, P., Tampio, J., Huttunen, K. M., Kraneveld, A., Forsberg, M. M., Myöhänen, T. T., & Jalkanen, A. J. (2023). Nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions increase alpha-synuclein levels and permeability in rat colon. *Neurobiology of Aging*, 129, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2023.05.007>
- Cui, L., Li, H., Xi, Y., Hu, Q., Liu, H., Fan, J., Xiang, Y., Zhang, X., Shui, W., & Lai, Y. (2022). Vesicle trafficking and vesicle fusion: mechanisms, biological functions, and their implications for potential disease therapy. In *Molecular Biomedicine* (Vol. 3, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00090-3>
- Cyske, Z., Gaffke, L., Pierzynowska, K., & Węgrzyn, G. (2023). Tubulin Cytoskeleton in Neurodegenerative Diseases—not Only Primary Tubulinopathies. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 43, Issue 5, pp. 1867–1884). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01304-6>
- Datta, I., Ganapathy, K., Razdan, R., & Bhonde, R. (2018). Location and Number of Astrocytes Determine Dopaminergic Neuron Survival and Function Under 6-OHDA Stress Mediated Through Differential BDNF Release. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5505–5525. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0767-0>
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Humot, S., Singleton, A., Olanow, C. W., Merchant, K. M., Bezard, E., Petsko, G. A., & Meissner, W. G. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: Mechanistic and therapeutic considerations. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 855–866). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00006-X)
- Delenclos, M., Burgess, J. D., Lamprokostopoulou, A., Outeiro, T. F., Vekrellis, K., & McLean, P. J. (2019). Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 150, Issue 5, pp. 566–576). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.14806>
- Derkinderen, P., Rouaud, T., Lebouvier, T., Bruley Des Varannes, S., Neunlist, M., & De Giorgio, R. (2011). *Parkinson disease The enteric nervous system spills its guts*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318236ef60>

- Deuel, L. M., & Seeberger, L. C. (2020). Complementary Therapies in Parkinson Disease: a Review of Acupuncture, Tai Chi, Qi Gong, Yoga, and Cannabis. In *Neurotherapeutics* (Vol. 17, Issue 4, pp. 1434–1455). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00900-y>
- Di Giaimo, R., Penna, E., Pizzella, A., Cirillo, R., Perrone-capano, C., & Crispino, M. (2020). Cross talk at the cytoskeleton-plasma membrane interface: impact on neuronal morphology and functions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 23, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21239133>
- Ding, X., Jiang, X., Tian, R., Zhao, P., Li, L., Wang, X., Chen, S., Zhu, Y., Mei, M., Bao, S., Liu, W., Tang, Z., & Sun, Q. (2019). RAB2 regulates the formation of autophagosome and autolysosome in mammalian cells. *Autophagy*, 15(10), 1774–1786. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596478>
- Domingues, A. V., Pereira, I. M., Vilaça-Faria, H., Salgado, A. J., Rodrigues, A. J., & Teixeira, F. G. (2020). Glial cells in Parkinson´s disease: protective or deleterious? In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 24, pp. 5171–5188). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03584-x>
- Dong, J., Cui, Y., Li, S., & Le, W. (2016). *Current Pharmaceutical Treatments and Alternative Therapies of Parkinson´s Disease*. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666151120123025>
- Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The emerging evidence of the Parkinson pandemic. In *Journal of Parkinson´s Disease* (Vol. 8, Issue s1, pp. S3–S8). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>
- Dou, D., Aiken, J., & Holzbaur, E. L. F. (2023). RAB3 phosphorylation by pathogenic LRRK2 impairs trafficking of synaptic vesicle precursors. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.25.550521>
- Dovonou, A., Bolduc, C., Soto Linan, V., Gora, C., Peralta, M. R., & Lévesque, M. (2023). Animal models of Parkinson´s disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. In *Translational Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00368-8>
- D’Souza, Z., Pokrovskaya, I., & Lupashin, V. V. (2023). Syntaxin-5’s flexibility in SNARE pairing supports Golgi functions. *Traffic*, 24(8), 355–379. <https://doi.org/10.1111/tra.12903>
- Du, X. Y., Xie, X. X., & Liu, R. T. (2020). The role of α -synuclein oligomers in parkinson’s disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 22, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21228645>

- Emamzadeh, F. N. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. In *Journal of Research in Medical Sciences* (Vol. 21, Issue 2). Isfahan University of Medical Sciences(IUMS). <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>
- Encarnação, M., Espada, L., Escrevente, C., Mateus, D., Ramalho, J., Michelet, X., Santarino, I., Hsu, V. W., Brenner, M. B., Barral, D. C., & Vieira, O. V. (2016). A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, 213(6), 631–640. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511093>
- Erickson, C. S., Lee, S. J., Barlow-Anacker, A. J., Druckenbrod, N. R., Epstein, M. L., & Gosain, A. (2014). Appearance of cholinergic myenteric neurons during enteric nervous system development: Comparison of different ChAT fluorescent mouse reporter lines. *Neurogastroenterology and Motility*, 26(6), 874–884. <https://doi.org/10.1111/nmo.12343>
- Espay, A. J., & Lees, A. J. (2024). Loss of monomeric alpha-synuclein (synucleinopenia) and the origin of Parkinson's disease. In *Parkinsonism and Related Disorders*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2024.106077>
- Estaun-Panzano, J., Arotcarena, M. L., & Bezard, E. (2023). Monitoring α -synuclein aggregation. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 176). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105966>
- Fan, J., Hu, Z., Zeng, L., Lu, W., Tang, X., Zhang, J., & Li, T. (2008). Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. In *International Journal of Developmental Neuroscience* (Vol. 26, Issue 6, pp. 523–534). <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.05.006>
- Felten, D. L., O'Banion, M. K., & Maida, M. S. (2016). 9 - Peripheral Nervous System. In D. L. Felten, M. K. O'Banion, & M. S. Maida (Eds.), *Netter's Atlas of Neuroscience (Third Edition)* (pp. 153–231). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-26511-9.00009-6>
- Fernández-Tresguerres, J. A., Cachofeiro, V., Cardinali, D. P., Delpón, E., Díaz-Rubio, E. R., Lahera Juliá, V., Mora Teruel, F., & Romano Pardo, M. (2020). *Fisiología humana* (5ª edición). McGraw Hill.
- Fleming, M. A., Ehsan, L., Moore, S. R., & Levin, D. E. (2020). The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target. In *Gastroenterology Research and Practice* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/8024171>
- Fricova, D., Harsanyiova, J., & Trancikova, A. K. (2020). Alpha-synuclein in the gastrointestinal tract as a potential biomarker for early detection of parkinson's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 22, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21228666>

- Fujita, Y., Ohama, E., Takatama, M., Al-Sarraj, S., & Okamoto, K. (2006). Fragmentation of Golgi apparatus of nigral neurons with α -synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 112(3), 261–265. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0114-4>
- Furlong, R. M., O'Keeffe, G. W., O'Neill, C., & Sullivan, A. M. (2020). Alterations in α -synuclein and PINK1 expression reduce neurite length and induce mitochondrial fission and Golgi fragmentation in midbrain neurons. *Neuroscience Letters*, 720. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134777>
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 286–294). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: Integrated local and central control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- Furness, J. B., Li, Z. S., Young, H. M., & Förstermann, U. (1994). Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. In *Cell Tissue Res* (Vol. 277). <https://doi.org/10.1007/BF00303090>
- Gaig, C., Martí, M. J., Ezquerra, M., Cardozo, A., Rey, M. J., & Tolosa, E. (2009). G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *BMJ Case Reports*. <https://doi.org/10.1136/bcr.08.2008.0632>
- Galea, G., Bexiga, M. G., Panarella, A., O'Neill, E. D., & Simpson, J. C. (2015). A high-content screening microscopy approach to dissect the role of Rab proteins in Golgi-to-ER retrograde trafficking. *Journal of Cell Science*, 128(13), 2339–2349. <https://doi.org/10.1242/jcs.167973>
- Ganapathy, K., Datta, I., Sowmithra, S., Joshi, P., & Bhonde, R. (2016). Influence of 6-Hydroxydopamine Toxicity on α -Synuclein Phosphorylation, Resting Vesicle Expression, and Vesicular Dopamine Release. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2719–2736. <https://doi.org/10.1002/jcb.25570>
- Geng, X., Lou, H., Wang, J., Li, L., Swanson, A. L., Sun, M., Beers-Stolz, D., Watkins, S., Perez, R. G., & Drain, P. (2011). α -synuclein binds the KATP channel at insulin-secreatory granules and inhibits insulin secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 300(2). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00262.2010>
- Gentil, B. J., Tibshirani, M., & Durham, H. D. (2015). Neurofilament dynamics and involvement in neurological disorders. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 360, Issue 3, pp. 609–620). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2082-7>

- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1997). The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature*, *387*(6635), 810–814. <https://doi.org/10.1038/42954>
- Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P. K., & Maji, S. K. (2017). α -synuclein aggregation and its modulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *100*, 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021>
- Goldstein, D. S., Holmes, C., Kopin, I. J., & Sharabi, Y. (2011). Intra-neuronal vesicular uptake of catecholamines is decreased in patients with Lewy body diseases. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(8), 3320–3330. <https://doi.org/10.1172/JCI45803>
- Gonatas, N. K., Stieber, A., & Gonatas, J. O. (2006). Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *Journal of the Neurological Sciences*, *246*(1–2), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.01.019>
- Gosavi, N., Lee, H. J., Lee, J. S., Patel, S., & Lee, S. J. (2002). Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar α -synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(50), 48984–48992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208194200>
- Götz, T. W. B., Puchkov, D., Lysiuk, V., Lützkendorf, J., Nikonenko, A. G., Quentin, C., Lehmann, M., Sigrist, S. J., & Petzoldt, A. G. (2021). Rab2 regulates presynaptic precursor vesicle biogenesis at the trans-golgi. *Journal of Cell Biology*, *220*(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.202006040>
- Goud, B., Liu, S., & Storrie, B. (2018). Rab proteins as major determinants of the Golgi complex structure. *Small GTPases*, *9*(1–2), 66–75. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1384087>
- Guo, Y., Sirkis, D. W., & Schekman, R. (2014). Protein sorting at the trans-Golgi network. In *Annual review of cell and developmental biology* (Vol. 30, pp. 169–206). <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013012>
- Gurel, P. S., Hatch, A. L., & Higgs, H. N. (2014). Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi. In *Current Biology* (Vol. 24, Issue 14). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.033>
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
- Hadi, F., Akrami, H., Totonchi, M., Barzegar, A., Nabavi, S. M., & Shahpasand, K. (2021). α -synuclein abnormalities trigger focal tau pathology, spreading to various brain areas in Parkinson disease. *Journal of Neurochemistry*, *157*(3), 727–751. <https://doi.org/10.1111/jnc.15257>
- Han, C., Yang, J., Yin, T., An, J., Qiao, A., Cao, Y., Feng, Y., Lu, H., Wang, Y., Yang, L., & Qin, G. (2023). CD63-snorkel tagging for isolation of exosomes. *Extracellular Vesicle*, *2*, 100031. <https://doi.org/10.1016/j.vesic.2023.100031>

- Handley, M. T. W., Haynes, L. P., & Burgoyne, R. D. (2007). Differential dynamics of Rab3A and Rab27A on secretory granules. *Journal of Cell Science*, 120(6), 973–984. <https://doi.org/10.1242/jcs.03406>
- Harsanyi, J., Buday, T., & Kralova Trancikova, A. (2020). Parkinson's Disease and the Gut: Future Perspectives for Early Diagnosis. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00626>
- Hasegawa, T., Sugeno, N., Kikuchi, A., Baba, T., & Aoki, M. (2017). Membrane trafficking illuminates a path to Parkinson's disease. In *Tohoku Journal of Experimental Medicine* (Vol. 242, Issue 1, pp. 63–76). Tohoku University Medical Press. <https://doi.org/10.1620/tjem.242.63>
- Hay, J. C., & Chao, D. S. (1997). Protein Interactions Regulating Vesicle Transport between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus in Mammalian Cells. In *Cell* (Vol. 89).
- He, Q., Liu, H., Deng, S., Chen, X., Li, D., Jiang, X., Zeng, W., & Lu, W. (2020). The Golgi Apparatus May Be a Potential Therapeutic Target for Apoptosis-Related Neurological Diseases. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00830>
- Henderson, M. X., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2019). α -Synuclein pathology in Parkinson's disease and related α -synucleinopathies. In *Neuroscience Letters* (Vol. 709). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134316>
- Heras-Garvin, A., & Stefanova, N. (2020). From Synaptic Protein to Prion: The Long and Controversial Journey of α -Synuclein. In *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.584536>
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. In *Neurología* (Vol. 32, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.011>
- Herrity, A. N., Rau, K. K., Petruska, J. C., Stirling, D. P., & Hubscher, C. H. (2014). Identification of bladder and colon afferents in the nodose ganglia of male rats. *Journal of Comparative Neurology*, 522(16), 3667–3682. <https://doi.org/10.1002/cne.23629>
- Hicks, S. W., & Machamer, C. E. (2005). Golgi structure in stress sensing and apoptosis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1744, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 406–414). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.03.002>
- Hilton, D., Stephens, M., Kirk, L., Edwards, P., Potter, R., Zajicek, J., Broughton, E., Hagan, H., & Carroll, C. (2014). Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 127(2), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1214-6>

- Hira, V. V. V., de Jong, A. L., Ferro, K., Khurshed, M., Molenaar, R. J., & Van Noorden, C. J. F. (2019). Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry. *Acta Histochemica*, 121(2), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.10.011>
- Hoenen, C., Gustin, A., Birck, C., Kirchmeyer, M., Beaume, N., Felten, P., Grandbarbe, L., Heuschling, P., & Heurtaux, T. (2016). Alpha-synuclein proteins promote pro-inflammatory cascades in microglia: Stronger effects of the a53t mutant. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162717>
- Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Björklund, T., Wang, Z. Y., Roybon, L., Melki, R., & Li, J. Y. (2014). Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathologica*, 128(6), 805–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1343-6>
- Hong, W. J., & Lev, S. (2014). Tethering the assembly of SNARE complexes. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 35–43). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.006>
- Houy, S., Croisé, P., Gubar, O., Chasserot-Golaz, S., Tryoen-Tóth, P., Bailly, Y., Ory, S., Bader, M. F., & Gasman, S. (2013). Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: Inseparable membranes! In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 4, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00135>
- Huang, B., Li, X., & Zhu, X. (2021). The Role of GM130 in Nervous System Diseases. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.743787>
- Huang, C. C., Yang, D. M., Lin, C. C., & Kao, L. Sen. (2011). Involvement of Rab3A in vesicle priming during exocytosis: Interaction with Munc13-1 and Munc18-1. *Traffic*, 12(10), 1356–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01237.x>
- Huang, M., Bagues-Carot, A., Riaz, Z., Wickham, H., Zenitsky, G., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2022). Impact of Environmental Risk Factors on Mitochondrial Dysfunction, Neuroinflammation, Protein Misfolding, and Oxidative Stress in the Etiopathogenesis of Parkinson's Disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231810808>
- Huang, S., Tang, D., & Wang, Y. (2016). Monoubiquitination of Syntaxin 5 Regulates Golgi Membrane Dynamics during the Cell Cycle. *Developmental Cell*, 38(1), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.001>
- Hui, N., Nakamura, N., S8innichsen, B., Shima, D. T., Nilssona, T., & Warren, G. (1997). An Isoform of the Golgi t-SNARE, Syntaxin 5, with an Endoplasmic Reticulum Retrieval Signal. In *An Isoform of the Golgi t-SNARE* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1091/mbc.8.9.1777>

- Huot, P., & Parent, A. (2007). Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 101, Issue 6, pp. 1441–1447). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04430.x>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. In *EMBO Journal* (Vol. 30, Issue 17, pp. 3481–3500). <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Ishiguro, Y., Tsunemi, T., Shimada, T., Yoroisaka, A., Ueno, S. I., Takeshige-Amano, H., Hatano, T., Inoue, Y., Saiki, S., & Hattori, N. (2024). Extracellular vesicles contain filamentous alpha-synuclein and facilitate the propagation of Parkinson's pathology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 703. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149620>
- Jan, A., Gonçalves, N. P., Vaegter, C. B., Jensen, P. H., & Ferreira, N. (2021). The prion-like spreading of alpha-synuclein in parkinson's disease: Update on models and hypotheses. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22158338>
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 91(8), 795–808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>
- Jeong, G. R., & Lee, B. D. (2020). Pathological Functions of LRRK2 in Parkinson's Disease. In *Cells* (Vol. 9, Issue 12). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9122565>
- Johansen, K. K., Torp, S. H., Farrer, M. J., Gustavsson, E. K., & Aasly, J. O. (2018). A Case of Parkinson's Disease with No Lewy Body Pathology due to a Homozygous Exon Deletion in Parkin. *Case Reports in Neurological Medicine*, 2018, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2018/6838965>
- Johnson, C. D., Barlow-Anacker, A. J., Pierre, J. F., Touw, K., Erickson, C. S., Furness, J. B., Epstein, M. L., & Gosain, A. (2018). Deletion of choline acetyltransferase in enteric neurons results in postnatal intestinal dysmotility and dysbiosis. *FASEB Journal*, 32(9), 4744–4752. <https://doi.org/10.1096/fj.201701474RR>
- Joshi, G., Bekier, M. E., & Wang, Y. (2015). Golgi fragmentation in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00340>
- Kakimoto, K., Takekoshi, S., Miyajima, K., & Osamura, R. Y. (2008). Hypothesis for the mechanism for heat-induced antigen retrieval occurring on fresh frozen sections without formalin-fixation in immunohistochemistry. *Journal of Molecular Histology*, 39(4), 389–399. <https://doi.org/10.1007/s10735-008-9177-y>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. In *Science* (Vol. 367, Issue 6478). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>

- Karampetsou, M., Sykioti, V. S., Leandrou, E., Melachroinou, K., Lambiris, A., Giannelos, A., Emmanouilidou, E., & Vekrellis, K. (2020). Intrastriatal Administration of Exosome-Associated Pathological Alpha-Synuclein Is Not Sufficient by Itself to Cause Pathology Transmission. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00246>
- Kat, M., Karampini, E., Hoogendijk, A. J., Bürgisser, P. E., Mulder, A. A., van Alphen, F. P. J., Olins, J., Geerts, D., van den Biggelaar, M., Margadant, C., Voorberg, J., & Bierings, R. (2022). Syntaxin 5 determines Weibel-Palade body size and von Willebrand factor secretion by controlling Golgi architecture. *Haematologica*, 107(8), 1827–1839. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.280121>
- Khan, A. U., Akram, M., Daniyal, M., & Zainab, R. (2019). Awareness and current knowledge of Parkinson's disease: a neurodegenerative disorder. In *International Journal of Neuroscience* (Vol. 129, Issue 1, pp. 55–93). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1486837>
- Kienzle, C., & von Blume, J. (2014). Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 24, Issue 10, pp. 584–593). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.007>
- Kim, B., Weerasinghe-Mudiyanselage, P. D. E., Ang, M. J., Lee, J., Kang, S., Kim, J. C., Kim, S. H., Kim, J. S., Jung, C., Shin, T., & Moon, C. (2022). Changes in the Neuronal Architecture of the Hippocampus in a 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rat Model of Parkinson Disease. *International Neuropsychology Journal*, 26(S2), S94–S105. <https://doi.org/10.5213/inj.2244252.126>
- Kim, S., Kwon, S. H., Kam, T. I., Panicker, N., Karuppagounder, S. S., Lee, S., Lee, J. H., Kim, W. R., Kook, M., Foss, C. A., Shen, C., Lee, H., Kulkarni, S., Pasricha, P. J., Lee, G., Pomper, M. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ko, H. S. (2019). Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron*, 103(4), 627–641.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.035>
- Kim, S. S., Bae, Y., Kwon, O., Kwon, S. H., Seo, J. B., Hwang, E. M., & Park, J. Y. (2022). β -COP Regulates TWIK1/TREK1 Heterodimeric Channel-Mediated Passive Conductance in Astrocytes. *Cells*, 11(20). <https://doi.org/10.3390/cells11203322>
- Kim, S.-S., Park, J., Kim, E., Hwang, E. M., & Park, J.-Y. (2023). β -COP Suppresses the Surface Expression of the TREK2. *Cells*, 12(11), 1500. <https://doi.org/10.3390/cells12111500>
- Kiral, F. R., Kohrs, F. E., Jin, E. J., & Hiesinger, P. R. (2018). Rab GTPases and Membrane Trafficking in Neurodegeneration. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. R471–R486). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.010>

- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 39, Issue 1, pp. 31–59). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
- Kobylecki, C. (2020). Update on the diagnosis and management of Parkinson's disease. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, 20(4), 393–398. <https://doi.org/10.7861/CLINMED.2020-0220>
- Koike, S., & Jahn, R. (2022). SNARE proteins: Zip codes in vesicle targeting? In *Biochemical Journal* (Vol. 479, Issue 3, pp. 273–288). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210719>
- Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 14(5), 504–506. <https://doi.org/10.1038/nm1747>
- Kostrzewa, R. M. (2022). Neonatal 6-hydroxydopamine lesioning of rats and dopaminergic neurotoxicity: proposed animal model of Parkinson's disease. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 129, Issues 5–6, pp. 445–461). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00702-022-02479-4>
- Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W.-L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* (pp. 3–26). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1>
- Krylova, S. V., & Feng, D. (2023). The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>
- Kulkarni-Gosavi, P., Makhoul, C., & Gleeson, P. A. (2019). Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signalling. In *FEBS Letters* (Vol. 593, Issue 17, pp. 2289–2305). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13567>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Lashuel, H. A., & Hirling, H. (2006). Rescuing defective vesicular trafficking protects against alpha-synuclein toxicity in cellular and animal models of Parkinson's disease. In *ACS chemical biology* (Vol. 1, Issue 7, pp. 420–424). <https://doi.org/10.1021/cb600331e>
- Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A., & Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: From structure and toxicity to therapeutic target. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 1, pp. 38–48). <https://doi.org/10.1038/nrn3406>

- Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., Derkinderen, P., & Lebouvier, T. (2020). The gut in Parkinson's disease: Bottom-up, top-down, or neither? In *Neurogastroenterology and Motility* (Vol. 32, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nmo.13777>
- Lee, D., Dallapiazza, R., De Vloo, P., & Lozano, A. (2018). Current surgical treatments for Parkinson's disease and potential therapeutic targets. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 13, Issue 8, pp. 1342-1345). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235220>
- Lee, J. S., & Lee, S.-J. (2016). Mechanism of Anti- α -Synuclein Immunotherapy. *J Mov Disord*, 9(1). <https://doi.org/10.14802/jmd.15059/J>
- Leenders, A. G. M., Lopes Da Silva, F. H., Ghijsen, W. E. J. M., & Verhage, M. (2001). Rab3A Is Involved in Transport of Synaptic Vesicles to the Active Zone in Mouse Brain Nerve Terminals. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.3095>
- Leta, V., Urso, D., Batzu, L., Lau, Y. H., Mathew, D., Boura, I., Raeder, V., Falup-Pecurariu, C., van Wamelen, D., & Ray Chaudhuri, K. (2022). Viruses, parkinsonism and Parkinson's disease: the past, present and future. In *Journal of Neural Transmission*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00702-022-02536-y>
- Li, J., Ahat, E., & Wang, Y. (2019). Golgi structure and function in health, stress, and diseases. In *Results and Problems in Cell Differentiation* (Vol. 67, pp. 441-485). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23173-6_19
- Li, Z. S., Pham, T. D., Tamir, H., Chen, J. J., & Gershon, M. D. (2004). Enteric Dopaminergic Neurons: Definition, Developmental Lineage, and Effects of Extrinsic Denervation. *Journal of Neuroscience*, 24(6), 1330-1339. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3982-03.2004>
- Linders, P. T. A., Gerretsen, E. C. F., Ashikov, A., Vals, M.-A., de Boer, R., Revelo, N. H., Arts, R., Baerenfaenger, M., Zijlstra, F., Huijben, K., Raymond, K., Muru, K., Fjodorova, O., Pajusalu, S., Öunap, K., Beest, M. ter, Lefeber, D., & van den Bogaart, G. (2020). *Congenital disorder of glycosylation caused by starting site-specific variant in syntaxin-5*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20044438>
- Linders, P. T. A., van der Horst, C., Ter Beest, M., & van den Bogaart, G. (2019). Stx5-mediated ER-Golgi transport in mammals and yeast. In *Cells* (Vol. 8, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8080780>
- Lionnet, A., Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., Murayama, S., Takao, M., Adler, C. H., Derkinderen, P., & Beach, T. G. (2018). Does Parkinson's disease start in the gut? In *Acta Neuropathologica* (Vol. 135, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1777-8>

- Liu, B., Pedersen, N. L., Tillander, A., Ludvigsson, J. F., Ekbom, A., Svenningsson, P., Chen, H., & Wirdefeldt, K. (2017). Vagotomy and Parkinson disease A Swedish register-based matched-cohort study. In *Neurology @* (Vol. 88). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003961>
- Liu, J., He, J., Huang, Y., Xiao, H., Jiang, Z., & Hu, Z. (2019). The Golgi apparatus in neurorestoration. *Journal of Neurorestoratology*, 7(3), 116-128. <https://doi.org/10.26599/jnr.2019.9040017>
- Liu, J., Huang, Y., Li, T., Jiang, Z., Zeng, L., & Hu, Z. (2021). The role of the Golgi apparatus in disease (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 47, Issue 4). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4871>
- Liu, S., & Storrie, B. (2012). Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 69, Issue 24, pp. 4093-4106). <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1021-6>
- Liu, S., & Storrie, B. (2015). How Rab Proteins Determine Golgi Structure. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 315, 1-22. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2014.12.002>
- Lowe, M. (2011). Structural organization of the Golgi apparatus. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 85-93). <https://doi.org/10.1016/j.jceb.2010.10.004>
- Lu, X., Kim-Han, J. S., Harmon, S., Sakiyama-Elbert, S. E., & O'Malley, K. L. (2014). The Parkinsonian mimetic, 6-OHDA, impairs axonal transport in dopaminergic axons. *Molecular Neurodegeneration*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-17>
- Luo, S. X., & Huang, E. J. (2016). Dopaminergic neurons and brain reward pathways: From neurogenesis to circuit assembly. In *American Journal of Pathology* (Vol. 186, Issue 3, pp. 478-488). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.023>
- Lv, G., Ko, M. S., Das, T., & Eliezer, D. (2022). Molecular and functional interactions of alpha-synuclein with Rab3a. *Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102239. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102239>
- MacGillavry, H. D., & Hoogenraad, C. C. (2018). Membrane trafficking and cytoskeletal dynamics in neuronal function. In *Molecular and Cellular Neuroscience* (Vol. 91, pp. 1-2). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.08.003>
- Machamer, C. E. (2015). The Golgi complex in stress and death. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue NOV). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00421>
- Makaraci, P., & Kim, K. (2018). trans-Golgi network-bound cargo traffic. In *European Journal of Cell Biology* (Vol. 97, Issue 3, pp. 137-149). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.01.003>

- Margiotta, A. (2021). Role of snares in neurodegenerative diseases. In *Cells* (Vol. 10, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10050991>
- Martínez-Menárguez, J. Á., Martínez-Alonso, E., Cara-Esteban, M., & Tomás, M. (2021). Focus on the Small GTPase Rab1: A Key Player in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci*, *22*, 12087. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Martínez-Menárguez, J. Á., Tomás, M., Martínez-Martínez, N., & Martínez-Alonso, E. (2019). Golgi fragmentation in neurodegenerative diseases: Is there a common cause? In *Cells* (Vol. 8, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8070748>
- Masato, A., Plotegher, N., Boassa, D., & Bubacco, L. (2019). Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0332-6>
- Mascanzoni, F., Iannitti, R., & Colanzi, A. (2022). Functional Coordination among the Golgi Complex, the Centrosome and the Microtubule Cytoskeleton during the Cell Cycle. In *Cells* (Vol. 11, Issue 3). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells11030354>
- Mathews, P. M., & Levy, E. (2019). Exosome Production Is Key to Neuronal Endosomal Pathway Integrity in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01347>
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J. I., Maurin, M., Verweij, F. J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., Rubinstein, E., Boncompain, G., Perez, F., & Théry, C. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2>
- Matsui, H., Ito, H., Taniguchi, Y., Inoue, H., Takeda, S., & Takahashi, R. (2010). Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *115*(1), 178–187. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06918.x>
- Matsumoto, J., Stewart, T., Sheng, L., Li, N., Bullock, K., Song, N., Shi, M., Banks, W. A., & Zhang, J. (2017). Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathologica Communications*, *5*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0470-4>
- Mavroeidi, P., Vetsi, M., Dionysopoulou, D., & Xilouri, M. (2022). Exosomes in Alpha-Synucleinopathies: Propagators of Pathology or Potential Candidates for Nanotherapeutics? In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12070957>

- Mazzulli, J. R., Zunke, F., Isacson, O., Studer, L., & Krainc, D. (2016). α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), 1931–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520335113>
- McCorry, L. K. (2007). Physiology of the autonomic nervous system. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71(4), 78. <https://doi.org/10.5688/aj710478>
- Mehra, S., Sahay, S., & Maji, S. K. (2019). α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1867, Issue 10, pp. 890–908). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.03.001>
- Merighi, A., & Lossi, L. (2022). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and Neuronal Cell Death. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232315186>
- Michel, K., Kuch, B., Dengler, S., Demir, I. E., Zeller, F., & Schemann, M. (2022). How big is the little brain in the gut? Neuronal numbers in the enteric nervous system of mice, Guinea pig, and human. *Neurogastroenterology and Motility*, 34(12). <https://doi.org/10.1111/nmo.14440>
- Mikhaylova, M., Bera, S., Kobler, O., Frischknecht, R., & Kreutz, M. R. (2016). A Dendritic Golgi Satellite between ERGIC and Retromer. *Cell Reports*, 14(2), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.024>
- Mohan, A. G., Calenic, B., Ghiurau, N. A., Duncea-Borca, R. M., Constantinescu, A. E., & Constantinescu, I. (2023). The Golgi Apparatus: A Voyage through Time, Structure, Function and Implication in Neurodegenerative Disorders. In *Cells* (Vol. 12, Issue 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells12151972>
- Muñoz-Ballester, C., & Robel, S. (2023). Astrocyte-mediated mechanisms contribute to traumatic brain injury pathology. *WIREs Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1622>
- Mustapha, M., & Taib, C. N. M. (2021). MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(4), 422–433. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.5181>
- Mysiris, D. S., Vavougiou, G. D., Karamichali, E., Papoutsopoulou, S., Stavrou, V. T., Papayianni, E., Boutlas, S., Mavridis, T., Foka, P., Zarogiannis, S. G., Gourgioulanis, K., & Xiromerisiou, G. (2022). Post-COVID-19 Parkinsonism and Parkinson's Disease Pathogenesis: The Exosomal Cargo Hypothesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23179739>

- Natale, G., Ryskalin, L., Busceti, C. L., Biagioni, F., & Fornai, F. (2017). The nature of catecholamine-containing neurons in the enteric nervous system in relationship with organogenesis, normal human anatomy and neurodegeneration. *Archives Italiennes de Biologie*, 155(3), 118–130. <https://doi.org/10.12871/00039829201733>
- Natale, G., Ryskalin, L., Morucci, G., Lazzeri, G., Frati, A., & Fornai, F. (2021). The baseline structure of the enteric nervous system and its role in parkinson's disease. In *Life* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11080732>
- Neuhuber, W., & Wörl, J. (2018). Monoamines in the enteric nervous system. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 150, Issue 6, pp. 703–709). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1723-4>
- Oaks, A. W., Frankfurt, M., Finkelstein, D. I., & Sidhu, A. (2013). Age-Dependent Effects of A53T Alpha-Synuclein on Behavior and Dopaminergic Function. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060378>
- Oaks, A. W., Marsh-Armstrong, N., Jones, J. M., Credle, J. J., & Sidhu, A. (2013). Synucleins Antagonize Endoplasmic Reticulum Function to Modulate Dopamine Transporter Trafficking. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070872>
- Oaks, A. W., & Sidhu, A. (2013). Parallel mechanisms for direct and indirect membrane protein trafficking by synucleins. In *Communicative and Integrative Biology* (Vol. 6, Issue 6). <https://doi.org/10.4161/cib.26794>
- O'Donovan, S. M., Crowley, E. K., Brown, J. R. M., O'Sullivan, O., O'Leary, O. F., Timmons, S., Nolan, Y. M., Clarke, D. J., Hyland, N. P., Joyce, S. A., Sullivan, A. M., & O'Neill, C. (2020). Nigral overexpression of α -synuclein in a rat Parkinson's disease model indicates alterations in the enteric nervous system and the gut microbiome. *Neurogastroenterology and Motility*, 32(1). <https://doi.org/10.1111/nmo.13726>
- Oliveira da Silva, M. I., & Liz, M. A. (2020a). Linking Alpha-Synuclein to the Actin Cytoskeleton: Consequences to Neuronal Function. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00787>
- Oliveira da Silva, M. I., & Liz, M. A. (2020b). Linking Alpha-Synuclein to the Actin Cytoskeleton: Consequences to Neuronal Function. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00787>
- Pacheco, C. R., Morales, C. N., Ramírez, A. E., Muñoz, F. J., Gallegos, S. S., Caviedes, P. A., Aguayo, L. G., & Opazo, C. M. (2015). Extracellular α -synuclein alters synaptic transmission in brain neurons by perforating the neuronal plasma membrane. *Journal of Neurochemistry*, 132(6), 731–741. <https://doi.org/10.1111/jnc.13060>

- Palma, R., & Sanhueza, P. (2001). Sistema nervioso y sistema digestivo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 12(2), 0. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-sistema-nervioso-sistema-digestivo-X0716864001319121>
- Parato, J., & Bartolini, F. (2021). The microtubule cytoskeleton at the synapse. *Neuroscience Letters*, 753. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135850>
- Park, K., Ju, S., Kim, N., & Park, S. Y. (2021). The Golgi complex: a hub of the secretory pathway. *BMB Reports*, 54(5), 246–252. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.5.270>
- Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy. In *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Pattanayak, R., Underwood, R., Crowley, M. R., Crossman, D. K., Morgan, J. R., & Yacoubian, T. A. (2022). Deletion in chromosome 6 spanning alpha-synuclein and multimerin1 loci in the Rab27a/b double knockout mouse. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13557-8>
- Patterson, G. H., Hirschberg, K., Polishchuk, R. S., Gerlich, D., Phair, R. D., & Lippincott-Schwartz, J. (2008). Transport through the Golgi Apparatus by Rapid Partitioning within a Two-Phase Membrane System. *Cell*, 133(6), 1055–1067. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.044>
- Paxinos, G. & Watson, C. (2013). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (7th Ed.). Academic Press. IBSN 978-0-12-391949-6.
- Payne, G. S., & Schekman, R. (1985). A Test of Clathrin Function in Protein Secretion and Cell Growth. *Science*, 230(4729), 1009–1014. <https://doi.org/10.1126/science.2865811>
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). *Annual Review of Biochemistry Exosomes*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118>
- Pellegrini, L., Wetzel, A., Grannó, S., Heaton, G., & Harvey, K. (2017). Back to the tubule: microtubule dynamics in Parkinson's disease. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 74, Issue 3, pp. 409–434). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2351-6>
- Peng, X. M., Tehranian, R., Dietrich, P., Stefanis, L., & Perez, R. G. (2005). α -synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *Journal of Cell Science*, 118(15), 3523–3530. <https://doi.org/10.1242/jcs.02481>
- Penttinen, A. M., Suleymanova, I., Albert, K., Anttila, J., Voutilainen, M. H., & Airavaara, M. (2016). Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in rat. *Journal of Neuroscience Research*, 94(4), 318–328. <https://doi.org/10.1002/jnr.23708>

- Petrosyan, A. (2019). Unlocking Golgi: Why Does Morphology Matter? In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 84, Issues 12–13, pp. 1490–1501). Pleiades journals. <https://doi.org/10.1134/S0006297919120083>
- Phillips, R. J., & Powley, T. L. (2007). Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. *Autonomic Neuroscience*, 130(1–2), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2007.04.005>
- Picca, A., Guerra, F., Calvani, R., Marini, F., Biancolillo, A., Landi, G., Beli, R., Landi, F., Bernabei, R., Bentivoglio, A. R., Lo Monaco, M. R., Bucci, C., & Marzetti, E. (2020). Mitochondrial signatures in circulating extracellular vesicles of older adults with parkinson's disease: Results from the exosomes in parkinson's disease (EXPAND) study. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jcm9020504>
- Pingale, T., & Gupta, G. L. (2020). Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. In *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (Vol. 199). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173060>
- Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. In *Experimental Cell Research* (Vol. 315, Issue 9, pp. 1584–1592). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
- Potter, K. A., Simon, J. S., Velagapudi, B., & Capadona, J. R. (2012). Reduction of autofluorescence at the microelectrode-cortical tissue interface improves antibody detection. *Journal of Neuroscience Methods*, 203(1), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.09.024>
- Progida, C. (2019). Multiple roles of rab gtpases at the Golgi. In *Results and Problems in Cell Differentiation* (Vol. 67, pp. 95–123). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23173-6_6
- Qualman, S. J., Haupt, H. M., Yang, P., & Hamilton, S. R. (1984). Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology*, 87(4), 848–856.
- Qureshi, A. R., Jamal, M. K., Rahman, E., Paul, D. A., Oghli, Y. S., Mulaffer, M. T., Qureshi, D., Danish, M. A., & Rana, A. Q. (2021). Non-pharmacological therapies for pain management in Parkinson's disease: A systematic review. In *Acta Neurologica Scandinavica* (Vol. 144, Issue 2, pp. 115–131). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ane.13435>
- Raiborg, C., & Stenmark, H. (2016). Plasma membrane repairs by small GTPase Rab3a. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 213, Issue 6, pp. 613–615). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201606006>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 373–383). <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>

- Rastogi, S., Rani, K., Rai, S., Singh, R., Bharti, P. S., Sharma, V., Sahu, J., Kapoor, V., Vishwakarma, P., Garg, S., Gholap, S. L., Inampudi, K. K., Modi, G. P., Rani, N., Tripathi, M., Srivastava, A., Rajan, R., Nikolajeff, F., & Kumar, S. (2023). Fluorescence-tagged salivary small extracellular vesicles as a nanotool in early diagnosis of Parkinson's disease. *BMC Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03031-1>
- Rausch, W. D., Wang, F., & Radad, K. (2022). From the tyrosine hydroxylase hypothesis of Parkinson's disease to modern strategies: a short historical overview. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 129, Issues 5–6, pp. 487–495). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00702-022-02488-3>
- Raza, C., Anjum, R., & Shakeel, N. ul A. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. In *Life Sciences* (Vol. 226, pp. 77–90). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
- Reich, S. G., & Savitt, J. M. (2019). Parkinson's Disease. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 103, Issue 2, pp. 337–350). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>
- Reichmann, H. (2017). Premotor Diagnosis of Parkinson's Disease. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 33, Issue 5, pp. 526–534). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0159-5>
- Rendón, W. O., Martínez-Alonso, E., Tomás, M., Martínez-Martínez, N., & Martínez-Menárguez, J. A. (2013). Golgi fragmentation is Rab and SNARE dependent in cellular models of Parkinson's disease. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(5), 671–684. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1059-4>
- Renna, M., Schaffner, C., Winslow, A. R., Menzies, F. M., Peden, A. A., Floto, R. A., & Rubinsztein, D. C. (2011). Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *Journal of Cell Science*, 124(3), 469–482. <https://doi.org/10.1242/jcs.076489>
- Rentsch, P., Stayte, S., Morris, G. P., & Vissel, B. (2019). Time dependent degeneration of the nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the effect of activin A on l-Dopa induced dyskinesia. *BMC Neuroscience*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0487-7>
- Risselada, H. J., & Mayer, A. (2020). SNAREs, tethers and SM proteins: How to overcome the final barriers to membrane fusion? In *Biochemical Journal* (Vol. 477, Issue 1, pp. 243–258). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190050>
- Rizo, J. (2018). Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. In *Protein Science* (Vol. 27, Issue 8, pp. 1364–1391). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3445>

- Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 109, pp. 249–257). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004>
- Rothman, J. E. (1981). The Golgi Apparatus: Two Organelles in Tandem. *Science*, 213(4513), 1212–1219. <https://doi.org/10.1126/science.7268428>
- Rufino-Ramos, D., Lule, S., Mahjoun, S., Ughetto, S., Cristopher Bragg, D., Pereira de Almeida, L., Breakefield, X. O., & Breyne, K. (2022). Using genetically modified extracellular vesicles as a non-invasive strategy to evaluate brain-specific cargo. *Biomaterials*, 281. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121366>
- Rust, M. B., & Maritzen, T. (2015). Relevance of presynaptic actin dynamics for synapse function and mouse behavior. *Experimental Cell Research*, 335(2), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.12.020>
- Salari, S., & Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. In *Physiological Research* (Vol. 68, Issue 1, pp. 17–24). Czech Academy of Sciences. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>
- Sanchez, G., Varaschin, R. K., Büeler, H., Marcogliese, P. C., Park, D. S., & Trudeau, L. E. (2014). Unaltered striatal dopamine release levels in young Parkin knockout, Pink1 knockout, DJ-1 knockout and LRRK2 R1441G transgenic mice. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094826>
- Samnerud, R., Marie, M., Nizak, C., Hege, S., Dale, A., Pernet-Gallay, K., Perez, F., Goud, B., & Saraste, J. (2006). Rab1 Defines a Novel Pathway Connecting the Pre-Golgi Intermediate Compartment with the Cell Periphery □ V. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1514–1526. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-08>
- Saraste, J. (2016). Spatial and functional aspects of ER-Golgi Rabs and Tethers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(APR). <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00028>
- Savitt, D., & Jankovic, J. (2019). Targeting α -Synuclein in Parkinson's Disease: Progress Towards the Development of Disease-Modifying Therapeutics. In *Drugs* (Vol. 79, Issue 8, pp. 797–810). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01104-1>
- Schaeffer, E., Kluge, A., Böttner, M., Zunke, F., Cossais, F., Berg, D., & Arnold, P. (2020). Alpha Synuclein Connects the Gut-Brain Axis in Parkinson's Disease Patients – A View on Clinical Aspects, Cellular Pathology and Analytical Methodology. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.573696>

- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 30(3), 350–358. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>
- Schlüter, O. M., Khvotchev, M., Jahn, R., & Südhof, T. C. (2002). Localization versus function of Rab3 proteins: Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40919–40929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203704200>
- Schneider, S., Wright, C. M., & Heuckeroth, R. O. (2018). *Annual Review of Physiology Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function*. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317>
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 1, pp. 79–94). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Segura-Aguilar, J., Paris, I., Muñoz, P., Ferrari, E., Zecca, L., & Zucca, F. A. (2014). Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 129, Issue 6, pp. 898–915). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.12686>
- Serratos, I. N., Hernández-Pérez, E., Campos, C., Aschner, M., & Santamaría, A. (2022). An Update on the Critical Role of α -Synuclein in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies: from Tissue to Cellular and Molecular Levels. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 59, Issue 1, pp. 620–642). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02596-3>
- Sevlever, D., Jiang, P., & Yen, S. H. C. (2008). Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of α -synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species. *Biochemistry*, 47(36), 9678–9687. <https://doi.org/10.1021/bi800699v>
- Shahmoradian, S. H., Lewis, A. J., Genoud, C., Hench, J., Moors, T. E., Navarro, P. P., Castaño-Díez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K. N., Sütterlin, R., Huisman, E., Ingrassia, A., Gier, Y. de, Rozemuller, A. J. M., Wang, J., Paepe, A. De, Erny, J., Staempfli, A., ... Lauer, M. E. (2019). Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nature Neuroscience*, 22(7), 1099–1109. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0423-2>
- Sharkey, K. A., & Mawe, G. M. (2023). The enteric nervous system. In *Physiological Reviews* (Vol. 103, Issue 2, pp. 1487–1564). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2022>

- Sharma, M., & Burré, J. (2023). α -Synuclein in synaptic function and dysfunction. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 46, Issue 2, pp. 153–166). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.11.007>
- Sharma, V. D., Patel, M., & Miocinovic, S. (2020). Surgical Treatment of Parkinson's Disease: Devices and Lesion Approaches. *Neurotherapeutics*, 17, 1525–1538. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00939-x/Published>
- Sheehan, P., & Yue, Z. (2019). Deregulation of autophagy and vesicle trafficking in Parkinson's disease. In *Neuroscience Letters* (Vol. 697, pp. 59–65). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.013>
- Shen, L. (2020). Gut, oral and nasal microbiota and Parkinson's disease. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01313-4>
- Shi, M., Liu, C., Cook, T. J., Bullock, K. M., Zhao, Y., Gingham, C., Li, Y., Aro, P., Dator, R., He, C., Hipp, M. J., Zabetian, C. P., Peskind, E. R., Hu, S. C., Quinn, J. F., Galasko, D. R., Banks, W. A., & Zhang, J. (2014). Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 128(5), 639–650. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1314-y>
- Shirai, R., & Yamauchi, J. (2024). Emerging Evidence of Golgi Stress Signaling for Neuropathies. *Neurology International*, 16(2), 334–348. <https://doi.org/10.3390/neurolint16020024>
- Sigurdsson, H. P., Raw, R., Hunter, H., Baker, M. R., Taylor, J. P., Rochester, L., & Yarnall, A. J. (2021). Noninvasive vagus nerve stimulation in Parkinson's disease: current status and future prospects. In *Expert Review of Medical Devices* (Vol. 18, Issue 10, pp. 971–984). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17434440.2021.1969913>
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 11(3,4), 151–167.
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. In *Clinics in Geriatric Medicine* (Vol. 36, Issue 1, pp. 1–12). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Smeyne, R. J., Noyce, A. J., Byrne, M., Savica, R., & Marras, C. (2021). Infection and risk of Parkinson's disease. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 11, Issue 1, pp. 31–43). IOS Press BV. <https://doi.org/10.3233/JPD-202279>
- Smith-Edwards, K. M., Edwards, B. S., Wright, C. M., Schneider, S., Meerschaert, K. A., Ejoh, L. L., Najjar, S. A., Howard, M. J., Albers, K. M., Heuckeroth, R. O., & Davis, B. M. (2021). Sympathetic Input to Multiple Cell Types in Mouse and Human Colon Produces Region-Specific Responses. *Gastroenterology*, 160(4), 1208–1223.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.030>

- Solis, O., Limón, D. I., Flores-Hernández, J., & Flores, G. (2007). Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse*, 61(6), 450–458. <https://doi.org/10.1002/syn.20381>
- Speranza, L., Di Porzio, U., Viggiano, D., Donato, A. De, & Volpicelli, F. (2021). *cells Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control*. <https://doi.org/10.3390/cells>
- Sprenger, F. S., Stefanova, N., Gelpi, E., Seppi, K., Navarro-Otano, J., Offner, F., Vilas, D., Valdeoriola, F., Pont-Sunyer, C., Aldecoa, I., Gaig, C., Gines, A., Cuatrecasas, M., Högl, B., Frauscher, B., Iranzo, A., Wenning, G. K., Vogel, W., Tolosa, E., & Poewe, W. (2015). *Enteric nervous system a-synuclein immunoreactivity in idiopathic REM sleep behavior disorder*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002126>
- Stefanis, L., Emmanouilidou, E., Pantazopoulou, M., Kirik, D., Vekrellis, K., & Tofaris, G. K. (2019). How is alpha-synuclein cleared from the cell? In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 150, Issue 5, pp. 577–590). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.14704>
- Stoddard-Bennett, T., & Pera, R. R. (2019). Treatment of Parkinson's disease through personalized medicine and induced pluripotent stem cells. In *Cells* (Vol. 8, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8010026>
- Stott, S. R. W., Wyse, R. K., & Brundin, P. (2020). Novel approaches to counter protein aggregation pathology in Parkinson's disease. In *Progress in Brain Research* (Vol. 252, pp. 451–492). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.10.007>
- Su, R. J., Zhen, J. L., Wang, W., Zhang, J. L., Zheng, Y., & Wang, X. M. (2018). Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular Medicine Reports*, 17(2), 3356–3363. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8277>
- Subramaniam, S. R., & Chesselet, M. F. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. In *Progress in Neurobiology* (Vols. 106–107, pp. 17–32). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.004>
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. In *Neuron* (Vol. 80, Issue 3, pp. 675–690). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Suga, K., Hattori, H., Saito, A., & Akagawa, K. (2005). RNA interference-mediated silencing of the syntaxin 5 gene induces Golgi fragmentation but capable of transporting vesicles. *FEBS Letters*, 579(20), 4226–4234. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.053>

- Suga, K., Saito, A., Mishima, T., & Akagawa, K. (2015). ER and Golgi stresses increase ER-Golgi SNARE Syntaxin5: Implications for organelle stress and β APP processing. *Neuroscience Letters*, 604, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.07.017>
- Suga, K., Yamamoto-Hijikata, S., Terao, Y., Akagawa, K., & Ushimaru, M. (2022). Golgi stress induces upregulation of the ER-Golgi SNARE Syntaxin-5, altered β APP processing, and Caspase-3-dependent apoptosis in NG108-15 cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103754>
- Sugawara, T., Kano, F., & Murata, M. (2014). Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro)insulin in insulin-secreting cells. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep06952>
- Sun, M. F., & Shen, Y. Q. (2018). Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 45, pp. 53–61). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.04.004>
- Surmeier, D. J. (2018). Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. In *FEBS Journal* (Vol. 285, Issue 19, pp. 3657–3668). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14607>
- Suzuki, Y., Jin, C., Iwase, T., & Yazawa, I. (2014). β -III tubulin fragments inhibit α -synuclein accumulation in models of multiple system atrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24374–24382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557215>
- Svensson, E., Horváth-Puhó, E., Thomsen, R. W., Djurhuus, J. C., Pedersen, L., Borghammer, P., & Sørensen, H. T. (2015). Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 78(4), 522–529. <https://doi.org/10.1002/ana.24448>
- Swanton, E., & Bulleid, N. J. (2003). Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. In *Molecular Membrane Biology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 99–104). <https://doi.org/10.1080/0968768031000069241>
- Szinyákovics, J., Keresztes, F., Kiss, E. A., Falcsik, G., Vellai, T., & Kovács, T. (2023). Potent New Targets for Autophagy Enhancement to Delay Neuronal Ageing. *Cells*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/cells12131753>
- Taguchi, T., Ikuno, M., Yamakado, H., & Takahashi, R. (2020). Animal model for prodromal Parkinson's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21061961>
- Tedjakumala, S. R., Rouquette, J., Boizeau, M. L., Mesce, K. A., Hotier, L., Massou, I., & Giurfa, M. (2017). A tyrosine-hydroxylase characterization of dopaminergic neurons in the honey bee brain. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00047>

- Thayanidhi, N., Helm, J. R., Nycz, D. C., Bentley, M., Liang, Y., & Hay, J. C. (2010). Synuclein Delays Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi Transport in Mammalian Cells by Antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 1850–1863. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Thomasi, B. B. de M., Valdetaro, L., Ricciardi, M. C. G., Hayashide, L., Fernandes, A. C. M. N., Mussauer, A., da Silva, M. L., da Cunha Faria-Melibeu, A., Ribeiro, M. G. L., de Mattos Coelho-Aguiar, J., Campello-Costa, P., Moura-Neto, V., & Tavares-Gomes, A. L. (2022). Enteric glial cell reactivity in colonic layers and mucosal modulation in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Brain Research Bulletin*, 187, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.06.013>
- Tofaris, G. K. (2022). Initiation and progression of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 79, Issue 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04240-2>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 20, Issue 5, pp. 385–397). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Tomás, M., Martínez-Alonso, E., Martínez-Martínez, N., Cara-Esteban, M., & Martínez-Menárguez, J. A. (2021). Fragmentation of the Golgi complex of dopaminergic neurons in human substantia nigra: New cytopathological findings in Parkinson's disease. *Histology and Histopathology*, 36(1), 47–60. <https://doi.org/10.14670/HH-18-270>
- Tong, G., Zhang, P., Hu, W., Zhang, K., & Chen, X. (2022). Diagnostic Test to Identify Parkinson's Disease from the Blood Sera of Chinese Population: A Cross-Sectional Study. *Parkinson's Disease*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8683877>
- Travagli, R. A., Browning, K. N., & Camilleri, M. (2020). Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 17, Issue 11, pp. 673–685). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0339-z>
- Uchiyama, K., Muramatsu, N., Yano, M., Usui, T., Miyata, H., & Sakaguchi, S. (2013). Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2873>
- Uesaka, T., Young, H. M., Pachnis, V., & Enomoto, H. (2016). Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut. In *Developmental Biology* (Vol. 417, Issue 2, pp. 158–167). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.016>

- Ugrumov, M. (2020). Development of early diagnosis of Parkinson's disease: Illusion or reality? In *CNS Neuroscience and Therapeutics* (Vol. 26, Issue 10, pp. 997–1009). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cns.13429>
- Ulusoy, A., Phillips, R. J., Helwig, M., Klinkenberg, M., Powley, T. L., & Di Monte, D. A. (2017). Brain-to-stomach transfer of α -synuclein via vagal preganglionic projections. *Acta Neuropathologica*, 133(3), 381–393. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1661-y>
- Underwood, R., Wang, B., Carico, C., Whitaker, R. H., Placzek, W. J., & Yacoubian, T. A. (2020). The GTPase Rab27b regulates the release, autophagic clearance, and toxicity of alpha-synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 295(23), 8005–8016. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA120.013337>
- Underwood, R., Wang, B., Pathak, A., Volpicelli-Daley, L., & Yacoubian, T. A. (2020). Rab27 GTPases regulate alpha-synuclein uptake, cell-to-cell transmission, and toxicity. *BioRxiv*, 2020.11.17.387449. <https://doi.org/10.1101/2020.11.17.387449>
- Ungermann, C., & Kümmel, D. (2019). *Structure of membrane tethers and their role in fusion*. <https://doi.org/10.1111/tra.12655/Abstract>
- Ungerstedt, U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European journal of pharmacology*, 5, 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
- Van Bommel, D. M., Toonen, R. F., & Verhage, M. (2023). Mapping localization of 21 endogenous proteins in the Golgi apparatus of rodent neurons. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29998-8>
- Van Den Berge, N., & Ulusoy, A. (2022). Animal models of brain-first and body-first Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105599>
- Vargas, J. Y., Grudina, C., & Zurzolo, C. (2019). The prion-like spreading of α -synuclein: From in vitro to in vivo models of Parkinson's disease. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 50, pp. 89–101). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.01.012>
- Vascellari, S., Orrù, C. D., Groveman, B. R., Parveen, S., Fenu, G., Pisano, G., Piga, G., Serra, G., Oppo, V., Murgia, D., Perra, A., Angius, F., Hughson, A. G., Haigh, C. L., Manzin, A., Cossu, G., & Caughey, B. (2023). α -Synuclein seeding activity in duodenum biopsies from Parkinson's disease patients. *PLoS Pathogens*, 19(6 June). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011456>
- Vasquez-Limeta, A., & Loncarek, J. (2021). Human centrosome organization and function in interphase and mitosis. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 117, pp. 30–41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.03.020>
- Vellingiri, B., Suriyanarayanan, A., Abraham, K. S., Venkatesan, D., Iyer, M., Raj, N., & Gopalakrishnan, A. V. (2022). Influence of heavy metals in Parkinson's disease:

- an overview. In *Journal of Neurology* (Vol. 269, Issue 11, pp. 5798–5811). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11282-w>
- Vercammen, L., Van der Perren, A., Vaudano, E., Gijssbers, R., Debyser, Z., Van den Haute, C., & Baekelandt, V. (2006). Parkin Protects against Neurotoxicity in the 6-Hydroxydopamine Rat Model for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy*, 14(5), 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.06.009>
- Vidović, M., & Rikalovic, M. G. (2022). Alpha-Synuclein Aggregation Pathway in Parkinson's Disease: Current Status and Novel Therapeutic Approaches. In *Cells* (Vol. 11, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11111732>
- Vieira, O. V. (2018). Rab3a and Rab10 are regulators of lysosome exocytosis and plasma membrane repair. In *Small GTPases* (Vol. 9, Issue 4, pp. 349–351). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1235004>
- Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T., & Outeiro, T. F. (2016). Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 139, pp. 240–255). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.13249>
- Villarroel-Campos, D., Bronfman, F. C., & Gonzalez-Billault, C. (2016). Rab GTPase signaling in neurite outgrowth and axon specification. In *Cytoskeleton* (Vol. 73, Issue 9, pp. 498–507). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cm.21303>
- Viotti, C. (2016). ER to golgi-dependent protein secretion: The conventional pathway. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1459, pp. 3–29). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_1
- Vizzard, M. A., Brisson, M., & de Groat, W. C. (2000). Transneuronal labeling of neurons in the adult rat central nervous system following inoculation of pseudorabies virus into the colon. *Cell and Tissue Research*, 299(1), 9–26. <https://doi.org/10.1007/s004419900128>
- Wachter, B., Schürger, S., Rolinger, J., Von Ameln-Mayerhofer, A., Berg, D., Wagner, H. J., & Kueppers, E. (2010). Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: Evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell and Tissue Research*, 342(2), 147–160. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1061-x>
- Wagle Shukla, A., & Okun, M. S. (2014). Surgical Treatment of Parkinson's Disease: Patients, Targets, Devices, and Approaches. In *Neurotherapeutics* (Vol. 11, Issue 1, pp. 47–59). <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0235-0>
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., & Ikuta, F. (1988). Neuropathologic Regular papers Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. In *Acta Neuropathol* (Vol. 76).

- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., & Ikuta, F. (1989). Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease. *Archives of Histology and Cytology*, 52(Suppl), 191-194. https://doi.org/10.1679/aohc.52.Suppl_191
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology*, 27(5), 494-506. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x>
- Walsh, S., Finn, D. P., & Dowd, E. (2011). Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*, 175, 251-261. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.005>
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. In *Nature* (Vol. 529, Issue 7586, pp. 326-335). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature17041>
- Wang, Q. Q., Caraballo, S. G., Rychkov, G., McGovern, A. E., Mazzone, S. B., Brierley, S. M., & Harrington, A. M. (2024). Comparative localization of colorectal sensory afferent central projections in the mouse spinal cord dorsal horn and caudal medulla dorsal vagal complex. *Journal of Comparative Neurology*, 532(2). <https://doi.org/10.1002/cne.25546>
- Wang, S., Chu, C. H., Guo, M., Jiang, L., Nie, H., Zhang, W., Wilson, B., Yang, L., Stewart, T., Hong, J. S., & Zhang, J. (2016). Identification of a specific α -synuclein peptide (α -Syn 29-40) capable of eliciting microglial superoxide production to damage dopaminergic neurons. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0606-7>
- Wang, T., & Hay, J. C. (2015). Alpha-synuclein toxicity in the early secretory pathway: How it drives neurodegeneration in parkinsons disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue NOV). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00433>
- Wang, T., Li, L., & Hong, W. (2017). SNARE proteins in membrane trafficking. In *Traffic* (Vol. 18, Issue 12, pp. 767-775). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/tra.12524>
- Wattchow, D. A., Smolilo, D., Hibberd, T., Spencer, N. J., Brookes, S. J. H., De Giorgio, R., Heitmann, P. T., Costa, M., & Dinning, P. G. (2022). The human enteric nervous system. Historical and modern advances. Collaboration between science and surgery. In *ANZ Journal of Surgery* (Vol. 92, Issue 6, pp. 1365-1370). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/ans.17688>
- Wei, J. H., & Seemann, J. (2017). Golgi ribbon disassembly during mitosis, differentiation and disease progression. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 47, pp. 43-51). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.03.008>

- Wei, Y., Awan, M. un N., Bai, L., & Bai, J. (2023). The function of Golgi apparatus in LRRK2-associated Parkinson's disease. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 16). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1097633>
- William Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, *219*(4587), 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- Williams, C. L., & Smith, S. M. (2018). Calcium dependence of spontaneous neurotransmitter release. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 96, Issue 3, pp. 335–347). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jnr.24116>
- Wilson, C., Venditti, R., Rega, L. R., Colanzi, A., D'Angelo, G., & De Matteis, M. A. (2011). The Golgi apparatus: An organelle with multiple complex functions. In *Biochemical Journal* (Vol. 433, Issue 1, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1042/BJ20101058>
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Lohar, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., & Riek, R. (2011). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(10), 4194–4199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100976108>
- Winner, B., Rockenstein, E., Lie, D. C., Aigner, R., Mante, M., Bogdahn, U., Couillard-Despres, S., Masliah, E., & Winkler, J. (2008). Mutant α -synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis. *Neurobiology of Aging*, *29*(6), 913–925. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.016>
- Witkos, T. M., & Lowe, M. (2016). The golgin family of coiled-coil tethering proteins. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 3, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00086>
- Wong, Y. C., & Krainc, D. (2017). α -synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies. In *Nature Medicine* (Vol. 23, Issue 2, pp. 1–13). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nm.4269>
- Xia, X., Wang, Y., Qin, Y., Zhao, S., & Zheng, J. C. (2022). Exosome: A novel neurotransmission modulator or non-canonical neurotransmitter? In *Ageing Research Reviews* (Vol. 74). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101558>
- Xie, B., Guillem, C., Date, S. S., Cohen, C. I., Jung, C., Kendall, A. K., Best, J. T., Graham, T. R., & Jackson, L. P. (2023). An interaction between β 9-COP and the ArfGAP, Glo3, maintains post-Golgi cargo recycling. *Journal of Cell Biology*, *222*(4). <https://doi.org/10.1083/jcb.202008061>
- Xing, T., Nanni, G., Burkholder, C. R., Browning, K. N., & Travagli, R. A. (2023). The substantia nigra modulates proximal colon tone and motility in a vagally-dependent

- manner in the rat Key points. *The Journal of Physiology J Physiol*, 601, 4751–4766. <https://doi.org/10.1113/JP284238#support-information-section>
- Yakabi, K., Berson, E., Montine, K. S., Bendall, S. C., MacCoss, M. J., Poston, K. L., & Montine, T. J. (2023). Human cerebrospinal fluid single exosomes in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *BioRxiv*, 2023.12.22.573124. <https://doi.org/10.1101/2023.12.22.573124>
- Yang, X. Z., Li, X. X., Zhang, Y. J., Rodriguez-Rodriguez, L., Xiang, M. Q., Wang, H. Y., & Zheng, X. F. S. (2016). Rab1 in cell signaling, cancer and other diseases. In *Oncogene* (Vol. 35, Issue 44, pp. 5699–5704). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.81>
- Yang, Y., Yang, J., Liang, Y., Zhang, G., Cai, Z., Zhang, Y., Lin, H., & Tan, M. (2023). Rab3A interacts with spastin to regulate neurite outgrowth in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 643, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.12.066>
- Yang, Y., & Zhang, Z. (2024). α -Synuclein pathology from the body to the brain: so many seeds so close to the central soil. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 19, Issue 7, pp. 1463–1472). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.387967>
- Yeh, S. hui, Lin, C. H., Yang, Y. J., Lin, L. W., Tseng, C. W., & Yang, K. D. (2021). Higher senescence associated secretory phenotype and lower defense mediator in urinary extracellular vesicles of elders with and without Parkinson disease. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95062-y>
- Yperman, K., & Kuijpers, M. (2023). Neuronal endoplasmic reticulum architecture and roles in axonal physiology. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2023.103822>
- Yu, H., Sun, T., An, J., Wen, L., Liu, F., Bu, Z., Cui, Y., & Feng, J. (2020). Potential Roles of Exosomes in Parkinson's Disease: From Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment to Prognosis. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00086>
- Yuan, X., Tian, Y., Liu, C., & Zhang, Z. (2021). Environmental factors in Parkinson's disease: New insights into the molecular mechanisms. In *Toxicology Letters* (Vol. 356, pp. 1–10). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.12.003>
- Zeng, B.-Y., Dass, B., Owen, A., Rose, S., Cannizzaro, C., Tel, B. C., & Jenner, P. (2002). *6-Hydroxydopamine lesioning differentially affects a-synuclein mRNA expression in the nucleus accumbens, striatum and substantia nigra of adult rats*. www.elsevier.com/locate/neulet
- Zeng, X. S., Geng, W. S., & Jia, J. J. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. In *ASN Neuro* (Vol. 10). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1759091418777438>

- Zhang, P. L., Chen, Y., Zhang, C. H., Wang, Y. X., & Fernandez-Funez, P. (2018). Genetics of Parkinson's disease and related disorders. In *Journal of Medical Genetics* (Vol. 55, Issue 2, pp. 73–80). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105047>
- Zhang, X., & Wang, Y. (2020). Nonredundant Roles of GRASP55 and GRASP65 in the Golgi Apparatus and Beyond. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 45, Issue 12, pp. 1065–1079). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.08.001>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. In *Cell and Bioscience* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhang, Y., & Seemann, J. (2021). Rapid degradation of GRASP55 and GRASP65 reveals their immediate impact on the golgi structure. *Journal of Cell Biology*, 220(1). <https://doi.org/10.1083/jcb.202007052>
- Zhang, Y., Srivastava, V., & Zhang, B. (2023). Mammalian cargo receptors for endoplasmic reticulum-to-Golgi transport: mechanisms and interactions. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 51, Issue 3, pp. 971–981). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20220713>
- Zhang, Z., Nie, S., & Chen, L. (2018). Targeting prion-like protein spreading in neurodegenerative diseases. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 13, Issue 11, pp. 1875–1878). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.239433>
- Zhao, X., Yang, H., Liu, W., Duan, X., Shang, W., Xia, D., & Tong, C. (2015). Sec22 regulates endoplasmic reticulum morphology but not autophagy and is required for eye development in Drosophila. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7943–7951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640920>
- Zheng, H., Shi, C., Luo, H., Fan, L., Yang, Z., Hu, X., Zhang, Z., Zhang, S., Hu, Z., Fan, Y., Yang, J., Mao, C., & Xu, Y. (2021). α -Synuclein in Parkinson's Disease: Does a Prion-Like Mechanism of Propagation from Periphery to the Brain Play a Role? In *Neuroscientist* (Vol. 27, Issue 4, pp. 367–387). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858420943180>
- Zhu, Y., Wang, B., Tao, K., Yang, H., Wang, Y., Zhou, T., Yang, Y., Yuan, L., Liu, X., & Duan, Y. (2017). Iron accumulation and microglia activation contribute to substantia nigra hyperechogenicity in the 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 36, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.01.003>

IX

ANEXOS

VIII. Anexos.

Anexo I. Listado de anticuerpos utilizados para el estudio morfológico, bioquímico y ultraestructural de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el SNE.

<i>Anticuerpo (Origen, tipo y diana)</i>	<i>Dilución</i>	<i>Origen</i>	<i>Referencia</i>
Ratón Monoclonal Anti-TH	IF 1:100	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	T12991
Conejo Policlonal Anti-TH	IF 1:200	Novus Biologicals (Minneapolis, MN, USA)	NB300-109
Conejo Policlonal Anti-NOS	IF 1:50	Chemicon International (Temecula, CA)	AB5380
Cabra Policlonal Anti-ChAT	IF 1:50	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	AB144P
Conejo Policlonal Anti-GFAP	IF 1:100	Dako (Glostrup, Denmark)	Z0334
Ratón Monoclonal Anti-GM130	IF 1:100	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgium)	610822
Ratón Monoclonal Anti-syntaxin-5	IF 1:200 WB 1:500	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	50664
Conejo Policlonal Anti-RAB1	IF 1:100 WB 1:500	Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA)	SC-311
<i>Ratón Monoclonal Anti-α-syn</i>	IF 1:100 WB 1:500	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgium)	610786
<i>Conejo Policlonal Anti-α-syn</i>	IF 1:200	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	S3062
<i>Conejo Policlonal Anti-β-tubulin III</i>	WB 1:1000	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	T2200
Ratón Monoclonal Anti-GRASP65	IF 1:100 WB 1:500	Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA)	SC-374423
Conejo Policlonal Anti-RAB3A	IF 1:50 WB 1:500	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	PA1-770
Ratón Monoclonal Anti-CD63	IF 1:50	Abcam (Cambridge, UK)	AB193349
Cabra Anti-ratón Alexa-488	IF 1:400	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	A-11029
Cabra Anti-conejo Alexa-568	IF 1:400	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	A-11011
Conejo Anti-ratón Alexa-568	IF 1:400	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	A-11061
Burro Anti-cabra Alexa-488	IF 1:400	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	A-11045
<i>Cabra Anti-ratón HRP Conjugated</i>	WB 1:5000	Calbiochem (San Diego, CA, USA)	401215
<i>Cabra Anti-conejo HRP Conjugated</i>	WB 1:5000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	7074
Anti-ratón	CI 1:200	Dako (Glostrup, Denmark)	Z0412

* IF: Inmunofluorescencia, WB: Western-blotting, CI: Crioinmunocitoquímica

Anexo II. Principales reactivos utilizados para el desarrollo de técnicas para el estudio morfológico, bioquímico y ultraestructural.

Reactivo	Origen	Referencia
6-OHDA	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	H116
Acetato de Uranilo	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)	22400
<i>Agentes de detección de Western-blot Amersham ECL</i>	GE Healthcare Life Sciences (Chicago, IL, USA)	RPN2106
Azul Coomassie	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	20278
BSA	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	A4503
BSA-Acetilada	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	B2518
Cacodilato Sódico	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	C0250
Cóctel de inhibidores de proteasas SigmaFast™	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	S8820
Cryobloc	Diapath (Martinengo, Italia)	070130
DAPI	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	D1306
Entellan®	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	107961
Etanol	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	1009831000
Filtro 0.22 µm	Pall Medical (Port Washington, NY, USA)	HP1002
Formvar	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	09823
GA	Polysciences (Eppelheim, Alemania)	1909
Gelatina	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	4078
Glicina	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	1042011000
Medio de montaje para fluorescencia	Dako (Glostrup, Denmark)	S3023
Membrana PVDF	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, CA, USA)	4561083
Metanol	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	1060071000
Metilcelulosa	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	M0512
Mowiol	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	475904
Laemmli 4X	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)	1610747
Papel Whatman®	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	WHA1001325

Parafilm®	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	P7793
PBS	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	D5652
Pentobarbital sódico	Vortech Pharmaceuticals (Dearborn, MI, USA)	9373
PFA	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)	15710
Poly-D-Lisina	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	P7405
Portaobjetos Superfrost Plus™	Thermofisher (Waltham, MA, USA)	10149870
Geles Protean® TGX	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, CA, USA)	4561083
Proteína A-Oro	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	741957
Rotulador Hidrófobo	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	Z377821
Sacarosa	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	1076511000
SDS	MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA)	102918
Seeblue™ Plus 2	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	LC5925
Tetróxido de Osmio	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	201030
Kit Detección Proteica Micro Lowry Peterson-Modification	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	TP0300
Tris-HCl	Merk KGaA (Darmstadt, Alemania)	1083821000
Triton™ X 100	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	T9284
Tween® 20	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)	P9416

Anexo III. QR de los videos de la reconstrucción 3D del CG de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y del SNE.

Videos 1 y 2. Reconstrucción 3D de la citoarquitectura del CG, mediante el software Imaris. Se observa el CG inmunomarcado con GM130 (verde), en las neuronas del hemisferio control (video 1) y en las neuronas dopaminérgicas en el hemisferio lesionado con 6-OHDA (EP) (video 2). Los núcleos están marcados con DAPI (azul).



Video 1. Video representativo del CG en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio control



Video 2. Video representativo del CG en neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio EP

Videos 3 y 4. Reconstrucción 3D de la citoarquitectura del CG, realizada mediante el software Imaris. Se observa el CG inmunomarcado con GM130 (verde) de las neuronas dopaminérgicas del plexo mientérico de las muestras control (video 3) y muestras del modelo inducido por 6-OHDA (EP) (video 4) de colon proximal. Los núcleos están marcados con DAPI (azul).



Video 3. Video representativo del CG en neuronas dopaminérgicas de muestras de colon proximal control.



Video 4. Video representativo del CG en neuronas dopaminérgicas de muestras de colon proximal del modelo EP.

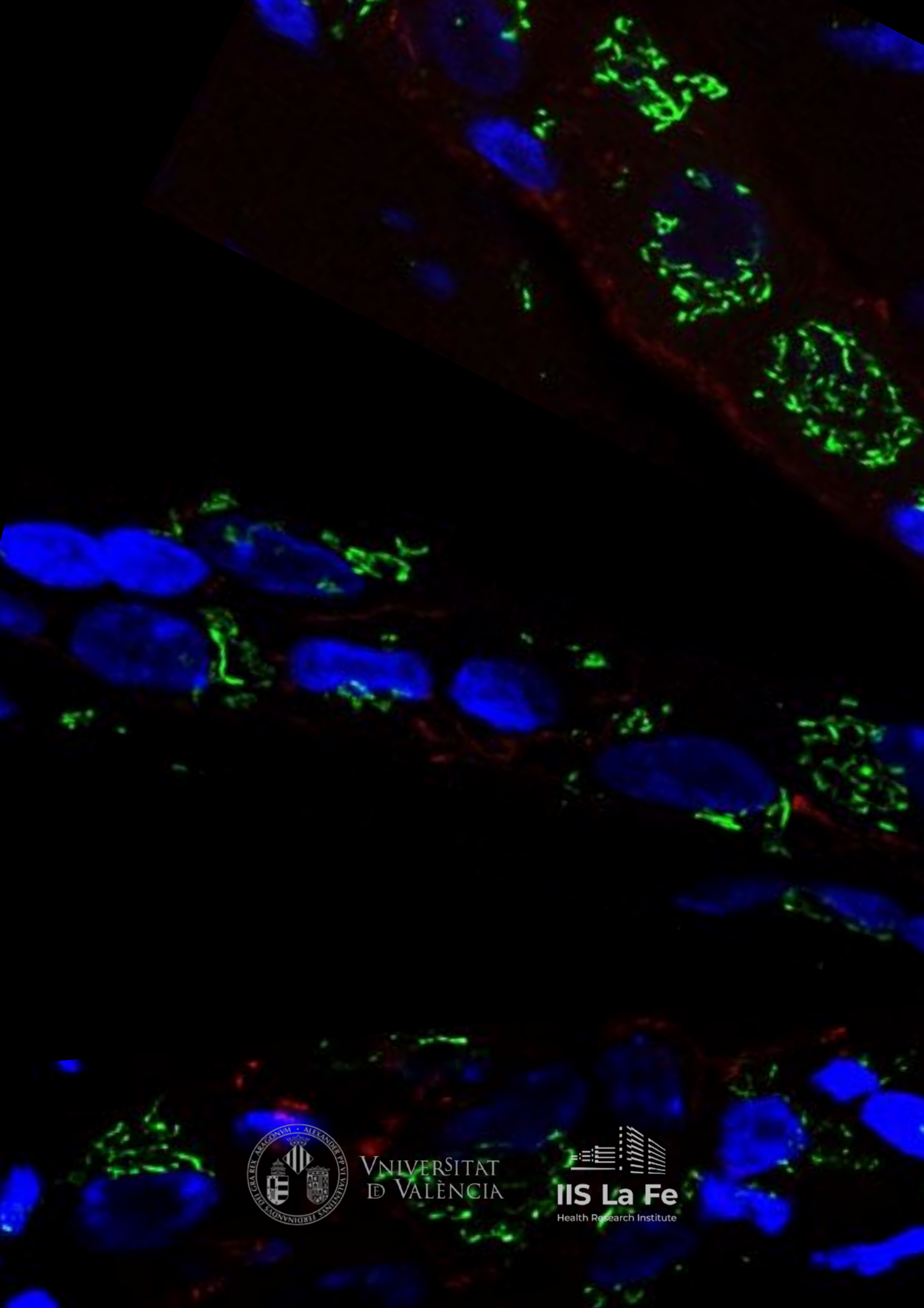
Videos 5 y 6. Reconstrucción 3D de la citoarquitectura del CG, mediante el software Imaris. Se observa el CG inmunomarcado con GM130 (verde), de las neuronas dopaminérgicas del plexo mientérico de muestras control (video 5) y muestras del modelo inducido por 6-OHDA (EP) (video 6) de colon distal. Los núcleos están marcados con DAPI (azul).



Video 5. Video representativo del CG en neuronas dopaminérgicas de muestras de colon distal control.



Video 6. Video representativo del CG en neuronas dopaminérgicas de muestras de colon distal EP.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



IIS La Fe
Health Research Institute