



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EFFECTOS DE LA DEAFERENTACIÓN VISUAL SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS  
PROCESOS ASTROCÍTICOS DEL CUERPO GENICULADO LATERAL**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**Med. Cir. JOSÉ RUBÉN TOVAR CUEVA**

Tutor principal:  
**Dr. Jorge A. Larriva Sahd**  
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología,  
Instituto de Neurobiología, UNAM

Comité Tutor:  
**Dr. José Fernando Peña Ortega**  
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología,  
Instituto de Neurobiología, UNAM

**Dr. Manuel Salas Alvarado**  
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología,  
Instituto de Neurobiología, UNAM

Juriquilla, Querétaro, México. Enero 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Resumen

Los astrocitos son células que forman parte del sistema nervioso central (SNC) y a las que de manera reciente se les ha atribuido una variedad de funciones dependientes de su interacción con el medio circundante y células cercanas. La diferenciación de los procesos astrocíticos (PA) en procesos paraxiales (PAP), maquinaria periaxonal de secreción lisosomal, denota su participación en el fenómeno de remodelación de mielina por lo que se propuso un sistema de lesión para favorecer la emergencia de estos elementos.

En este trabajo se utilizó un modelo de lesión retiniana por isquemia-reperfusión en ratas y se permitió la evolución del proceso patológico por 7 días. Posteriormente los animales fueron perfundidos y procesados para microscopía electrónica (ME).

De grupos de sujetos controles y animales lesionados, se realizaron disecciones del núcleo geniculado dorsolateral (NGDL) del tálamo, se evaluó la magnitud de la lesión y se realizaron reconstrucciones tridimensionales de los PAP's a partir de cortes seriados de ME con la finalidad de cuantificar volúmenes lisosomales.

Al realizar la comparación de ambos grupos se encontró un mayor volumen lisosomal en el animal lesionado reflejado en una diferencia estadísticamente significativa.

Estos resultados demuestran que el modelo de lesión propuesto es capaz de favorecer la aparición de los PAP, lo cual refuerza la idea de que esta estructura participa en el proceso de remodelación de mielina. Esta descripción podría ser una de las piezas faltantes para explicar los mecanismos por los que se produce la renovación de la cubierta miélica luego de un daño.

## Abstract

Astrocytes are cells that are part of the central nervous system and have been recently attributed a variety of functions dependant of their interaction with the media and nearby cells. The differentiation of astrocytic processes (PAs) into paraxial processes (PAP), the periaxonal lysosomal secretion machinery, suggests their participation in the myelin remodeling phenomenon which prompted studies using a nerve injury model to promote the emergence of this elements.

An ischemia-reperfusion retinal injury model was used in rats and the pathological process was allowed to evolve for 7 days, following the animals were perfused and processed for electron microscopy (ME).

From the control and lesioned groups, dissections of the dorsolateral geniculate nucleus (NGDL) of the thalamus were performed, the magnitude of the injury was measured and PAP's three-dimensional reconstructions were built from ME serial sections with the purpose of quantify the lysosomal volumes.

A larger lysosomal volume was identified in the lesioned animal reflected in an statistically significant difference.

The results show that the injury model employed in this study, is effective in stimulating the appearance of the PAPs. This finding reinforces the idea that these structures is involved in the myelin remodelation process. This description might be one of the missing pieces needed to explain the mechanisms that produce the renewal of the myelinic cover of axons.

## Agradecimientos

Agradezco al Dr. Jorge Larriva Sahd por su disposición, continua instrucción y ejemplo para el trabajo y la reflexión indispensables todos los días.

Al Comité de tutoría, al Dr. Manuel Salas Alvarado y al Dr. José Fernando Peña Ortega, por su paciencia y puntuales comentarios que estimularon el desarrollo de este proyecto.

Al comité de examen de grado, por su tiempo y atinados comentarios.

A la M. en C. Gema Martínez Cabrera por su amistad, apoyo e instrucción técnica para el trabajo en el laboratorio.

A la M. en C. María de Lourdes Palma Tirado por su instrucción técnica y consejo para la operación del microscopio electrónico.

A la Dra. Alejandra Castilla León por su consejo, disposición e instrucción técnica para el manejo responsable de los animales de experimentación.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por su invaluable apoyo para la realización de los trámites administrativos durante el posgrado y por su paciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico indispensable durante el desarrollo de este proyecto (Becario: 612741).

A la UNAM y al Instituto de Neurobiología por tener las puertas abiertas para todos aquellos dispuestos a aprender.

## Dedicatorias

Esta publicación resultado de muchas horas de trabajo está dedicada a mi familia; a mi madre por ser siempre mi apoyo y estar al pendiente, por tenerme paciencia en mis momentos difíciles. A mi padre por ser mi gran ejemplo y dar rienda suelta a mi curiosidad. A mi hermana por ser amiga y cómplice, por ponerme los pies en la tierra.

A Gabriela por ser luz y refugio, por sus consejos, su infinito cariño y paciencia que tanto ayudaron. Gracias por tu compañía, los viajes y los vinos.

Al petit comité, Mayra, Fer y Sol, por su amistad a lo largo de estos dos años. Por las discusiones académicas, ataques de pánico simultáneos y muchas risas, gracias.

## Contenido

1. Introducción.....	1
1.1. Oligodendrocito y mielina.....	1
1.2.1. Astrocitos.....	3
1.2.2. Astrocitos como células secretoras.....	5
2. Antecedentes.....	8
2.1 Modelos de lesión para estudiar conectividad cerebral y mecanismos de respuesta .....	8
2.2. Remodelación de mielina.....	11
2.3. Organización sináptica del núcleo geniculado dorsolateral.....	15
3. Justificación.....	19
4. Pregunta de investigación.....	19
5. Hipótesis.....	19
6. Objetivos.....	19
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos específicos.....	19
7. Material y Método.....	20
7.1 Modelo de lesión y perfusión.....	20
7.2 Preparación del tejido para microscopía electrónica.....	22

7.3 Reconstrucción tridimensional.....	23
7.4 Semi-cuantificación de perfiles sinápticos.....	24
8. Resultados.....	24
8.1 Sinaptología del núcleo geniculado dorsolateral.....	24
8.2 Semi-cuantificación sináptica del núcleo geniculado dorsolateral comparada con el modelo de lesión.....	25
8.3 Reconstrucción tridimensional del volumen lisosomal en Procesos paraxiales y volumetría.....	29
9. Discusión.....	32
9.1 Efecto de la deaferentación visual sobre la organización sináptica del NGDL.....	32
9.2 Efecto de la deaferentación visual sobre el volumen lisosomal en PAP.....	32
10. Bibliografía.....	33



## 1. Introducción

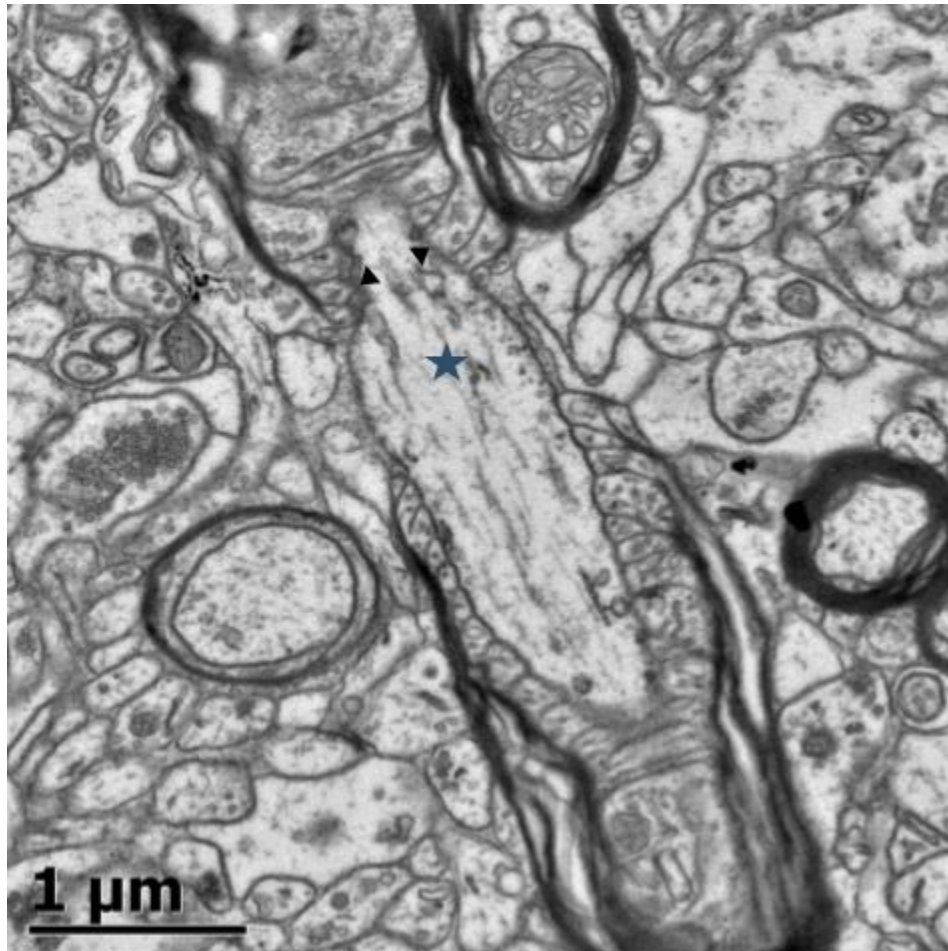
Si bien el fenómeno de plasticidad es una característica intrínseca del sistema nervioso central (SNC) los cambios estructurales concomitantes con este proceso tienen lugar en regiones y territorios más o menos acotados del mismo; desde esta perspectiva, se acepta que el SNC corresponde a un agregado estructuralmente parcelado y correlativo a su capacidad adaptativa.

La teoría neuronal que concibe a la célula como unidad anatómica y funcional del SNC, contribuyó sustancialmente al concepto de conectividad como elemento organizacional de la neurona o célula nerviosa y, por ende del propio sistema. Con el establecimiento ulterior de la diversidad en la estructura, distribución, e interacciones de las neuronas, fue posible definir un segundo grupo de células que quedaba fuera del esquema conectivo asumido por las neuronas pero que tenía estructura y funciones específicas; este grupo de células se denominó, en su conjunto, como glía. Inicialmente ésta incluía a los astrocitos, descubiertos por R. Virchow en 1856, y los oligodendrocitos y células de Schwann, descritas por éste en 1854; más tarde en 1924, Del Río Ortega define “el tercer tipo celular” o microglia (Kettenmann & Verkhratsky, 2008; Tremblay, Lecours, Samson, Sánchez-Zafra, & Sierra, 2015).

### 1.1 Oligodendrocito y mielina

La actividad del Sistema nervioso central se manifiesta a partir de la aparición ordenada de corrientes electroquímicas, potencial de acción, que culmina con la liberación de neurotransmisores en la terminal sináptica. Independientemente de las características de la información que se transmita, la transmisión nerviosa, requiere la rápida propagación de los impulsos. En un proceso que optimiza este fenómeno, el sistema nervioso evolucionó con la aparición de una cubierta aislante para los axones, llamada mielina que es sintetizada y distribuida en torno al axón por el oligodendrocito (Ver Figura 1). Descrita así por Remak y nombrada por Virchow a mediados del siglo XIX (Zalc, 2016), la mielina es un compuesto lipoproteínico (Jahn, Tenzer, & Werner, 2009) que recubre los axones formando una cubierta de múltiples capas, resultante de la alternancia de una capa de mielina con la membrana del oligodendrocito. En el eje longitudinal del axón, la mielina se distribuye en segmentos cubiertos o internodales

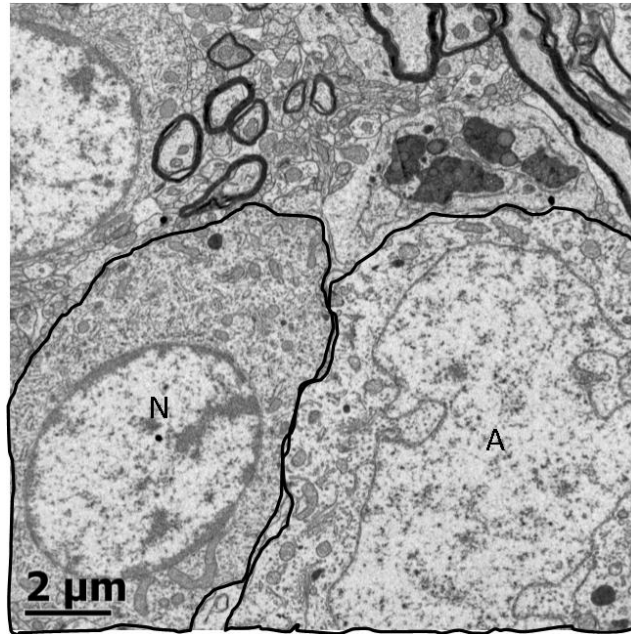
alternado con sitios desprovistos de la misma, denominados nodos de Ranvier. En la actualidad se acepta que la alternancia de la mielina intermodal con sitios carentes de mielina permite la propagación saltatoria del impulso nervioso a lo largo del axón (Nave & Werner, 2014). La persistencia de estos patrones en la cubierta miélnica es indispensable para el intercambio adecuado de información neural; además de su función como material aislante, la cubierta miélnica aporta resistencia estructural y nutrición a partir del lactato sintetizado por el oligodendrocito (Nave & Werner, 2014; Zalc, 2016)



**Figura 1.** Axón mielinizado. Fotomicrografía en la que se muestra, en el centro de la imagen, un corte tangencial de un axón mielinizado; en sus extremos se observa el inicio de dos segmentos internodales con sus prolongaciones paranodales (cabeza de flecha) flanqueando al axón y, al centro del axón, se muestra el nodo de Ranvier (estrella), región desprovista de mielina donde ocurre el impulso saltatorio. Alrededor del axón, se observan otros axones mielinizados cortados transversalmente.

### 1.2.1 Astrocitos.

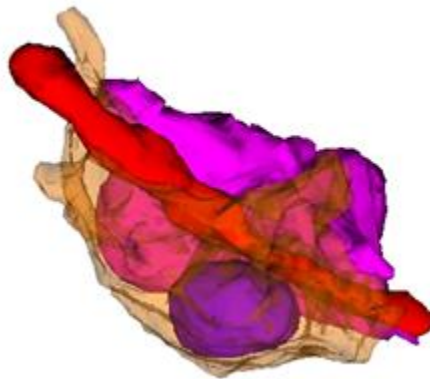
Desde su primera descripción por Rudolf Virchow en 1858, el concepto de glía ha evolucionado de manera muy importante; siendo los astrocitos - nombrados así por Von Lenhossek en 1893-, uno de tipos celulares más estudiados en la actualidad. Esto ha modificado de manera importante el conocimiento que tenemos sobre el astrocito (Kettenmann & Verkhratsky, 2008). Por su estructura y distribución, los astrocitos fueron clasificados por Kolliker y Andriezen en protoplásmicos y fibrosos; los primeros se encuentran distribuidos en la sustancia gris, en relación con el soma neuronal y exhiben prolongaciones cortas, mientras que los fibrosos se distribuyen en la sustancia blanca, entre los fascículos axonales que la estructuran. Los procesos o prolongaciones citoplasmáticas de ambos subtipos se distribuyen en un área elíptica del neuropilo o sustancia blanca, según sea su tipo (Butt & Ransom, 1993; Sofroniew & Vinters, 2010). Desde el punto de vista citológico los astrocitos se caracterizan por tener un núcleo grande, elíptico, circunscrito por un anillo más denso de cromatina asociado con la cubierta nuclear; su citoplasma es electrón-lucido conteniendo dos o tres aparatos de Golgi, escasos cúmulos de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres y mitocondrias ovoides o elípticas (Ver Figura 2); el citoplasma suele estar cursado por dos o tres acúmulos de filamentos intermedios. Los dos o tres procesos del astrocito suelen contener los mismos organelos, aunque en este caso suelen ser más escasos. Rasgos comunes al cuerpo y procesos astrocíticos (PAs) lo son sus prominentes fascículos de filamentos intermedios y colecciones de glucógeno que, aunque de distribución relativamente azarosa, permiten la identificación de este tipo celular (Vaughan & Peters, 1974).



**Figura 2.** Ultraestructura del neuropilo. Fotomicrografía de bajo aumento donde se señalan en la parte inferior el núcleo y citoplasma perinuclear de 2 células, del lado izquierdo una neurona (N) con un núcleo uniforme, citoplasma de densidad intermedia, abundante retículo endoplásmico y ribosomas. Del lado derecho un astrocito (A), con un núcleo prominente, citoplasma más claro y menor densidad de retículo endoplásmico y ribosomas.

Recientemente se ha definido que los PAs están estrechamente relacionados con importantes procesos fisiológicos y patológicos, tanto gliales como neurales. En cuanto a su relación con la actividad neuronal se ha descrito la influencia del astrocito sobre la actividad eléctrica a través de la liberación de glutamato, ácido gamma-amino butírico (GABA), L-serina y ATP, proceso conocido como liberación de gliotransmisores que, aunado a la expresión de receptores para neurotransmisores, han permitido acuñar el término de “sinapsis tripartita” (Covelo & Araque, 2018; Halassa, Fellin, & Haydon, 2009; Harada, Kamiya, & Tsuboi, 2016; Wolosker, Balu, & Coyle, 2016; Yoon & Lee, 2014). Adicionalmente, se ha evidenciado que los PAs proveen de sostén metabólico de los botones sinápticos al ser fuente de glucosa, lactato, piruvato y  $\beta$ -hidroxibutirato (Achanta & Rae, 2017; Bélanger, Allaman, & Magistretti, 2011; Cali et al., 2016). Más aún, en el control del flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la actividad neuronal, los PAs juegan un papel central (Bélanger et al., 2011). Se ha descrito también la interacción de los astrocitos con otras células en el SNC, en particular en los sitios en que estructuran la barrera hemato-encefálica (BHE) en donde sus pies terminales

inducen la especialización y sostén de los pericitos y las células endoteliales (Engelhardt & Sorokin, 2009; Yao, Chen, Norris, & Strickland, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que su actividad es determinante para limitar la muerte neuronal en procesos de estrés metabólico y excitotoxicidad principalmente, al permitir la utilización de reservas de glucógeno, capturar el excedente glutamatérgico y la formación de una barrera física alrededor de los focos de lesión. (Figura 3) (Cekanaviciute & Buckwalter, 2016). A lo largo del proceso de mielinización se ha definido la participación directa del astrocito al favorecer la migración y supervivencia de la célula precursora del oligodendrocito (Domingues, Portugal, Socodato, & Relvas, 2016; Yeung et al., 2014) y del oligodendrocito diferenciado, respectivamente, durante la síntesis de mielina y la organización concomitante de los procesos perinodales (Black & Waxman, 1988; Nualart-Marti, Solsona, & Fields, 2013). En este contexto, se destaca la capacidad del astrocito y sus procesos para fagocitar fragmentos desprendidos de mielina en ausencia de procesos inflamatorios (Mills et al., 2015).



**Figura 3.** Botón sináptico fagocitado. Reconstrucción tridimensional en la que se muestra al centro una dendrita (rojo), sobre la que hacen contacto 2 botones sinápticos, un botón con características normales (rosa) y otro con datos de degeneración temprana (morado), rodeado de una extensa cubierta astrocítica (naranja).

#### 1.2.2. Astrocitos como células secretoras.

De manera subsecuente a su descripción inicial, se sugirió que el astrocito es una célula de tipo secretor y en la actualidad se dispone de suficiente evidencia para respaldarlo. Inicialmente von Lenhossek observó un grupo de gránulos en el cuerpo del

astrocito que posiblemente correspondan con los organelos actualmente caracterizados como de naturaleza secretoria (Figura 4). En efecto, mediante microscopía confocal y electrónica se han definido diferentes organelos directamente involucrados en el proceso de secreción, tales como lisosomas, aparato de Golgi y cuerpos multivesiculares. Más recientemente, se ha demostrado que el astrocito secreta gliotransmisores como el ATP, glutamato, GABA y lactato en forma de microvesículas similares a las sinápticas (SLMV), afectando la actividad neural de manera directa. Las numerosas observaciones que apoyan la participación directa del astrocito en la transmisión sináptica sustentan el concepto de “sinapsis tripartita” (Araque, Parpura, Sanzgiri, & Haydon, 1999), en el que se postula que el astrocito modula la transmisión química a nivel sináptico y, por ende, participa en las funciones de decodificación neuronal, desmintiendo así la idea inicial del astrocito únicamente como elemento de sostén.

Otro de los organelos secretorios que se ha estudiado son los lisosomas, los cuales contienen ATP, Catepsina B y enzimas proteolíticas (Verkhatsky, Matteoli, Parpura, Mothet, & Zorec, 2016), entre otras moléculas.

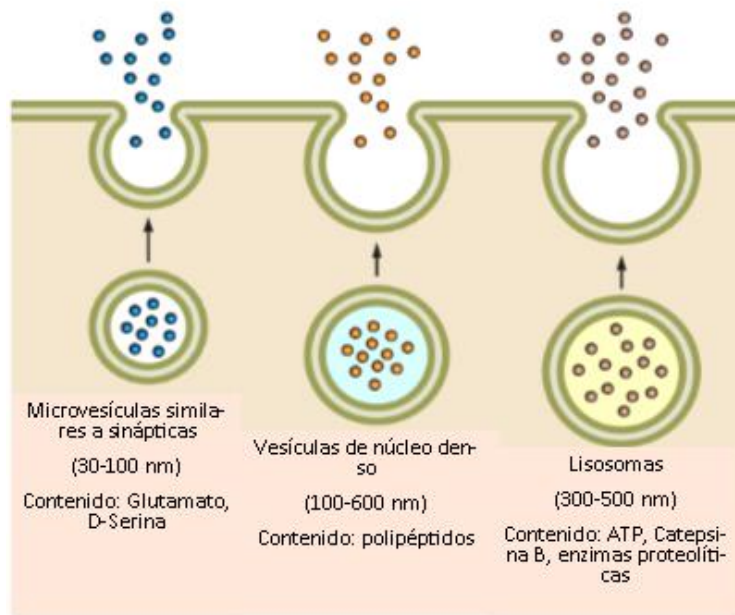
Los lisosomas son organelos membranosos de tamaño y morfología variables que están presentes en prácticamente todas las células animales. Por su contenido enzimático, hidrolasas ácidas entre otras, el lisosoma fue inicialmente considerado como un organelo relacionado solamente con la degradación de elementos fagocitados, organelos disfuncionales y otras macromoléculas. De la misma manera que otros organelos relacionados con la secreción, las proteínas que conforman al contenido lisosomal son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, siendo transferidas por microvesículas hacia el aparato de Golgi. En esta estructura las proteínas son glicosiladas, ensambladas e incorporadas en el lisosoma primario, por último los lisosomas son dispuestos en contacto con las estructuras a degradar, tanto en el espacio citoplásmico como extracelular. La función más conocida de los lisosomas consiste en la degradación de elementos extracelulares fagocitados en el denominado endosoma tardío el cual se forma por la fusión de lisosomas primarios con el fagosoma en el que se internalizan las sustancias o partículas fagocitadas. El gránulo resultante también llamado fagolisosoma o lisosoma secundario, permite a la célula la

degradación de la sustancia fagocitada y la eventual reutilización de los sustratos que le estructuran.

Otro elemento de reciclaje de membrana lo constituyen cuerpos multivesiculares o la fusión de lisosomas primarios con organelos disfuncionales como las mitocondrias formando estructuras conocidas como vacuolas autofágicas. Este fenómeno de degradación ocurre por diversos mecanismos que son: la fusión completa, en la cual el lisosoma primario libera todo su contenido al interior del endosoma a degradar; eventos “kiss and run”, en los que hay una transferencia parcial del contenido lisosomal hacia el endosoma a través de fusiones puntuales y localizadas entre las membranas de los organelos, dependientes de complejos SNAP- SNARE; y finalmente existe el mecanismo de intercambio en el cual el contenido lisosomal es transferido a través de túbulos (Luzio, Pryor, & Bright, 2007; Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

De manera más reciente se describió que en algunas células los lisosomas pueden ser secretados a su exterior. Esta función ha sido descrita con mayor detalle en el sistema inmune, en el que células como los linfocitos T citotóxicos liberan el contenido de sus lisosomas a través de la membrana celular, secretando así diversas sustancias como las perforinas necesarias para la muerte de los patógenos que la activaron (Luzio et al., 2007).

Las funciones propuestas para los lisosomas excitados por el astrocito son aún motivo de investigación y una de ellas es su participación en la sinapsis tripartita mediante liberación de ATP (Zhang et al., 2007), permitiendo con ello la propagación de las corrientes de calcio que se propagan entre los astrocitos (Li, Wang, & Bickford, 2003; Zhang et al., 2007). Más aún, se acepta que mediante la liberación lisosomal de ATP, el astrocito modifica la matriz extracelular induciendo la plasticidad de las espinas dendríticas (Padamsey et al., 2017) y la diferenciación de las células de microglia en algunos procesos patológicos (Dou et al., 2012).



**Figura 4.** Organelos secretorios del astrocito. Esquema en el que se muestran algunos de los organelos secretorios presentes en el astrocito. Modificado de Verkhratsky & Nedergaard, 2018

## 2. Antecedentes

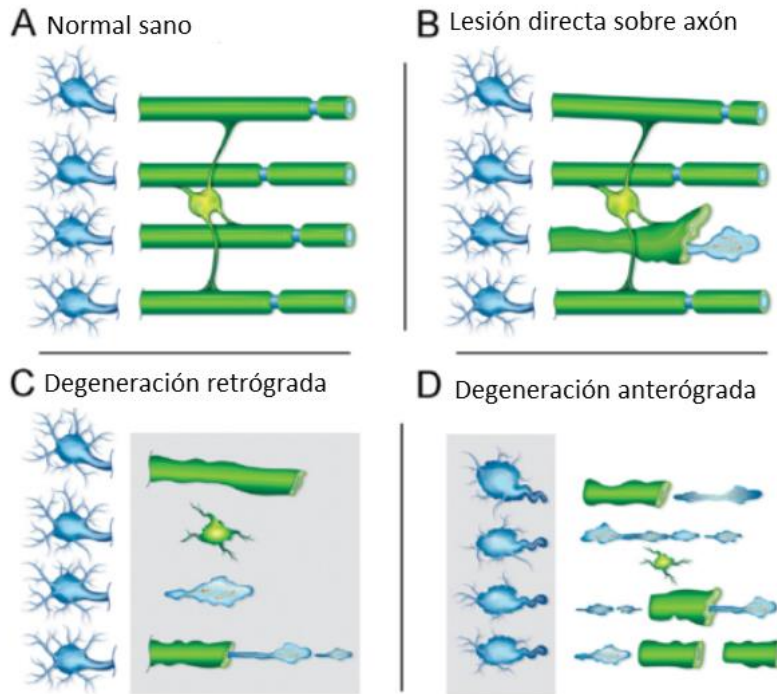
### 2.1 Modelos de lesión para estudiar conectividad cerebral y mecanismos de respuesta.

No obstante que los eventos celulares asociados a las respuestas del SNC a la lesión física han sido de los procesos más ampliamente estudiados dentro de las neurociencias, el conocimiento sobre los programas celulares y moleculares involucrados es aún precario. Bernhard Von Gudden en 1870, estableció el primer modelo experimental de degeneración anterógrada en el que observó atrofia cortical secundaria al daño de la retina (Sarikcioglu, 2007); numerosas variantes de este método llevaron a importantes conclusiones sobre la conectividad cerebral. Uno de los métodos iniciales en el estudio sobre el proceso de degeneración anterógrada es el método Marchi utilizado desde 1886; éste permite visualizar los sitios de degeneración de la vaina de mielina mediante el uso de soluciones a base de osmio. (Marchi, 1886; Strich, 1968) Cincuenta años después se implementaron las tinciones a base de plata, por Glee, que permitieron, además, visualizar los botones sinápticos procedentes de



axones dañados. Posteriormente, W. Nauta alrededor de 1950 depuró y sistematizó la técnica introducida por Glees en el estudio de la conectividad de la corteza cerebral y los ganglios basales (Glees, Meyer, & Meyer, 1946).

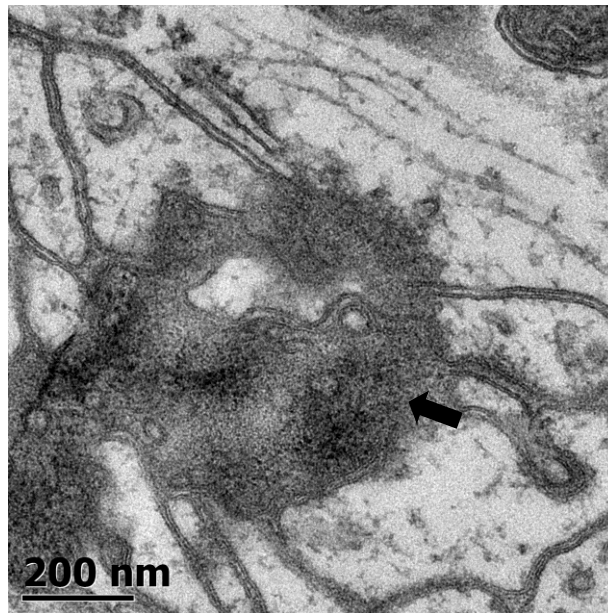
En cuanto a la degeneración retrógrada es indispensable mencionar las aportaciones iniciales de Franz Nissl con el método de lesión axonal y degeneración somática retrógrada (Brodal, 1981; Jones, 2007). De manera más reciente se han diseñado modelos más puntuales para observar los fenómenos de plasticidad y desarrollo de la vía visual, como el utilizado por El-Danaf (2015) en el que se describen las alteraciones en el desarrollo postnatal de las neuronas de relevo del NGDL al ser sometidas a una deaferentación congénita, como consecuencia de la ausencia del factor de transcripción *Math5*<sup>-/-</sup> que afecta de manera puntal el desarrollo de las células ganglionares de la retina. Si bien el propósito del estudio aquí propuesto proveerá de algunos aspectos novedosos relacionados con la conectividad neuronal, se ha optado por la utilización de esta metodología para confirmar la participación directa del astrocito y los PAs en la respuesta al daño neuronal o axonal (Ver Figura 5). A pesar de las grandes aportaciones de los estudios de microscopía óptica, fue indispensable el desarrollo del microscopio electrónico para deslindar los mecanismos subcelulares involucrados en respuesta a la denervación quirúrgica con controles experimentales. La microscopía electrónica permitió identificar la organización de las conexiones sinápticas en el neuropilo, la interacción específica de los procesos astrocíticos y sus componentes especializados, la organización de las cubiertas mielínicas sobre los axones y la respuesta morfológica de cada una de estas células ante los diferentes procesos lesivos (Peters, Palay, & Webster, 1978; Varela-Echevarría, Vargas-Barroso, Lozano-Flores, & Larriva-Sahd, 2017). Por todo lo anterior, se ha optado por el estudio y caracterización ultraestructural tanto de la degeneración ortógrada, como las respuestas de los astrocitos en el entorno inmediato.



**Figura 5.** Modelos de lesión neural. Esquema que muestra diferentes tipos de lesión y su efecto sobre los axones y la mielina que los recubre. En azul, las neuronas y sus prolongaciones, soma y dendritas del lado izquierdo, axón del lado derecho. En verde, el oligodendrocito y sus prolongaciones formando la cubierta miélnica. Nótese la cubierta intermitente sobre el axón, dando lugar a los nodos de Ranvier. A) Tejido sano y mielina normal. B) Lesión directa sobre un axón con alteración del axón y su cubierta miélnica. C) Degeneración retrógrada. Lesión sobre la sustancia blanca (axones) y diversos estadios de daño en cada axón y su cubierta. D) Degeneración anterógrada. Lesión sobre diversos cuerpos neuronales, se observan los cambios progresivos en los axones y sus cubiertas miélnicas. Modificado de Armstrong et al. 2016.

La degeneración ortógrada o centrífuga de la célula ocurre cuando su cuerpo es destruido o su axón es interrumpido; el proceso degenerativo progresa desde el propio cuerpo celular o desde el extremo distal del axón y termina abruptamente en los botones sinápticos que éste emite (Brodal, 1981). El estudio temporal del proceso de degeneración ortógrada se ha logrado mediante la utilización de animales lesionados y sacrificados a intervalos temporales controlados. Así, se ha observado que, a partir de las doce horas, las terminales sinápticas de la célula lesionada, son rodeadas por los PAs adyacentes, y pasados dos o tres días, los botones sinápticos son fagocitados y degradados por éstos (Ver Figuras 3 y 6). La sucesión de cambios aquí enumerados ha sido reproducida por numerosos investigadores, incluyendo la propia contribución de

este laboratorio (Larriva-Sahd, 2008; Larriva-Sahd, Orozco-Estévez, & Condés-Lara, 1998; Larriva-Sahd, Rondán-Zárate, & Ramírez-Degollado, 1995; Larriva-Sahd, Rondán, Orozco-Estévez, & Sánchez-Robles, 1993; Marcellino et al., 2012; Varela-Echevarría et al., 2017; Vargas-Barroso & Larriva-Sahd, 2013). En el curso de estos trabajos, la interacción entre los procesos astrocíticos y los axones mielínicos adyacentes fue observada de manera consistente en especímenes de roedores adultos sanos.



**Figura 6.** Botón sináptico con cambios degenerativos. Fotomicrografía de alto aumento en la que se muestra al centro un botón sináptico con datos de degeneración. Se observa una estructura membranosa con bordes irregulares, citoplasma muy electrón-denso y múltiples vesículas sinápticas en su interior. Se señala la densidad postsináptica con una flecha.

## 2.2 Remodelación de la mielina.

En investigaciones recientes se ha obtenido evidencia de que la mielina no es un elemento permanente del sistema nervioso y que como tantos otros elementos del organismo requiere un sistema de recambio eficiente; los mecanismos por los que se realiza este recambio son hasta ahora desconocidos. Es relevante que mediante técnicas de medición del carbono ( $C^{14}$ ) se determinó por separado la vida media del complejo lipoproteínico de mielina y de la membrana celular del oligodendrocito en diferentes etapas de la vida del humano, concluyendo que la vida media de la mielina central alcanza a ser de algunos meses en comparación con la vida media de esta

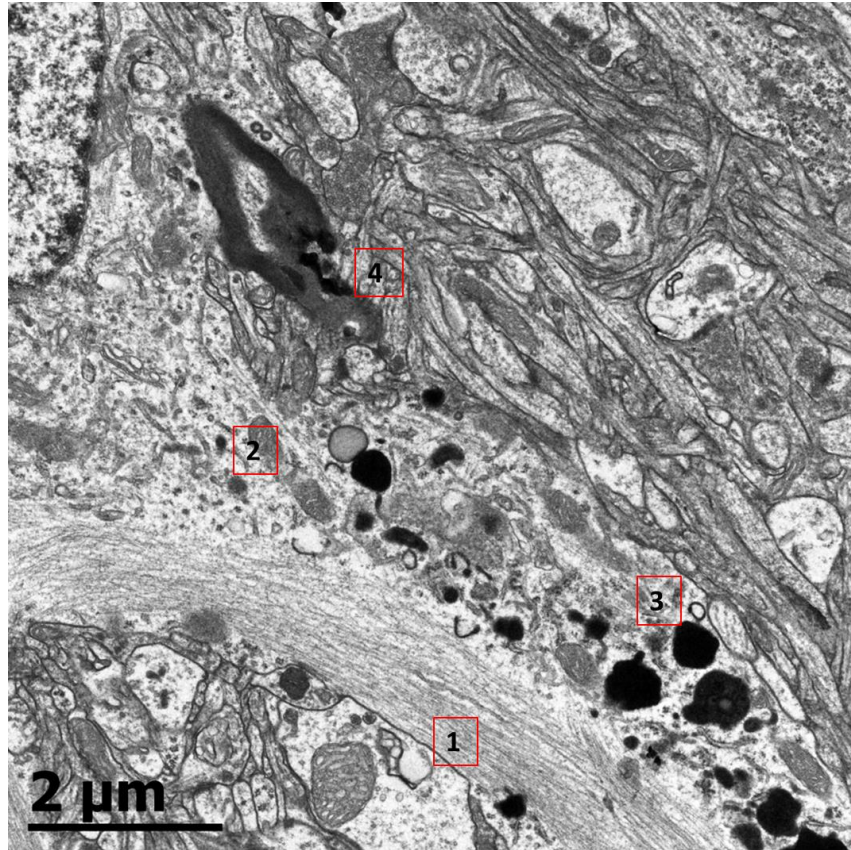
célula que alcanza a ser de hasta 50 años (Yeung et al., 2014). Por lo anterior, se infiere que debe haber un mecanismo de remodelación de la mielina a lo largo de la vida del individuo.

Existe además un importante cuerpo de evidencia cuyos alcances aún no han sido estudiados a profundidad, en relación a las características de la síntesis proteínica en el sistema nervioso. Recientemente se ha determinado que el sistema nervioso presenta un acelerado proceso de síntesis proteínica (3-4%) en comparación con otros tejidos que son sometidos a estrés metabólico como es el caso del músculo esquelético (1-2%). Algunas de las proteínas aisladas a lo largo del proceso anabólico cerebral conforman la vaina mielínica (Smeets et al., 2018).

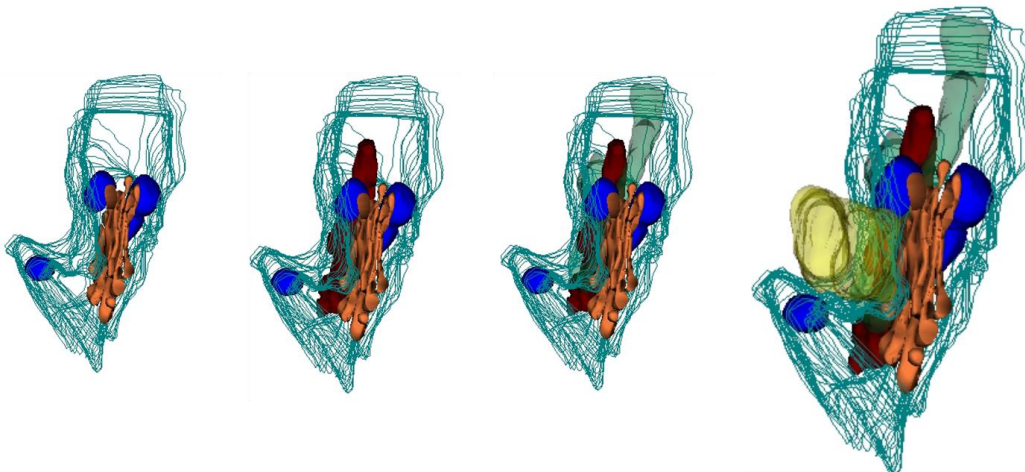
El estudio de la remodelación de mielina es importante para distintos campos de las neurociencias, tanto desde el punto de vista de los procesos patológicos como del desarrollo y plasticidad normales. Fundamentalmente, la investigación se ha enfocado en describir los mecanismos fisiopatológicos relacionados a las enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (Harlow, Honce, & Miravalle, 2015) o procesos de lesión traumática (Armstrong, Mierzwa, Sullivan, & Sanchez, 2016), por lo que la información sobre los mecanismos que regulan el fenómeno en situaciones fisiológicas es escasa.

Existen dos propuestas tendientes a explicar el fenómeno de remodelación de mielina en el animal sano. La primera consiste en las observaciones hechas en modelos de esclerosis múltiple (Harlow et al., 2015) y en modelos de envejecimiento (Hill, Li, & Grutzendler, 2018; Safaiyan et al., 2016) en los que, en un proceso que aún continúa en estudio, como consecuencia del aumento de radicales superóxido en el axón o el oligodendrocito, las regiones internodales terminan por desprenderse y liberar fragmentos de mielina al espacio extracelular (Bartzokis, 2004; Hill et al., 2018). En teoría, estos fragmentos terminarían por ser fagocitados principalmente por células de microglia y posiblemente también por los astrocitos (Mills et al., 2015). Las porciones del axón que quedan desprovistas de cubierta mielínica serían cubiertas por oligodendrocitos diferenciados recientemente a partir de células precursoras de oligodendrocitos (OPC), como lo sugieren otros modelos (Hill et al., 2018; Young et al., 2013). Una de las principales limitantes de esta propuesta es que la cantidad de OPC

que se diferencian en oligodendrocitos (3% anual) es insuficiente para suplir el total de mielina que sufre recambio (Yeung et al., 2014). Otra limitante se relaciona con el desprendimiento de los fragmentos de mielina; estos fragmentos explicarían los fagocitados por las células de microglia que se identifican en los lisosomas y gránulos de lipofuscina que permanecen insolubles en el interior del citoplasma (Hill et al., 2018). Otra propuesta que pretende explicar el fenómeno de remodelación de mielina como un proceso continuo en el animal sano, consiste en el desmantelamiento “in situ” de la vaina mielínica por exocitosis del contenido lisosomal procedente de astrocitos (Varela-Echevarría et al., 2017). A partir de la diferenciación de prolongaciones del citoplasma del astrocito, denominadas como procesos paraxiales (PAP), conformados por los organelos que integran la maquinaria de síntesis y empaquetamiento enzimático (mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, y lisosomas) interactuando con axones mielínicos adyacentes (Ver Figuras 7, 8). Esta relación fue observada de manera consistente en especímenes de roedores adultos sanos y el hecho de que dichos procesos suelen contener numerosos lisosomas y que la mielina asociada con estos muestra diferentes grados de alteración estructural, motivó un detallado estudio histo-cito-químico y ultraestructural. En dicho trabajo se ilustra la participación directa del astrocito y sus prolongaciones en el remodelamiento de la mielina del animal normal (Ver Figura 9) (Varela-Echevarría et al., 2017).

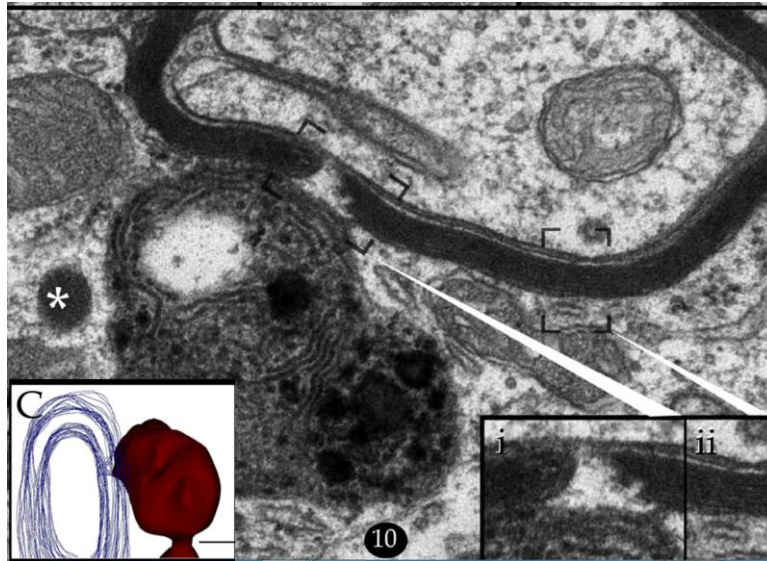


**Figura 7.** Ultraestructura de los PAPs. Fotomicrografía de microscopía electrónica en la que se muestra al centro en diagonal descendente de izquierda a derecha, un proceso paraxial (PAP), se muestran sus organelos característicos: filamentos intermedios (1), mitocondrias (2), lisosomas (3) en relación a mielina (4).



**Figura 8.** Elementos de los PAPs. Reconstrucción tridimensional de un PAP en la que se señalan los distintos organelos que contiene y su relación con la mielina. Lisosomas (azul), aparato de Golgi (naranja), fascículos de filamentos intermedios (aqua) y mitocondrias (rojo) en contacto con un axón (amarillo) Modificado de Varela-Echavarría et al. 2017.





**Figura 9.** Exocitosis lisosomal y cambios en la mielina. Panel en el que se muestra la interacción de un lisosoma con la cubierta mielínica de un axón. Se muestran encuadres a mayor aumento de la excavación local en la envoltura mielínica (i), y mielina distal al sitio específico de la interacción mostrando un patrón regular. En la esquina inferior izquierda se muestra una reconstrucción tridimensional del contacto entre el lisosoma (rojo) y la cubierta mielínica (azul). Modificado de Varela-Echavarría et al. 2017

En un intento de aportar información suplementaria a la postulación de que el astrocito está normalmente involucrado en la remodelación de mielina, propusimos que los PAP que median en este evento experimentan hipertrofia en respuesta a la degeneración de mielina provocada por daño neuronal. Nuestro modelo en este trabajo consistió en dañar directamente las neuronas de proyección de la retina y en el estudio ulterior del núcleo geniculado dorsolateral (NGDL), es decir su primer relevo central. Si bien este representa el objetivo central del estudio, su consecución requirió la familiarización con la organización sináptica del neuropilo del NGDL, lo cual realizamos de manera preliminar y, por ende, prioritaria.

### 2.3 Organización sináptica del núcleo geniculado dorsolateral (Tabla 1)

El relevo talámico de la vía visual tiene una organización citológica característica que ha sido estudiada por múltiples autores empleando diversas herramientas metodológicas. Estos resultados han permitido determinar con cierto detalle la conectividad sináptica en este núcleo y las interacciones gliales que en él ocurren. Una de las aportaciones

fundamentales para el estudio de la conectividad sináptica fue la hipótesis S-F propuesta por Uchizono en 1965, la cual correlaciona el hallazgo de vesículas sinápticas con un perfil esferoidal (S) como activadoras, glutamatérgicas y colinérgicas, y las que tienen un perfil aplanado (F) como inhibidoras, gabaérgicas (Uchizono, 1975). Esta descripción permitió dar sentido a la descripción de la ultraestructura sináptica desde el enfoque de la conectividad. En específico acerca del NGDL, una de las primeras descripciones se debe a Szentágothai quien, a través del uso de tinciones argénticas y microscopía electrónica en el cerebro del gato, determinó los sitios precisos de la terminación retino-genículo-cortical, la contribución de las interneuronas a los glomérulos y de la vía de retroalimentación cortico-genicular (Famiglietti & Peters, 1972; Szentágothai, Hátori, & Tömböl, 1966). Más recientemente, se ha propuesto una clasificación general para las terminaciones sinápticas en el tálamo, que propone 4 perfiles sinápticos: RS (vesículas redondas, superficie terminal pequeña, mitocondrias de matriz electrón-densa), RL (Vesículas redondas, superficie terminal grande, mitocondrias de matriz clara), F1 (axones con vesículas aplanadas) y F2 (dendritas con vesículas aplanadas) (Li et al., 2003). En el caso específico del núcleo geniculado dorsolateral (NGDL), que es contraparte del geniculado lateral de los primates, estos perfiles sinápticos se asocian de la siguiente manera (Ver Tabla 1): las RL comprenden un grupo de terminaciones que agrupan a las aferencias retino-geniculadas glutamatérgicas, mientras que RS representan aferencias centrales y comprenden a los botones sinápticos procedentes de la capa V de corteza visual glutamatérgicas, aferencias pedúnculo-pontinas colinérgicas, aferencias de la sustancia tegmental ventral dopaminérgicas y del núcleo dorsal del raphé serotoninérgicas. Finalmente, F1 y F2 corresponden a las terminaciones axonales y dendríticas originadas de interneuronas talámicas (Çavdar, Hacıoğlu, Şirvanci, Keskinöz, & Onat, 2011; Li et al., 2003).

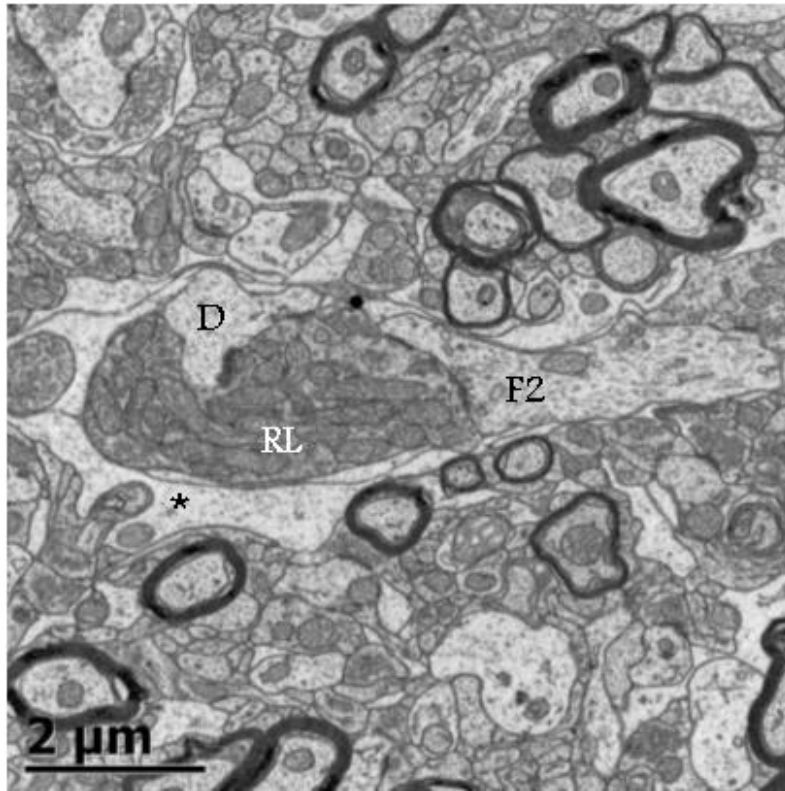
Una de las características más destacadas de la organización del neuropilo del NGDL es la formación de glomérulos; el glomérulo está definido como el sitio de convergencia de diversos tipos sinápticos de origen axonal y dendrítico en torno a un axón retino-genicular, que modula la transmisión al relevo cortical. Una estructura adicional



corresponde a la denominada “triada” del NGDL (Ver Figura 10) conformada por una terminación óptica haciendo contacto sobre la dendrita de una neurona genículo-cortical, también denominada principal. Adyacente al elemento sináptico de esta interacción se describe una segunda terminal, la dendrita de una interneurona, que interacciona simultáneamente con la dendrita y el botón retino-geniculado. Por ende, la interneurona de la triada representa un sustrato de retroalimentación negativa sobre su aferencia visual. (Çavdar et al., 2011; Cox, 2014; Li et al., 2003). Puesto que el conocimiento sobre la organización y tipos sinápticos del NGDL normal será necesario para interpretar adecuadamente el efecto de la deaferentación, ello conforma el primer objetivo de este trabajo.

Perfiles	Relación al glomérulo	Vesículas	Origen	Contacto sináptico
RL (5- 14%)	Central	Redondas	Axón de retina	Grande sobre dendritas tálamo-corticales y de interneuronas
RS(78-82%)	Fuera del glomérulo	Redondas	N. Cortico-talámicas	Glutámicas: Terminales pequeñas sobre dendritas tálamo corticales e interneuronas Colinérgicas: sobre tálamo- corticales e interneuronas Dopamina: sobre interneuronas
F1 (10%)	Pericentral	Aplanadas	Axón de interneuronas	GABA: Sobre dendritas tálamo-corticales
F2 (~1%)	Pericentral	Aplanadas	Dendritas de interneuronas	GABA: Sobre dendritas tálamo-corticales y axón óptico.

**Tabla 1.** Resumen de perfiles sinápticos y sus características. Çavdar et al., 2011



**Figura 10.** Triada sináptica. Microfotografía a mediano aumento en la que se observa una triada sináptica, al centro una terminal óptica (RL) con vesículas redondas, haciendo sinapsis del lado izquierdo con su relevo genículo-cortical (D) y del lado derecho una sinapsis recíproca con la dendrita de una interneurona (F2), rodeados por una cubierta glial (\*).

### 3. Justificación

Recientemente se ha descrito la interacción de los procesos astrocíticos con características secretorias, procesos paraxiales (PAP), con la vaina de mielina de los axones en el SNC como un posible mecanismo de remodelación de la mielina (Varela-Echevarría et al., 2017). Se propone un modelo de lesión axonal ortógrada para estimular el proceso de remodelación de mielina y la interacción con los procesos paraxiales (PAP), manifiesta en la sobreexpresión de la maquinaria de exocitosis lisosomal. Estos fenómenos resultan determinantes para el estudio de enfermedades neurodegenerativas con componentes desmielinizantes, además de ayudar a la comprensión del fenómeno biológico de recambio miélinico.

### 4. Pregunta de investigación

¿Causa la deafferentación talámica de la retina en la rata Wistar modificaciones sinápticas y en la diferenciación de los procesos astrocíticos en el núcleo geniculado dorsolateral (NGDL) contralateral a la lesión?

### 5. Hipótesis:

La degeneración ortógrada de la retina induce alteraciones neurales que repercuten en el número, distribución y diferenciación de los procesos astrocíticos en el NGDL contralateral, su primer relevo sináptico.

### 6. Objetivos

#### 6.1 Objetivo general

Describir la conformación y distribución de los procesos astrocíticos sobre el NGDL y su relación con los elementos adyacentes.

#### 6.2 Objetivos específicos

Definir y familiarizarse con la organización sináptica normal del NGDL

Implementar el modelo de lesión retiniana por isquemia- reperusión en la rata Wistar macho adulto.

Evidenciar el proceso de degeneración walleriana en los axones de la vía visual a nivel del NGDL contralateral.

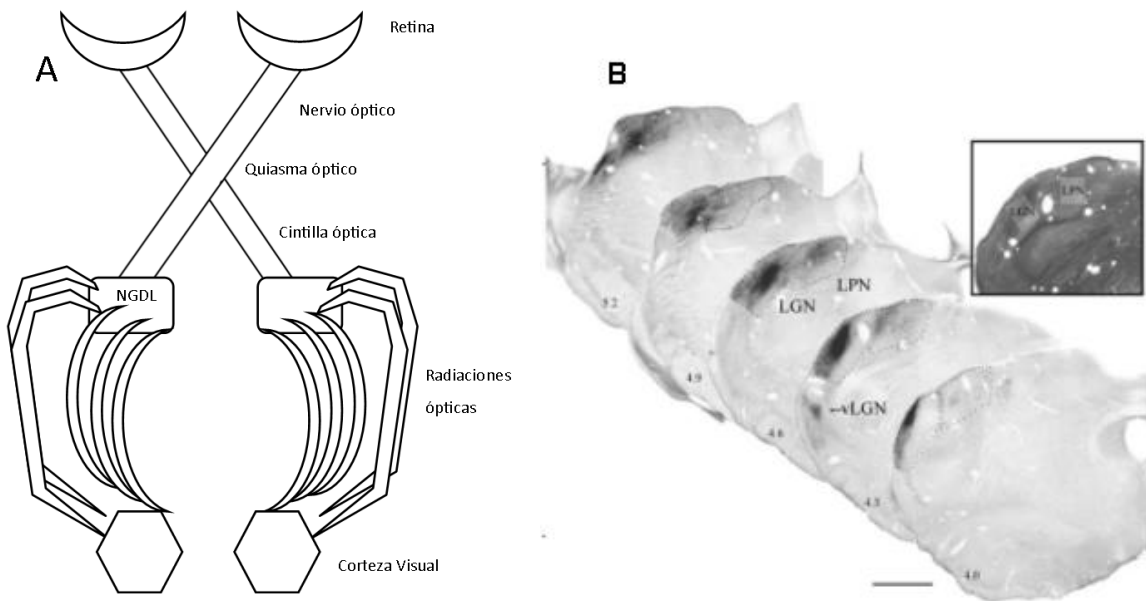
Describir mediante microscopía electrónica la distribución, diferenciación y relaciones de los procesos astrocíticos a nivel del NGDL contralateral a la lesión.

## 7. Materiales y métodos

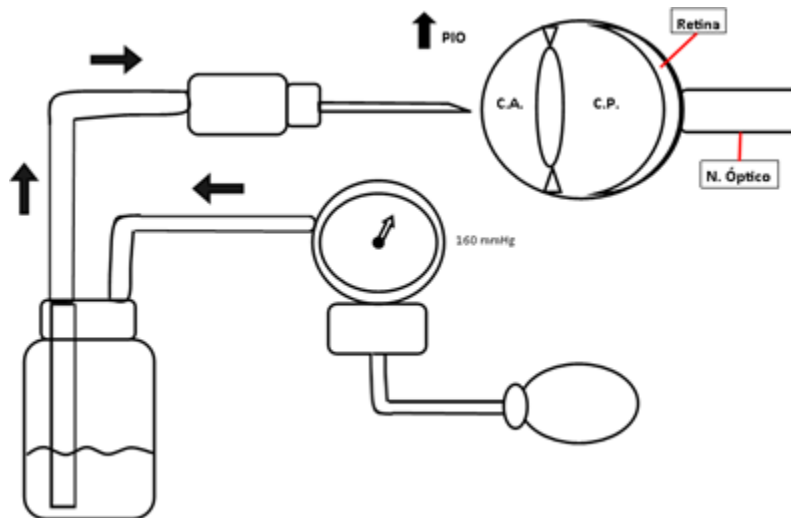
### 7.1 Modelo de lesión y perfusión

Se realizó un estudio experimental con un modelo de lesión ortógrada por hipertensión ocular en 3 Ratas Wistar macho adulto (10 semanas de edad), las cuales tuvieron un tiempo de sobrevivencia posterior a la lesión de 7 días y se compararon con 4 animales sin lesión (grupo control). En cada caso, se extrajeron los encéfalos y nervios ópticos para su procesamiento para microscopía electrónica. El modelo de lesión utilizado fue propuesto por Adachi (1996) y ocurre por un mecanismo de isquemia-reperfusión sobre las células de la retina; por medio de un dispositivo fabricado a partir de un equipo de perfusión manual adaptado y una jeringa de 1 cc con aguja 29 g que se conecta al dispositivo. Posteriormente se coloca la aguja dentro de la cámara anterior del ojo derecho del animal anestesiado y al activar el sistema de presión positiva se transmite la presión hidrostática (presión constante de 160 mmHg, sostenida por 90 minutos) a la cámara anterior del globo ocular, produciendo así necrosis seguida de daño por perfusión en la retina. (Figuras 11 y 12)

Todos los animales fueron manejados de acuerdo al reglamento interno del comité de ética en investigación del Instituto de Neurobiología de la UNAM y la NOM-062-Z00-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" y a la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio." del Consejo Nacional de Investigación (NRC) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos. Se realizaron los procedimientos buscando siempre minimizar el sufrimiento del animal y el número de animales empleados. Antes y después del experimento los animales permanecieron en las instalaciones del bioterio del INB en cajas individuales con condiciones ambientales controladas de humedad y temperatura, con agua y alimento *ad libitum* y con un ciclo de 12 horas de luz/ oscuridad.



**Figura 11.** Vía visual de la rata. **A** Esquema representativo de la vía visual de la rata. Modificado de Wilks et al., 2013. **B** Serie de fotografías en las que se señala con las letras LGN el núcleo en estudio, barra de calibración = 1mm. Tomado de Li et al., 2003.

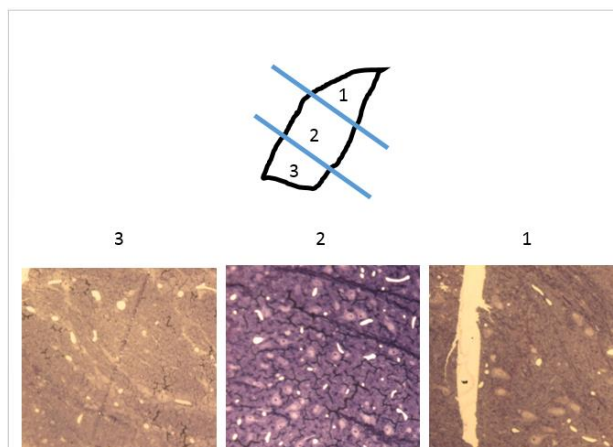


**Figura 12.** Esquema del dispositivo de lesión. Se muestra el mecanismo de canulación a la cámara anterior (C.A.) del ojo, conectado al dispositivo de regulación manual de presión hidrostática. C.P. Cámara posterior.

## 7.2 Preparación del tejido para microscopía electrónica

Los animales, tanto del grupo control como del grupo experimental, se sacrificaron con pentobarbital (40 mg/kg) y cada rata fue perfundida con solución salina al 0.9%, seguida de fijador de Karnovsky (glutaraldehído 2% y paraformaldehído 4%, diluidos en buffer de cacodilatos 0.1 M). Se enuclearon los ojos y se removió el cerebro para ser transferidos a la solución de fijación por 48 horas. Posteriormente se disecaron los nervios ópticos y la región del NGDL, de manera bilateral. Para un estudio sistemático del núcleo este se dividió en 6 secciones, una mitad anterior, una posterior y cada una en tercios (medial, intermedio y lateral) (Figura 13). El proceso postfijación para visualizar glucógeno se realizó por inmersión en solución de osmio al 1% y ferricianuro de potasio al 1.5% por 40 minutos; seguido de inmersión en osmio al 1% diluido en buffer de cacodilatos 0.1M (pH 7.37) por una hora y deshidratación ulterior e inclusión en resinas epóxicas. Después de polimerizar los bloques se realizaron cortes semifinos (un micrómetro) y finos (70nm) con un ultramicrotomo Leica ULTRACUT R empleando cuchillas de vidrio. Los cortes finos plateados y dorados (60 – 90 nm) fueron recogidos en rejillas de cobre para continuar su procesamiento (Figura 14).

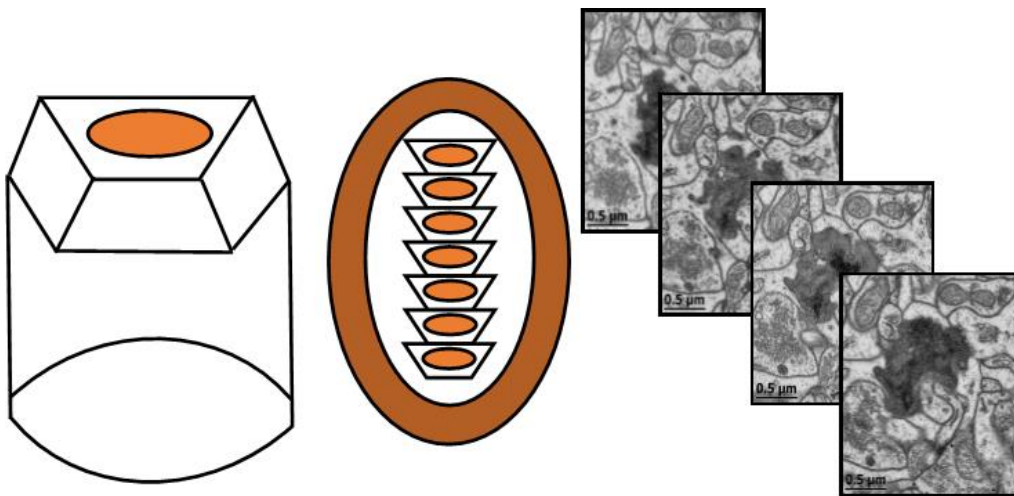
Por último, los cortes finos fueron contrastados con soluciones acuosas de acetato uranilo, 1 gota sobre la rejilla por 15 minutos, y citrato de plomo, 1 gota sobre la rejilla por 10 minutos, para su observación en el Microscopio electrónico JOEL 1010.



**Figura 13.** Muestreo del NGDL. Se esquematiza en la parte superior de la figura una de las mitades anterior o posterior del NGDL y la disección en tercios utilizada para el muestreo sistemático del mismo, en la parte inferior se muestran imágenes representativas de cada una de las secciones.

### 7.3 Reconstrucción tridimensional

La reconstrucción tridimensional es una herramienta que puede aplicarse en el estudio de organización sináptica y ultraestructural ya que permite no sólo identificar la conformación de organelos en las células sino visualizar sus principales interacciones para inferir los procesos que se están llevando a cabo (Varela-Echavarría, et al., 2017). Para realizar la técnica, posterior a la inclusión se obtuvieron cortes seriados del sitio de interés, se observaron y fotografiaron en el microscopio electrónico, con ayuda del plugin TrackEM2 de Image J (Schindelin et al., 2012) se realiza la alineación automática de las imágenes y con el software Reconstruct (<http://synapses.cim.utexas.edu/tools/reconstruct/reconstruct.stm>) se realiza la corrección manual del alineado y trazo manual de las estructuras de interés hasta obtener una representación tridimensional de las imágenes y su volumen aproximado. Esta herramienta fue utilizada para identificar relaciones tridimensionales de los perfiles sinápticos y para hacer las determinaciones volumétricas de los PAP y su contenido lisosomal.



**Figura 14.** Proceso de corte seriado para microscopía electrónica. Esquemas de izquierda a derecha, bloque de resina con tejido incluido (ovalo naranja), el cual es cortado con ayuda de un ultramicrotomo y cuchillas de vidrio, los cortes consecutivos fueron recogidos en una rejilla ovalada de cobre con una cubierta de formvar, contrastados y visualizados en el microscopio electrónico, se tomaron fotomicrografías que fueron alineadas y reconstruidas.

#### 7.4 Semi-cuantificación de perfiles sinápticos.

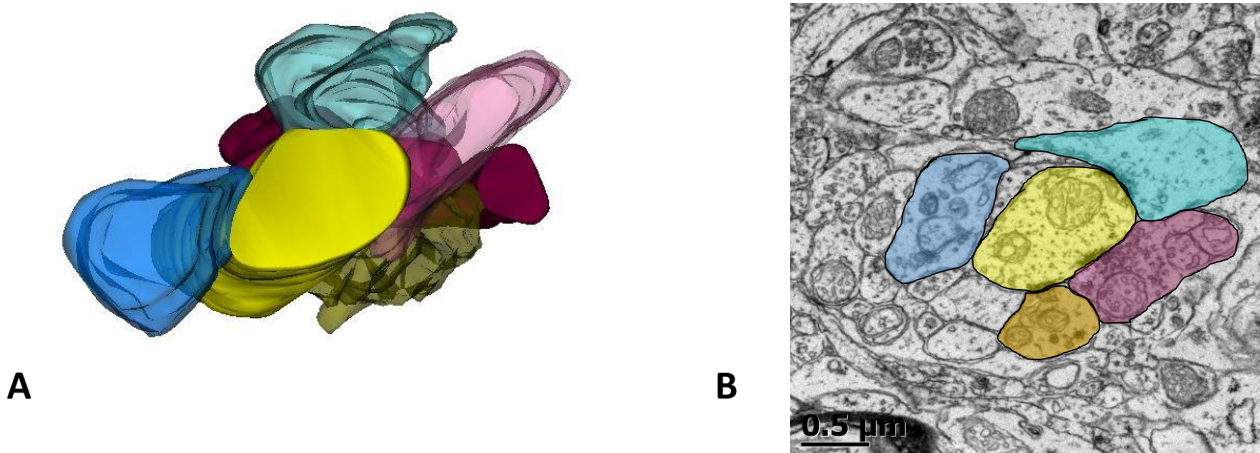
Con el objetivo de determinar la reproducibilidad de la lesión y poder evaluar los cambios descritos en los PAP se realizó la identificación y cuantificación manual de los perfiles sinápticos en las fotomicrográficas de animales control y experimental. Los criterios tomados en cuenta para la clasificación fueron acordes a la literatura mencionada, dividiendo a las terminales sinápticas presentes en 5 posibles grupos: rl, rs, f1, f2, dcv (Li et al., 2003; Uchizono, 1975). Además de determinar los perfiles con datos de degeneración de acuerdo a lo descrito por Peters et al. (1978). Los resultados se analizaron con herramientas estadísticas del programa Graphpad Prisma.

### 8. Resultados.

#### 8.1 Sinaptología del NGDL

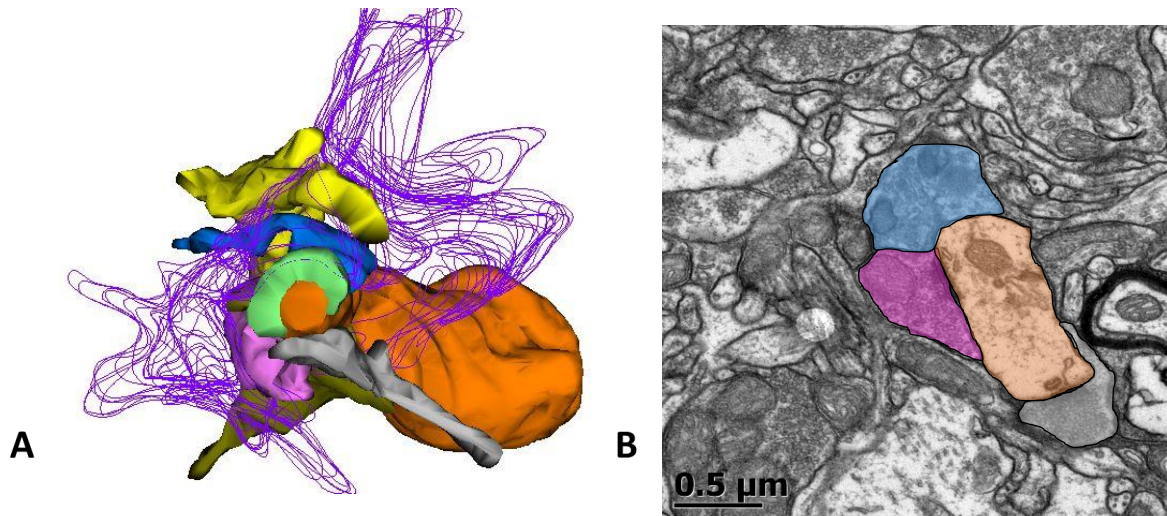
Con el objetivo de familiarizarse e identificar los componentes del NGDL se realizaron múltiples observaciones de su organización sináptica y se realizaron reconstrucciones tridimensionales de algunas de sus estructuras más representativas.

Se realizaron reconstrucciones tridimensionales en animales control, de dos glomérulos con el fin de identificar su organización sináptica y sus relaciones gliales (Figuras 15 y 16).



**Figura 15.** Glomérulo del NGDL. **A** Reconstrucción tridimensional de un glomérulo del núcleo geniculado dorsolateral de un animal sano. Al centro el axón óptico (amarillo) y a su alrededor múltiples contactos sinápticos provenientes de dendritas de interneuronas intrínsecas del núcleo (azul, rosa, naranja, verde). 50 cortes a 30,000 aumentos. **B** Fotomicrografía de mediano aumento representativa de la serie utilizada para la reconstrucción.





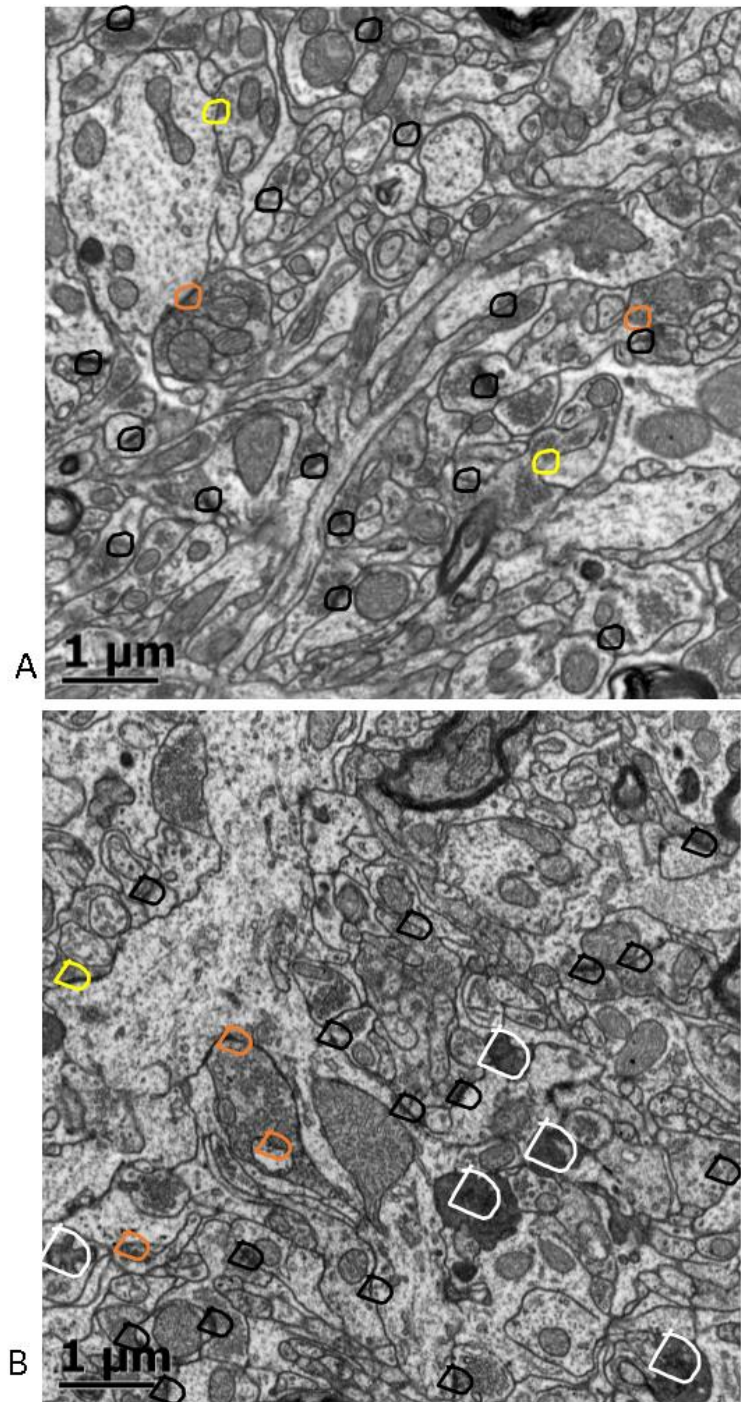
**Figura 16.** Glomérulo del NGDL. **A** Se muestra la reconstrucción tridimensional de un glomérulo del núcleo geniculado dorsolateral de un animal sano. Al centro el axón óptico (naranja) con múltiples contactos sinápticos (amarillo, rosa, gris y azul) y la cubierta glial (morado) delimitando el glomérulo. 54 cortes a 30,000 aumentos. **B** Fotomicrografía representativa de la serie empleada para la reconstrucción del glomérulo.

Una vez lograda la identificación morfológica de los principales componentes del NGDL y su organización característica fue posible continuar con la descripción semi-cuantitativa del núcleo.

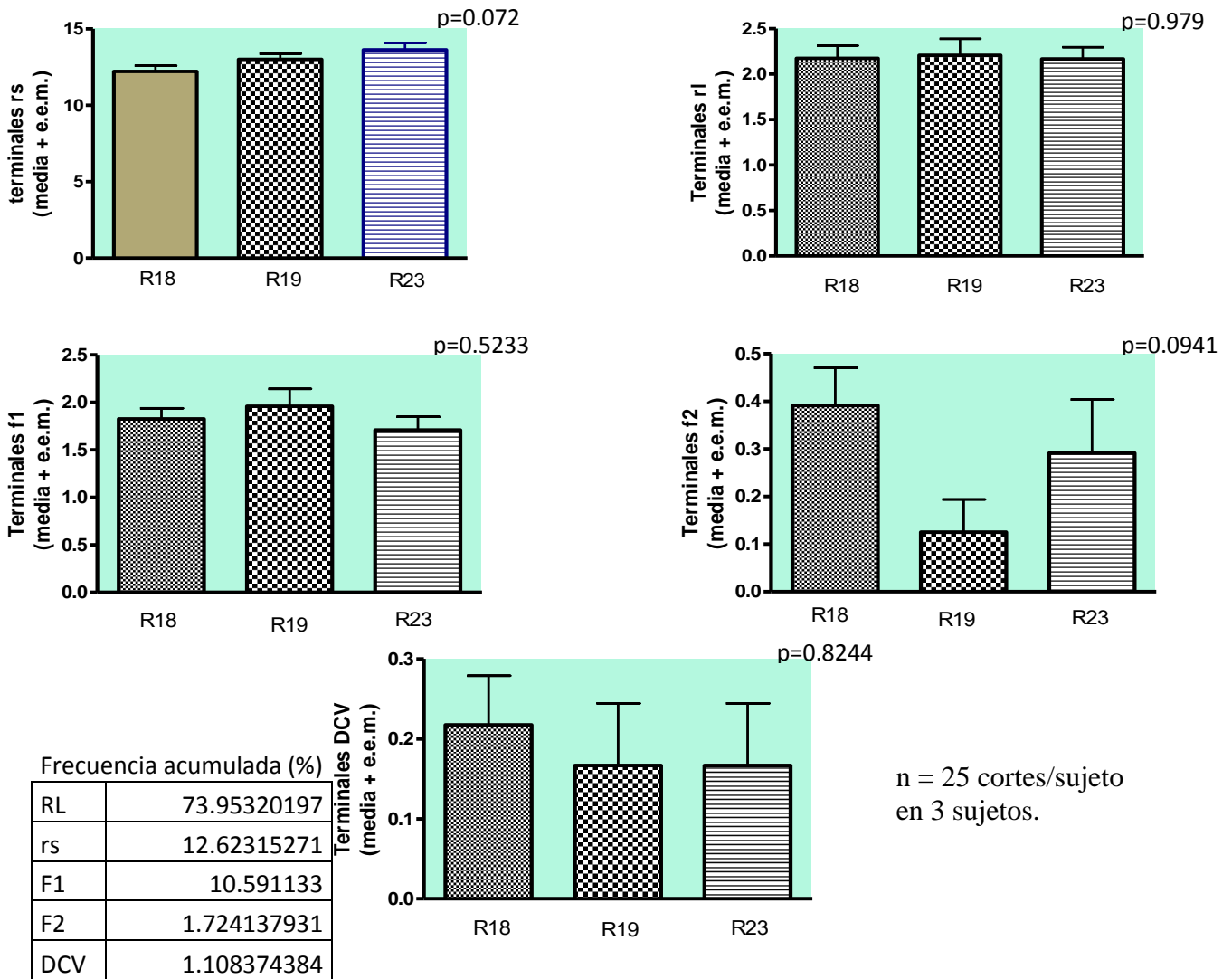
## 8.2 Semi-cuantificación sináptica del núcleo geniculado dorsolateral comparada con el modelo de lesión.

En concordancia con el objetivo de conocer la organización del núcleo en estudio se realizó la clasificación y conteo manual de las estructuras presentes en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de los animales control. Los criterios tomados en cuenta para la clasificación fueron acordes a la literatura del área antes mencionada (Li et al., 2003; Uchizono, 1975), dividiendo a las terminales sinápticas presentes en 5 posibles grupos: RL, rs, F1, F2, DCV. Se tomaron muestras del NGDL de los animales control, se observaron en el microscopio electrónico y analizaron 50 fotomicrografías del neuropilo de cada bloque a un aumento de 12,000x ( $12.6976 \mu\text{m}^2$ ). Se visualizaron, clasificaron y cuantificaron cada uno de los perfiles sinápticos encontrados en las fotomicrografías (Figura 17). Una vez determinado el total de terminales en las imágenes de cada sujeto, se realizó la comparación estadística entre los sujetos y se

aplicó un test de Kruskal-Wallis para identificar diferencias entre estas poblaciones sinápticas. Para todos los tipos de terminales no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los sujetos, lo que corrobora una cuantificación consistente en las diferentes observaciones (Figura 18).



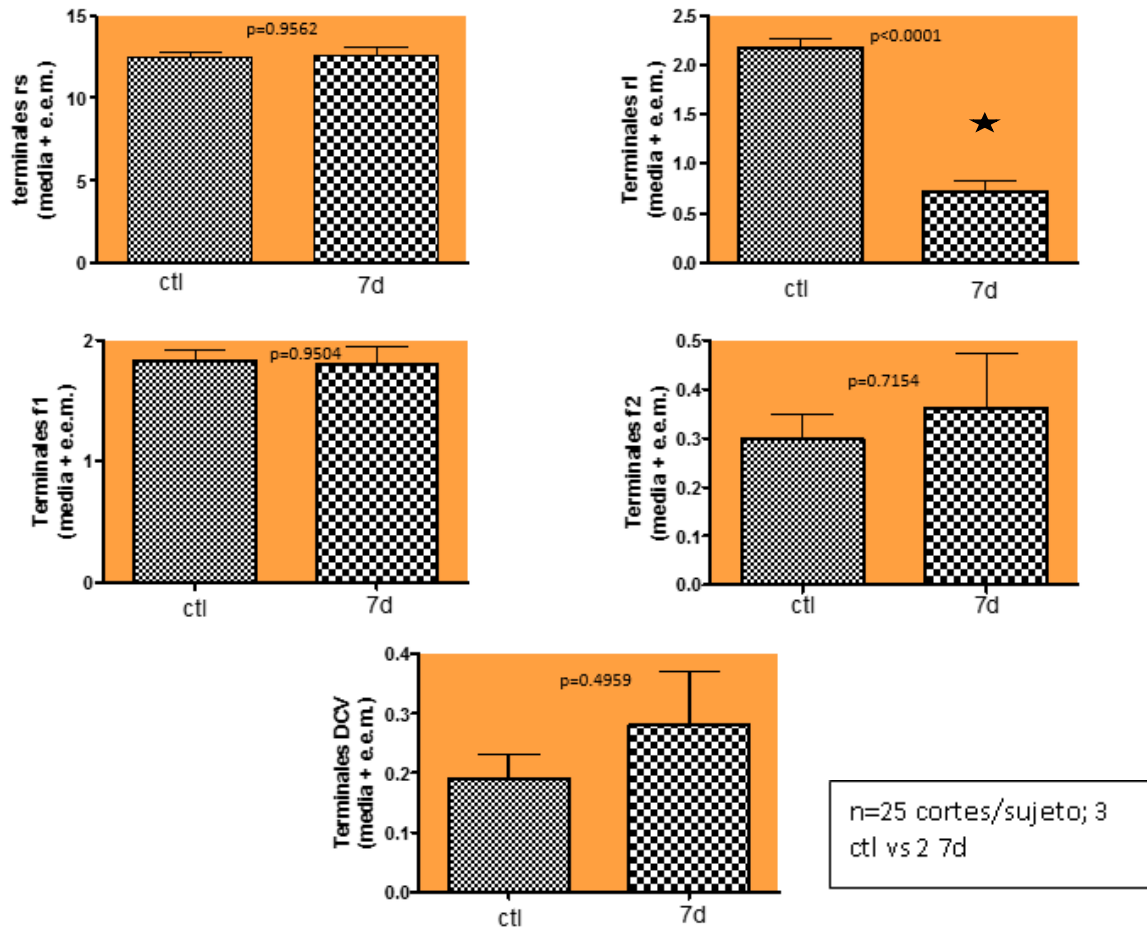
**Figura 17.** Figura demostrativa del proceso de cuantificación manual de perfiles sinápticos. A) Fotomicrografía del NGDL del animal control señalados en círculos se muestran perfiles RL (amarillo), RS (negro), F1 (naranja). B) Fotomicrografía del NGDL del animal lesionado. Se encuentran señalados los perfiles sinápticos con el mismo código al que se agregan los perfiles con datos de degeneración (blanco).



**Figura 18.** Frecuencia de perfiles sinápticos del NGDL. Se muestra la media y el error estándar de cada uno de los subtipos comparando el número de terminales sinápticas entre sujetos control. Se realiza test Kruskal-Wallis sin encontrar diferencias significativas entre las muestras, lo que permite considerar que el método de cuantificación es reproducible.

Posteriormente se utilizó la misma metodología para identificar y cuantificar los perfiles sinápticos en el NGDL del grupo experimental, 50 fotomicrografías del neuropilo de cada bloque a un aumento de 12,000x (12.6976  $\mu\text{m}^2$ ) por cada sujeto, incluyendo además la identificación de los perfiles sinápticos con evidencia estructural de degeneración (Peters et al., 1978). Finalmente esto permitió hacer una comparación entre los diferentes perfiles sinápticos de cada grupo, utilizando el total de terminales sinápticas para cada uno y sometiendo al análisis estadístico. Se hizo evidente una marcada diferencia entre las terminales rl (origen retineano) entre los grupos, con una

importante disminución en el animal lesionado, lo cual nos indicó la alta reproducibilidad del modelo y nos permitió continuar con las observaciones dirigidas a los PAP (Figura 19).



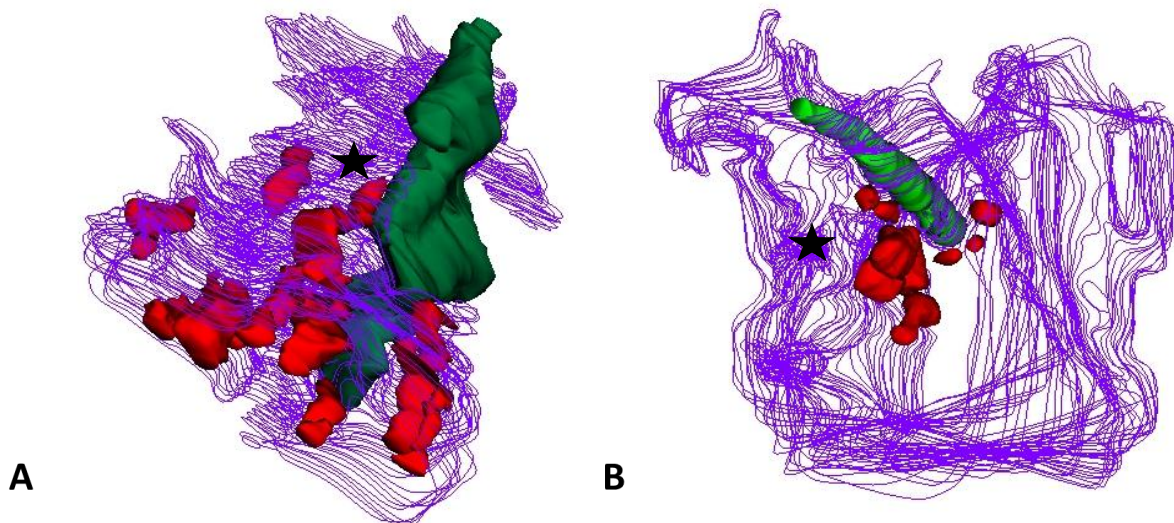
**Figura 19.** Comparación entre perfiles sinápticos del grupo control vs experimental. Se muestra la media y el error estándar de la media de cada uno de los tipos sinápticos mencionados anteriormente, comparando la cuantificación en el grupo control vs el grupo experimental (7d). Se determina con la prueba de Mann-Whitney que no existe una diferencia significativa entre las cuantificaciones a excepción del subtipo RL ( $p < 0.0001$ ), de origen retiniano.

### 8.3 Reconstrucción tridimensional del volumen lisosomal en PAP y volumetría.

Los modelos tridimensionales son una herramienta muy útil para el cálculo de volumen en estructuras observadas en el microscopio electrónico. Se eligieron procesos tanto

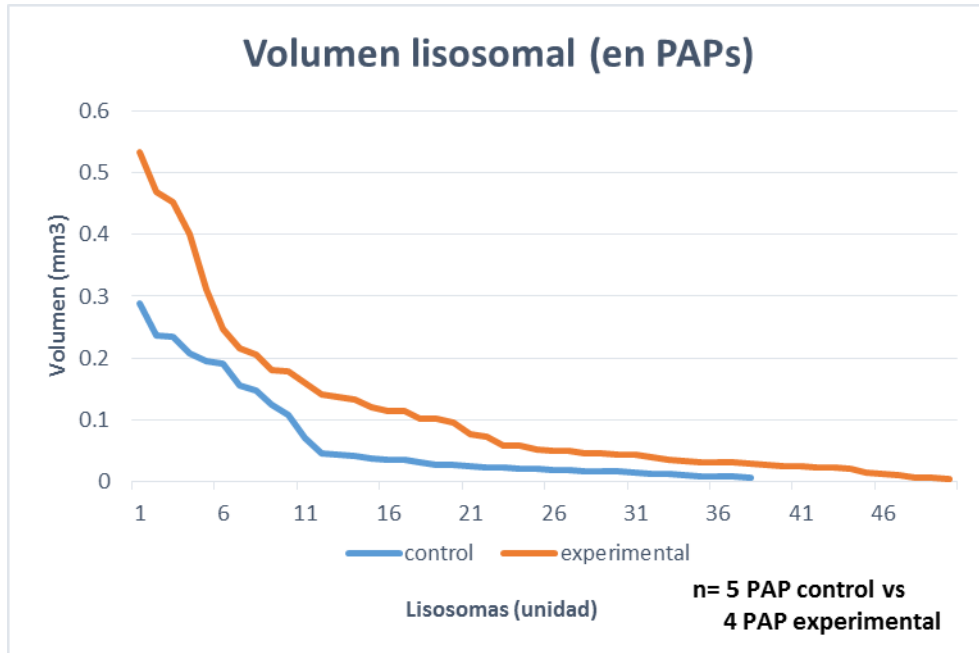


del grupo control como del experimental de acuerdo a sus características morfológicas (área conservada al menos a lo largo de 40 cortes), lisosomas (al menos 3 lisosomas diferentes bien definidos en 40 cortes) y al menos un sitio de interacción con mielina (PAP). Las fotomicrografías fueron tomadas a un aumento de 15,000x, alineadas y reconstruidas en volumen (Figura 20). Se determinó el volumen correspondiente al PAP y los lisosomas contenidos en cada uno de ellos. A continuación se muestra un ejemplo de PAP's en cada uno de los grupos.

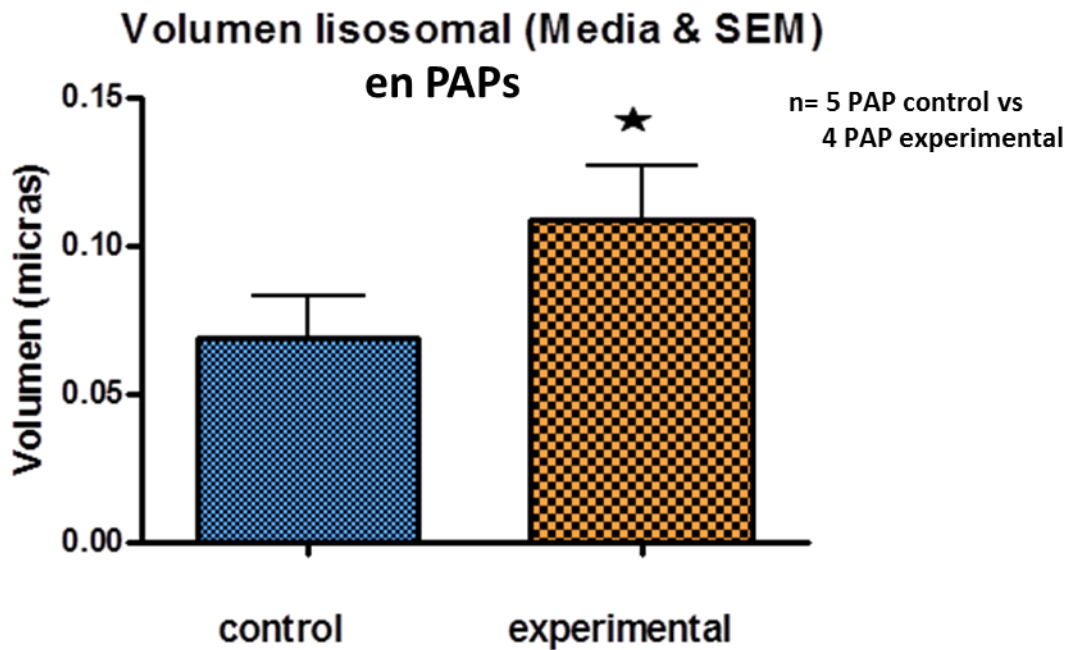


**Figura 20.** Reconstrucciones tridimensionales de 2 PAP. **A.** el PAP procedente del NGDL lesionado, **B.** El PAP procedente del NGDL control, el contorno de las membranas astrocíticas (morado) y los lisosomas en su interior (rojo) y el sitio de interacción entre los lisosomas y la vaina miélnica (estrella) que recubre un axón (verde). Puede observarse la notable diferencia entre la densidad, volumen y confluencia entre lisosomas de cada PAP.

Una vez reconstruida la membrana celular y los lisosomas de algunos PAP (5 PAP controles vs 4 PAP experimentales) se realizó el análisis estadístico de sus características volumétricas, para determinar si existían diferencias morfológicas entre los grupos. Se encontró un mayor volumen de la población lisosomal del grupo control frente al grupo experimental ( $p=0.0038$ ) (Figuras 21 y 22).



**Figura 21.** Volúmenes lisosomales. Gráfica que muestra la distribución del volumen de cada lisosoma de las poblaciones control vs experimental.



**Figura 22.** Comparación del volumen lisosomal. Gráfica que muestra la media y error estándar del volumen lisosomal por grupo, se realiza una U de Mann-Whitney para buscar diferencias entre los grupos. Finalmente se describió una diferencia significativa entre la población control y experimental ( $p < 0.0038$ ).

## 9. Discusión

### 9.1 Efecto de la deaferentación visual sobre la organización sináptica del NGDL.

Los resultados del proceso semi-cuantitativo realizado en el NGDL fueron concordantes con lo reportado en la literatura, tanto en el animal control como en el modelo experimental de degeneración axonal ortógrada. La distribución porcentual de las terminales sinápticas que describimos corresponde de manera consistente con la densidad reportada en estudios cuantitativos previos (Çavdar et al., 2011; Li et al., 2003). De especial importancia resulta encontrar consistencia en la cuantificación del subtipo RL, terminales de origen retiniano, para poder evaluar la densidad de la lesión producida. Los resultados de la cuantificación de las terminales RL fueron reproducibles en los animales control y a su vez concordantes con la bibliografía revisada (73% vs 78%) (Çavdar et al., 2011; Li et al., 2003). Esto permitió realizar una comparación con el mismo método de cuantificación en los animales lesionados. El resultado refleja una lesión de magnitud considerable resultando en una disminución significativa de la población de terminales RL, lo cual concuerda con descripciones hechas previamente en modelos de enucleación (Cullen & Kaiserman-Abramof, 1976) y en ausencia del factor de transcripción *Math 5* <sup>-/-</sup>, que elimina la aferencia retiniana (El-Danaf et al., 2015). Se encontró además la presencia de las terminales descritas con el perfil RLD (Vesículas redondas, terminales grandes y perfil mitocondrial denso) que han sido descritas como un fenómeno plástico consecuencia de la deaferentación visual, de probable origen cortical (El-Danaf et al., 2015)(Anexo 1).

### 9.2 Efecto de la deaferentación visual sobre el volumen lisosomal en PAP.

La deaferentación visual es un modelo eficiente para estimular la hipertrofia lisosomal en los PAPs de astrocitos en el NGDL. El objetivo principal del presente estudio consistió en indagar la participación de los PAPs en un modelo de degeneración anterógrada, propuesto como un sistema que estimularía los mecanismos de remodelación de mielina, sin causar una disrupción inmediata de la BHE. El aumento de volumen lisosomal en los astrocitos coincidió con la respuesta descrita previamente en células circulantes del sistema inmune ante un estímulo nocivo (Luzio et al., 2007). De



igual manera los datos obtenidos señalan un aumento significativo de volumen lisosomal al comparar nuestra población control con la portadora de la lesión.

Los datos obtenidos son compatibles con la hipótesis planteada en este trabajo consistente con la exocitosis lisosomal desde los PAPs en relación a la disrupción de la cubierta miélica y su posterior remodelación (Varela-Echevarría et al., 2017).

Este evento podría además conciliar ambas hipótesis propuestas para la remodelación de mielina, la propuesta por nuestro grupo en la que ocurre una remodelación in situ, con la mielínólisis llevada a cabo por el astrocito (Varela-Echevarría et al., 2017) y por otro lado la propuesta en la que señalan que las células de microglia solamente son capaces de fagocitar fragmentos previamente desprendidos de mielina (Hill et al., 2018; Safaiyan et al., 2016). En este último trabajo se describen cambios morfológicos en los segmentos internodales de manera previa a su desprendimiento en los que se aprecia una alteración en la compactación del segmento (Hill et al., 2018), estos cambios previos a un desprendimiento son similares a los cambios ultraestructurales que hemos descrito.

## 10. Bibliografía

- Achanta, L. B., & Rae, C. D. (2017).  $\beta$ -Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. *Neurochemical Research*, *42*(1), 35–49.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-016-2099-2>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R., & Haydon, P. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, *22*(5), 208–215.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
- Armstrong, R. C., Mierzwa, A. J., Sullivan, G. M., & Sanchez, M. A. (2016). Myelin and oligodendrocyte lineage cells in white matter pathology and plasticity after traumatic brain injury. *Neuropharmacology*, *110*, 654–659.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.029>
- Bartzokis, G. (2004). Age-related myelin breakdown: A developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *25*(1), 5–18.

- <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.03.001>
- Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, *14*(6), 724–738.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Black, J. A., & Waxman, S. G. (1988). The perinodal astrocyte. *Glia*, *1*(3), 169–183.  
<https://doi.org/10.1002/glia.440010302>
- Brodal, A. (1981). *Neurological anatomy in relation to clinical medicine. Third edition. New York, Oxford University Press, 1981. Annals of Neurology* (Vol. 10).  
<https://doi.org/10.1002/ana.410100629>
- Butt, A. M., & Ransom, B. R. (1993). Morphology of astrocytes and oligodendrocytes during development in the intact rat optic nerve. *Journal of Comparative Neurology*, *338*(1), 141–158. <https://doi.org/10.1002/cne.903380110>
- Calì, C., Baghabra, J., Boges, D. J., Holst, G. R., Kreshuk, A., Hamprecht, F. A., ... Magistretti, P. J. (2016). Three-dimensional immersive virtual reality for studying cellular compartments in 3D models from EM preparations of neural tissues. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(1), 23–38. <https://doi.org/10.1002/cne.23852>
- Çavdar, S., Hacıoğlu, H., Şirvanci, S., Keskinöz, E., & Onat, F. (2011). Synaptic organization of the rat thalamus: A quantitative study. *Neurological Sciences*, *32*(6), 1047–1056. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0606-4>
- Cekanaviciute, E., & Buckwalter, M. S. (2016). Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*, *13*(4), 685–701. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0477-8>
- Covelo, A., & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *ELife*, *7*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.32237>
- Cox, C. L. (2014). Complex regulation of dendritic transmitter release from thalamic interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, *29*, 126–132.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.07.004>
- Cullen, M. J., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1976). Cytological organization of the dorsal lateral geniculate nuclei in mutant anophthalmic and postnatally enucleated mice. *Journal of Neurocytology*, *5*(4), 407–424. <https://doi.org/10.1007/BF01181648>
- Domingues, H. S., Portugal, C. C., Socodato, R., & Relvas, J. B. (2016). Corrigendum:

- Oligodendrocyte, Astrocyte and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00079>
- Dou, Y., Wu, H. J., Li, H. Q., Qin, S., Wang, Y. E., Li, J., ... Duan, S. (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Research*, 22(6), 1022–1033. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.10>
- El-Danaf, R. N., Krahe, T. E., Dilger, E. K., Bickford, M. E., Fox, M. A., & Guido, W. (2015). Developmental remodeling of relay cells in the dorsal lateral geniculate nucleus in the absence of retinal input. *Neural Development*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13064-015-0046-6>
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 31(4), 497–511. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>
- Famiglietti, E. V., & Peters, A. (1972). The synaptic glomerulus and the intrinsic neuron in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 144(3), 285–333. <https://doi.org/10.1002/cne.901440304>
- Glees, P., Meyer, A., & Meyer, M. (1946). Terminal degeneration in the frontal cortex of.
- Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2009). Tripartite synapses: Roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology*, 57(4), 343–346. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.031>
- Harada, K., Kamiya, T., & Tsuboi, T. (2016). Gliotransmitter release from astrocytes: Functional, developmental, and pathological implications in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00499>
- Harlow, D. E., Honce, J. M., & Miravalle, A. A. (2015). Remyelination therapy in multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 6(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00257>
- Hill, R. A., Li, A. M., & Grutzendler, J. (2018). Lifelong cortical myelin plasticity and age-related degeneration in the live mammalian brain. *Nature Neuroscience*, 21(5), 683–695. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0120-6>
- Jahn, O., Tenzer, S., & Werner, H. B. (2009). Myelin proteomics: Molecular anatomy of

- an insulating sheath. *Molecular Neurobiology*, 40(1), 55–72.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-009-8071-2>
- Jones, E. G. (2007). Neuroanatomy: Cajal and after Cajal. *Brain Research Reviews*, 55(2 SPEC. ISS.), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.001>
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends in Neurosciences*, 31(12), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.003>
- Larriva-Sahd, J. (2008). The accessory olfactory bulb in the adult rat: A cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *The Journal of Comparative Neurology*, 510(3), 309–350.  
<https://doi.org/10.1002/cne.21790>
- Larriva-Sahd, J., Orozco-Estévez, H., & Condés-Lara, M. (1998). Perinatal administration of testosterone induces hypertrophy of the anterior commissure in adult male and female rats. *Neuroscience Letters*, 241(2–3), 119–122.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00043-3)
- Larriva-Sahd, J., Rondán-Zárata, A., & Ramírez-Degollado, M. (1995). Sexually dimorphic contribution from the fornix to the ventromedial hypothalamic nucleus: a quantitative electron microscopic study. *Neuroscience Letters*, 200(3), 147–150.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12129-R](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12129-R)
- Larriva-Sahd, J., Rondán, A., Orozco-Estévez, H., & Sánchez-Robles, M. (1993). Evidence of a direct projection of the vomeronasal organ to the medial preoptic nucleus and hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 163(1), 45–49.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90225-A](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90225-A)
- Li, J., Wang, S., & Bickford, M. E. (2003). Comparison of the ultrastructure of cortical and retinal terminals in the rat dorsal lateral geniculate and lateral posterior nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 460(3), 394–409.  
<https://doi.org/10.1002/cne.10646>
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A. (2007). Lysosomes: Fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 622–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2217>
- Marcellino, D., Frankowska, M., Agnati, L., Perez de la Mora, M., Vargas-Barroso, V., Fuxe, K., & Larriva-Sahd, J. (2012). Intercalated and paracapsular cell islands of the adult rat amygdala: A combined rapid-Golgi, ultrastructural, and

- immunohistochemical account. *Neuroscience*, 226, 324–347.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.067>
- Marchi, V. (1886). *Sulle degenerazioni discendenti consecutive a lesioni sperimentali in diverse zone della corteccia cerebrale: Dei Vittorio Marchi e Giovanni Algeri*. Stefano Calderini e Figlio.
- Mills, E. A., Davis, C. O., Bushong, E. A., Boassa, D., Kim, K.-Y., Ellisman, M. H., & Marsh-Armstrong, N. (2015). Astrocytes phagocytose focal dystrophies from shortening myelin segments in the optic nerve of *Xenopus laevis* at metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10509–10514.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1506486112>
- Nave, K.-A., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 503–533.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
- Nualart-Marti, A., Solsona, C., & Fields, R. D. (2013). Gap junction communication in myelinating glia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(1), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.024>
- Padamsey, Z., McGuinness, L., Bardo, S. J., Reinhart, M., Tong, R., Hedegaard, A., ... Emptage, N. J. (2017). Activity-Dependent Exocytosis of Lysosomes Regulates the Structural Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, 93(1), 132–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.013>
- Peters, A., Palay, S., & Webster, H. (1978). *The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1976. *Annals of Neurology*, 4(6), 588–588. <https://doi.org/10.1002/ana.410040660>
- Safaiyan, S., Kannaiyan, N., Snaidero, N., Brioschi, S., Biber, K., Yona, S., ... Simons, M. (2016). Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nature Neuroscience*, 19(8), 995–998.  
<https://doi.org/10.1038/nn.4325>
- Sarikcioglu, L. (2007). Johann Bernhard Aloys von Gudden: an outstanding scientist. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 78(2), 195.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.106633>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ...

- Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676.
- Smeets, J. S. J., Horstman, A. M. H., Schijns, O. E. M. G., Dings, J. T. A., Hoogland, G., Gijzen, A. P., ... Van Loon, L. J. C. (2018). Brain tissue plasticity: Protein synthesis rates of the human brain. *Brain*, 141(4), 1122–1129.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awy015>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Strich, S. J. (1968). Notes on the Marchi method for staining degenerating myelin in the peripheral and central nervous system. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 31(2), 110–114. <https://doi.org/10.1136/jnnp.31.2.110>
- Szentágothai, J., Hátori, J., & Tömböl, T. (1966). Degeneration and electron microscope analysis of the synaptic glomeruli in the lateral geniculate body. *Experimental Brain Research*, 2(4), 283–301. <https://doi.org/10.1007/BF00234775>
- Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., & Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(April), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00045>
- Uchizono, K. (1975). *Excitation and Inhibition: Synaptic Morphology*. Elsevier Science.
- Varela-Echevarría, A., Vargas-Barroso, V., Lozano-Flores, C., & Larriva-Sahd, J. (2017). Is There Evidence for Myelin Modeling by Astrocytes in the Normal Adult Brain? *Frontiers in Neuroanatomy*, 11(September), 1–23.  
<https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00075>
- Vargas-Barroso, V., & Larriva-Sahd, J. (2013). A Cytological and Experimental Study of the Neuropil and Primary Olfactory Afferences to the Piriform Cortex. *The Anatomical Record*, 296(9), 1297–1316. <https://doi.org/10.1002/ar.22753>
- Vaughan, D. W., & Peters, A. (1974). Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: An electron microscope study. *Journal of Neurocytology*, 3(4), 405–429. <https://doi.org/10.1007/BF01098730>
- Verkhratsky, A., Matteoli, M., Parpura, V., Mothet, J.-P., & Zorec, R. (2016). Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular

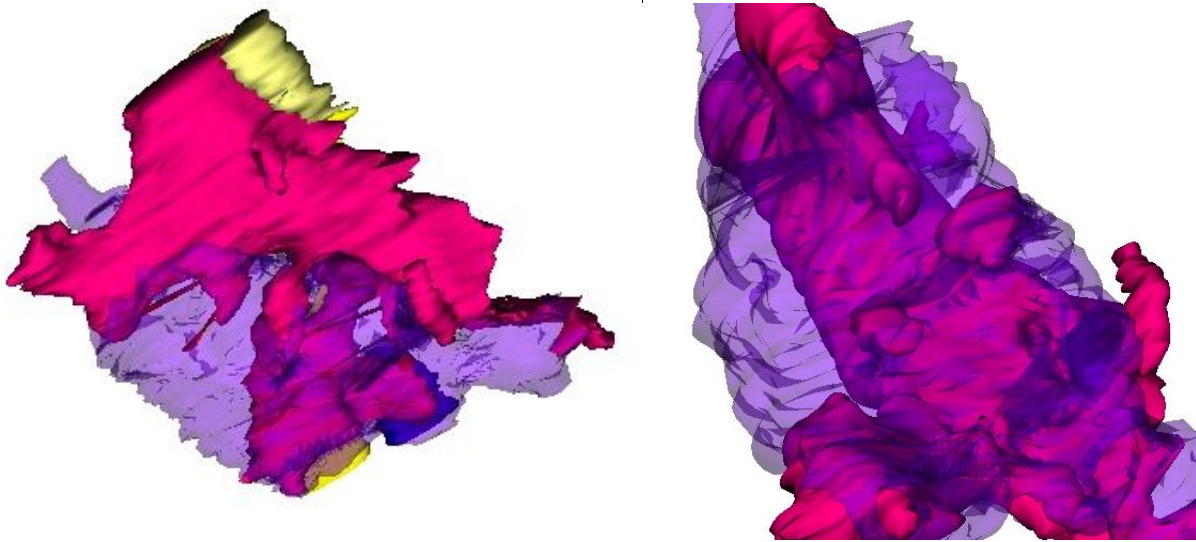
- secretion. *The EMBO Journal*, 35(3), 239–257.  
<https://doi.org/10.15252/emj.201592705>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Wolosker, H., Balu, D. T., & Coyle, J. T. (2016). The Rise and Fall of the D-Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 39(11), 712–721. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.007>
- Yao, Y., Chen, Z.-L., Norris, E. H., & Strickland, S. (2014). Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nature Communications*, 5(1), 3413. <https://doi.org/10.1038/ncomms4413>
- Yeung, M. S. Y., Zdunek, S., Bergmann, O., Bernard, S., Salehpour, M., Alkass, K., ... Frisén, J. (2014). Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell*, 159(4), 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.011>
- Yoon, B.-E., & Lee, C. J. (2014). GABA as a rising gliotransmitter. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(3), 8–12. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00141>
- Young, K. M., Psachoulia, K., Tripathi, R. B., Dunn, S. J., Cossell, L., Attwell, D., ... Richardson, W. D. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: Evidence for myelin remodeling. *Neuron*, 77(5), 873–885. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.006>
- Zalc, B. (2016). The acquisition of myelin: An evolutionary perspective. *Brain Research*, 1641, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.005>
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., ... Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nature Cell Biology*, 9(8), 945–953. <https://doi.org/10.1038/ncb1620>

## Lista de figuras y tablas

Figura 1. Axón mielínico.....	2
Figura 2. Ultraestructura del neuropilo.....	4
Figura 3. Botón sináptico fagocitado.....	5
Figura 4. Organelos secretorios del astrocito.....	8
Figura 5. Modelos de lesión neural.....	10
Figura 6. Botón sináptico con cambios degenerativos.....	11
Figura 7. Ultraestructura de los PAPs.....	14
Figura 8. Elementos de los PAPs.....	14
Figura 9. Exocitosis lisosomal y cambios en la mielina.....	15
Figura 10. Triada sináptica.....	18
Figura 11. Vía visual de la rata.....	21
Figura 12. Esquema del dispositivo de lesión.....	21
Figura 13. Muestreo del NGDL.....	22
Figura 14. Proceso de corte seriado para microscopía electrónica.....	23
Figura 15. Glomérulo del NGDL.....	24
Figura 16. Glomérulo del NGDL.....	25
Figura 17. Figura demostrativa del proceso de cuantificación manual de perfiles sinápticos.....	27
Figura 18. Frecuencia de perfiles sinápticos del NGDL.....	28
Figura 19. Comparación entre perfiles sinápticos del grupo control vs experimental....	29
Figura 20. Reconstrucciones tridimensionales de 2 PAP.....	30
Figura 21. Volúmenes lisosomales.....	31
Figura 22. Comparación del volumen lisosomal.....	31
Tabla 1. Resumen de perfiles sinápticos y sus características.....	17
Anexo 1. Reconstrucción tridimensional de un botón sináptico con perfil RLD.....	41



## Anexo 1



**Anexo 1.** Reconstrucción tridimensional de un botón sináptico con perfil RLD (botón gigante, con vesículas redondas y perfiles mitocondriales oscuros). Izquierdo. Terminal gigante (morado) haciendo contacto sobre múltiples espinas dendríticas de la misma dendrita (magenta). Se muestran también algunos botones sinápticos con datos de degeneración contactando las mismas dendritas (amarillo). Derecho. Acercamiento en el que se observa la distribución de las espinas dendríticas envueltas por la terminal sináptica.