

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

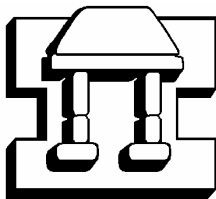
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**MODULACION DEL BDNF (BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR) EN LA EXCITABILIDAD NEURONAL ESTRIATAL EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**B I Ó L O G A**  
P R E S E N T A:  
**ANGÉLICA EDITH RUELAS CALLEJAS**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY**



**IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2008**



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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurofisiología del Desarrollo y Neurodegeneración (L-6) UBIMED, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El cual fue financiado con el proyecto de CONACYT 42598 y con el apoyo de una beca de tesis del proyecto PAPIIT IN201307-2006.

Sinodales:

Dra. Bertha Segura Alegría

Dra. Laura Colín Barenque

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

Biol. Héctor Barrera Escorcía

“Me lo contaron y lo olvidé,  
lo ví y lo entendí,  
lo hice y lo aprendí.”  
**Confucio**

“Lo más incomprensible del Universo,  
es que sea comprensible.”  
**Albert Einstein**

## AGRADECIMIENTOS

A la **UNAM** por haberme dado un lugar en su espacio, y porque en ella encontré muy buenos amigos. Ya soy un espíritu más que pertenece a tu Raza.

A la **FES-I** por brindarme un espacio en sus aulas y jardines, me dio conocimiento y horas amenas.

A **mis padres** por haberme dado todo su amor, apoyo y cariño para poder llegar hasta aquí.

A los profesores que realizaron la revisión y evaluación de esta Tesis:

A mi tutora de tesis **A. Elizabeth Hernández Echeagaray**, por permitirme llevar a cabo este trabajo en el laboratorio, por la paciencia y las dudas resueltas.

A la **Dra. Ember**, por los prácticos consejos, las correcciones y porque en algún momento de mi vida académica me permitió formar parte de su equipo de trabajo en el L-2 de la UBIMED.

A las **Dras. Bertha Segura, Laura Colín**, y al **Biol. Héctor Barrera**, por aceptar formar parte de mis sinodales, y se tomaron el tiempo para realizar las revisiones y correcciones al presente trabajo.

A mis compañeros del L-6, **Erika, Neto, Jorge**, por la ayuda en los experimentos, las dudas solucionadas, y sobre todo por hacer más divertida mi estancia en el laboratorio.

## DEDICATORIAS

A mis padres; **Hipolita y Leonardo**: por ustedes estoy aquí, sin ustedes no lo hubiera logrado. Estoy muy orgullosa de ustedes; espero que también lo estén de mí. Los amo, siempre los llevaré en mi corazón.

A mis hermanos **Isabel Cecilia y Julio Enrique**, por los buenos momentos, las risas, los empujones y sus muy diversas y particulares muestras de cariño. Yo también los amo!

A **José David**, porque en ti encontré un gran amigo, por esperarme en los días de experimentación, apoyarme y compartir todo momento. Gracias a ti mis agujetas siempre estuvieron bien amarradas. Te quiero!

A **Tula, Tonanzin, Pamela, Arturo, Christopher, Iván, Paco, Nahum, Ismael y Daniel**, por acompañarme en una de mis primeras etapas en la UNAM, y más aún por seguir conmigo. Gracias por todos estos años de amistad.

A **July, Paloma, Rosa, Auriz, Guadalupe, Gaby, Betty, Karina, Octavio, Abdías, Freddy, Carlos, Valerio, Erick, César**, por el tiempo compartido, las risas, las lágrimas, prácticas de campo, las clases amenas y las horas de “sesión”. Gracias por la amistad y el apoyo.

A mis primos **Chely y Miguel**, por brindarme hospedaje, su compañía y recorridos turísticos en mis días de viaje.

A mi amigo y profesor **Ángel Durán**, por los consejos, los jalones de orejas, las clases y los desayunos amenos.

A los profesores **Margarita Canales, Tzasná Hdz., Ma. Elena Huidobro, José Luis Gama**, por el apoyo brindado a lo largo de la carrera.

A los que ya no están y me enseñaron que: Siempre es bueno guardar una camisa planchada por la persona que se nos fue. Que los cambios siempre llegan aunque no nos gusten. Que tocar la guitarra es más que el rasgueo de las cuerdas. Que siempre es bueno saludar a todo el mundo. A todos ellos, siempre estarán en mi corazón.

A todos los que me acompañaron en la carrera y forman ya parte de mi vida, los que han estado y seguirán conmigo alcanzando mas sueños y anhelos.

A todos: muchísimas Gracias!!



## ÍNDICE GENERAL

<b>Índice de figuras</b> .....	ii
<b>Índice de tablas</b> .....	iii
<b>Abreviaturas</b> .....	iv
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
<b>Justificación</b> .....	8
<b>Hipótesis</b> .....	8
<b>Objetivos</b> .....	9
<b>Material y método</b> .....	10
<b>Resultados</b> .....	14
<b>Discusión</b> .....	29
<b>Conclusiones</b> .....	33
<b>Apéndice I</b>	
Los Ganglios Basales.....	34
<b>Apéndice II</b>	
Análisis estadístico.....	42
<b>Referencias</b> .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Respuesta poblacional estable.....	14
<b>Figura 2.</b> Modulación sináptica del BDNF.....	16
<b>Figura 3.</b> Respuesta poblacional encendida.....	17
<b>Figura 4.</b> Disminución en la amplitud de la respuesta poblacional.....	18
<b>Figura 5.</b> Facilitación (FPP) en condiciones normales.....	20
<b>Figura 6.</b> Modulación sináptica del BDNF en ratones tratados con 3NP.....	22
<b>Figura 7.</b> Facilitación (FPP) en condiciones experimentales.....	24
<b>Figura 8.</b> Comparación de respuestas sinápticas en condiciones normales y en presencia de 3NP, con efecto.....	25
<b>Figura 9.</b> Comparación de FPP en condiciones control y en presencia de 3NP.....	26
<b>Figura 10.</b> Comparación de respuestas sinápticas en condiciones normales y en presencia de 3NP, sin efecto.....	28
<b>Figura 11.</b> Conexiones de los Ganglios Basales.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores de FPP (Facilitación) en condiciones normales.....	20
<b>Tabla 2.</b> Valores de FPP (Facilitación) en presencia de 3np.....	23

## ABREVIATURAS

<b>3-NP:</b>	Ácido 3 Nitropropiónico
<b>AMPA:</b>	Alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid
<b>BDNF:</b>	Brain-Derived Neurotrophic Factor
<b>DAG:</b>	Diacilglicerol
<b>EPSCs:</b>	Excitatory Postsynaptic Currents
<b>FPP:</b>	Facilitación por Pulso Pareado
<b>GABA:</b>	Gamma-aminobutyric acid
<b>GB:</b>	Ganglios Basales
<b>Gpe:</b>	Globo pálido externo
<b>Gpi:</b>	Globo pálido interno
<b>GPL:</b>	Globo pálido lateral
<b>GPM:</b>	Globo pálido medial
<b>HD:</b>	Huntington's Disease (en español: Enfermedad de Huntington).
<b>htt:</b>	huntingtina
<b>IP<sub>3</sub>:</b>	Inositol Trifosfato
<b>NE:</b>	Neostriado
<b>NEM:</b>	Neurona Espinosa Mediana
<b>NGF:</b>	Nerve Growth Factor
<b>NMDA:</b>	N-methyl-D-aspartic acid
<b>NT-3:</b>	Neurotrophin 3
<b>NT- 4/5:</b>	Neurotrophin 4/5
<b>PIP<sub>2</sub>:</b>	Fosfatidil Inositol

<b>PLC:</b>	Fosfolipasa C
<b>SDH:</b>	Succinato deshidrogenasa
<b>SNc:</b>	Sustancia nigra compacta
<b>SNr:</b>	Sustancia nigra reticulata
<b>STN:</b>	Núcleo subtálmico
<b>Trk:</b>	Tirosina Kinasa
<b>TrkA:</b>	Tirosina Kinasa A
<b>TrkB:</b>	Tirosina Kinasa B
<b>TrkC:</b>	Tirosina kinasa C
<b>TTX:</b>	Tetrodotoxin
<b>VTA:</b>	Área ventral segmental

## Resumen

Los factores neurotróficos modulan la transmisión sináptica en los circuitos neuronales. Se ha mostrado que las conexiones sinápticas se pierden si existe una falta en la expresión de las neurotrofinas en el sistema nervioso en desarrollo y en la edad adulta. Así, en diversas enfermedades neurodegenerativas se ha sugerido que existe una pérdida de factores tróficos, particularmente de neurotrofinas. En particular, se ha demostrado que la degeneración de las células de proyección del núcleo estriado que se observa en la enfermedad de Huntington (HD) se debe, en parte, a un decremento en la síntesis de BDNF.

En este trabajo, estudiamos la modulación que ejercen la neurotrofina BDNF en las sinapsis glutamatérgicas corticoestriatales en condiciones normales y usando un modelo farmacológico de la Enfermedad de Huntington. El cual consiste en la administración intraperitoneal de ácido 3 nitropropiónico (3-NP); el cual es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa (SDH). La administración de esta toxina mitocondrial es suficiente para reproducir algunas de las alteraciones patofisiológicas de la HD y ha servido para dilucidar algunos mecanismos celulares que subyacen a dicha patología.

Para evaluar los cambios en la actividad eléctrica, usamos la técnica de registro de campo en rebanadas estriatales provenientes de ratones C57/BL6, en estas, las entradas corticoestriatales se estimularon con un electrodo bipolar situado en el cuerpo calloso y la respuesta poblacional se registró en el núcleo estriado.

Nuestros resultados muestran un incremento en la amplitud de la espiga poblacional en presencia del factor trófico BDNF en condiciones normales y en ratones tratados con 3-NP; el cual puede estar ocurriendo a través de dos mecanismos: un aumento en la liberación en el neurotransmisor, o un aumento en la sensibilidad postsináptica a este.

## Introducción

El núcleo estriado pertenece a un grupo de núcleos subcorticales llamados ganglios basales (GB), los cuales están interconectados y relacionados con el control de las funciones motoras como la planificación, iniciación y ejecución del movimiento (Bargas, *et. al.*, 1998). Ver Apéndice I.

El estriado, es la vía de entrada a los GB, recibe proyecciones de la corteza motora, sensorial y límbica. Estas aferencias son de naturaleza glutamatérgica y establecen contactos sinápticos con las Neuronas Espinosas Medianas (NEMs) de proyección que son de tipo GABAérgico. Estas células forman el 95% de la población del estriado. El otro 5% de la población de este núcleo está formado por interneuronas de naturaleza GABAérgica y colinérgica (Brodal, 1992; Kawaguchi, *et. al.* 1995).

Los axones de las NEMs que salen del núcleo hacia el globo pálido interno (GPi) conforman la vía directa, mientras que los axones que proyectan hacia el globo pálido externo (GPe), conforman la vía indirecta.

La neurodegeneración de los GB está relacionado con enfermedades tales como el Parkinson, el síndrome de Tourett, las discinesias, y la corea de Huntington, todas ellas ocasionan la alteración de los movimientos voluntarios (revisado en Mendoza, 2001).

La Enfermedad de Huntington (HD, por sus siglas en inglés “Huntington Disease”) es un desorden neurodegenerativo progresivo, incapacitante, heredable, caracterizado por la presencia de movimientos incesantes y rápidos (coreas) y demencia. La magnitud de la degeneración neuronal conduce a la muerte del paciente. De 4 a 10 personas de cada 100,000 son afectadas por la HD, y en la mayoría de los pacientes se manifiesta hacia la tercera o cuarta década de la vida (Hernández-Echeagaray, 2004; Leewater-Kim y J. Cha, 2004).

Los pacientes con HD presentan una mutación en el exón 1 del gene IT15 (*Hd*). Éste codifica para una proteína de 348 kDa llamada huntingtina (*htt*); que en la mutación presenta una expansión de tripletes CAG (Citosina-Adenina-Guanina) que codifican para el aminoácido Glutamina (Brouillet, *et al*, 1999). En la población normal, el número de repeticiones de CAG varía entre 6 y 35; en contraste, los individuos afectados por la HD poseen un número elevado, de 40 a 121 repeticiones. Cuando aumenta el número de repeticiones de CAG en el gene *Hd* aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad a edad más temprana, la sintomatología será más severa y más corta la esperanza de vida.

En la histopatología de la HD se observa que hay una pérdida selectiva de poblaciones neuronales, tales como las neuronas estriatales y neuronas corticales (Alberch *et. al.* 2004). En especial, la degeneración de las NEMs de la vía indirecta (estriato-palidales) está relacionada con el desarrollo de la enfermedad de Huntington (Fusco, *et. al.*, 2003; Leegwater-Kim y J. Cha, 2004). Una de las causas de la degeneración de las neuronas espinosas medianas parece deberse a la pérdida de factores tróficos, que participan en el mantenimiento de éstas células (Gauthier, *et. al.*, 2004).

#### *Factores neurotróficos.*

Los factores neurotróficos, tienen una función clave durante el desarrollo, son sustancias naturales promotoras de la sobrevivencia de poblaciones neuronales, estimulan su diferenciación morfológica, y regulan la expresión neuronal (Alberch *op. cit*, 2004), en edad adulta, mantienen la función neuronal y el fenotipo. Así las neuronas dependen de la disponibilidad de alguna cantidad mínima de factores tróficos para su sobrevivencia y para la persistencia de sus conexiones sinápticas. El tejido blanco sintetiza y pone a disposición de las neuronas en desarrollo cantidades limitadas de los factores tróficos apropiados (revisado en Kandel, *et. al.*, 1997).



Durante el transcurso normal de la ontogenia existe la muerte de numerosas neuronas. Esta ocurre mediante la muerte celular programada, la cual depende de la transcripción activa de un conjunto de genes específicos que cuando se “encienden” hacen que las neuronas u otras células degeneren (revisado en Purves, *et. al.* 1997). En el desarrollo los factores tróficos tienen un papel en la supervivencia neuronal y pueden actuar suprimiendo un programa de muerte celular en las células posmitóticas, las neuronas con privación trófica degeneran y mueren a través de un proceso denominado apoptosis (Kandel, *et. al.*, 1997). Sin embargo en el tejido adulto mantienen el funcionamiento y la sobrevivencia de las células y modulan su actividad sináptica (Poo, M., 2001).

Las Neurotrofinas son un tipo de factores tróficos que se encuentran distribuidos principalmente en el Sistema Nervioso. En la actualidad existen cuatro miembros caracterizados de la familia de las neurotrofinas: el NGF (nerve growth factor), BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (neurotrophin-3), y NT-4/5. Cada uno de los factores tróficos actúa sobre su receptor modulando así la actividad sináptica. Las neurotrofinas poseen alta afinidad a 4 tipos de receptores Trk (receptores tirosina Kinasa): NGF que es afín por TrkA, BDNF y NT-4/5 que son afines por TrkB, NT-3 que es afín por TrkC. Existe otro receptor de baja afinidad llamado p75 al cual son afines todas las neurotrofinas cuyo papel es de tipo regulador (Leßmann, *et al*, 1998a).

Se sabe que el BDNF controla el crecimiento, desarrollo, diferenciación y mantenimiento del Sistema Neuronal, así como la plasticidad y la actividad sináptica (Chao, 2003; Binder y Scharfman, 2004; Zuccato y Cattaneo, 2007) También se ha mostrado que el BDNF mantiene la sobrevivencia de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado (Zuccato, *et. al.* 2001). El BDNF es sintetizado en las células piramidales de la corteza cerebral y liberado en el estriado (Fusco, *et. al.*, 2003).

El BDNF y la proteína huntingtina (htt) están presentes tanto en la corteza como en el estriado. En estudios recientes se ha mostrado que la proteína htt

juega un papel en la producción de BDNF, se ha visto que en el 99% de las neuronas piramidales de la corteza contienen huntingtina y BDNF, y en el estriado ambas se expresan en 75% de la población neuronal (Fusco *op. cit.*, 2003). La huntingtina poliglutaminada es reconocida por enzimas proteolíticas que la cortan y sus residuos pueden actuar en el núcleo o citoplasma de las células corticales que proyectan al estriado reduciendo la transcripción de BDNF al mismo tiempo que alteran la liberación de neurotransmisor en esas células. Se ha sugerido que este efecto incrementa la susceptibilidad de las NEMs a la excitotoxicidad y por tanto a la degeneración neuronal (Fusco et al., 2003; Baquet, *et. al.*, 2004).

#### *Manipulaciones experimentales que demuestran la participación del BDNF en el funcionamiento estriatal.*

Se han realizado estudios con BDNF en donde se manipularon los niveles de este y de la NT-4/5 en el hipocampo y neocorteza de ratones, observando que se produce un aumento en la transmisión sináptica glutamatérgica cuando aumenta la concentración de BDNF en las células piramidales (Leßmann, Heumann, 1998b).

Estudios asociados con la enfermedad de Huntington, destacan los realizados por Zuccato, y cols. (2001) en donde describen que el gene mutado transcribe una huntingtina de 350kDa, que altera la transcripción y los niveles de BDNF en las neuronas corticales. Esto provoca una disminución del factor trófico en el estriado lo que conlleva a la pérdida de las células espinosas medianas en este núcleo. Ellos concluyen que el BDNF es importante y modula la sobrevivencia neuronal del núcleo estriado.

En 2003 Fusco y cols., realizaron un estudio de la localización de BDNF en el cerebro de ratones normales y con lesión de ácido-quinolínico, registrando que los niveles de BDNF disminuyen en los animales tratados con el ácido quinolínico lo que produjo excitotoxicidad en las neuronas estriatales.

Baquet y cols., (2004) mostraron que con la edad el volumen estriatal y de la corteza disminuye en modelos HD (Emx-BDNF<sup>KO</sup>), además hay disminución en el número de neuronas estriatales en comparación con modelos silvestres. Canals y cols., en el mismo año examinaron si el número de repeticiones y niveles de la huntingtina mutada (htt<sup>m</sup>) afectan la producción de BDNF, mostrando que la baja regulación de BDNF por la huntingtina poliglutaminada depende de la longitud y niveles de expresión de las repeticiones CAG.

Carmignoto y cols. en 1997 realizaron un trabajo con neuronas de la corteza visual de ratas en el que observaron el efecto del BDNF sobre la transmisión sináptica. Utilizaron dos concentraciones (50 y 100 ng/ml) para ambas se observó un incremento en la amplitud de las corrientes excitatorias evocadas (EPSCs).

Se sabe que los factores tróficos modulan la transmisión sináptica en los circuitos neuronales. Por ejemplo la neurotrofina BDNF modula la transmisión sináptica en hipocampo y corteza visual (ya antes mencionado). No existen trabajos en los que se evalúe la modulación que ejerce ésta neurotrofina en la población neuronal del estriado; por lo que en este trabajo se evaluó la modulación de las sinápsis glutamatérgicas corticoestriatales en rebanadas de cerebro provenientes de ratones normales.

#### *Modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington.*

Existe un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington (HD) el cual consiste en la administración intraperitoneal de ácido 3 nitropropiónico (3-NP). El 3-NP es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa (SDH). La actividad de la SDH está ubicada en el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. La administración de esta toxina mitocondrial es suficiente para reproducir algunas de las alteraciones patofisiológicas de la HD y ha servido para dilucidar algunos mecanismos celulares de dicha patología (Beal, *et. al.*, 1993; Fu, *et. al.*, 1994; Wüllner, *et. al.*, 1994; Saulle, *et. al.*, 2004).

El 3-NP es una toxina que se encuentra en *Indigofera endecaphylla* Jacq. (Coles, *et.al.*, 1978), cuando es consumida accidentalmente por animales o humanos estos presentan necrosis bilateral en el putamen, distonia como las observadas en pacientes con HD. Esta toxina es un inhibidor irreversible de la deshidrogenasa succínica que inhibe tanto al ciclo de Krebs como al complejo II mitocondrial de la cadena respiratoria (Ludolph *et. al.* 1991).

Estudios neuropatológicos indican que el estriado es el sitio del cerebro más vulnerable en ratas y ratones intoxicados con el 3-NP. Otros cambios neuropatológicos observados después de la administración crónica de la toxina después de un mes, son la hipoxia y/o isquemia (Beal, *et. al.*, 1995). La administración crónica de esta toxina muestra cambios en el crecimiento dendrítico de las NEMs, similares a los observados en la enfermedad de Huntington (Beal, *et. al.*, 1993). La muerte estriatal por el 3-NP ha sido atribuida al aumento de la excitotoxicidad provocada por una deficiencia de ATP, y aumento en la producción de radicales libres (revisado en Nishino, *et. al.*, 1997)

Ya que en este modelo la población neuronal del estriado es más susceptible a la toxina 3-NP y reproduce la patología observada en la HD se utilizó para evaluar la modulación glutamatérgica corticoestriatal por el BDNF en ratones tratados con el 3-NP.

## **Justificación**

Se sabe que los factores tróficos modulan la transmisión sináptica en los circuitos neuronales. Por ejemplo la neurotrofina BDNF modula la transmisión sináptica en hipocampo y corteza visual (ya antes mencionado). No existen trabajos en los que se evalúe la modulación que ejerce ésta neurotrofina en la población neuronal del estriado; por lo que en este trabajo se evaluó la modulación de las sinápsis glutamatérgicas corticoestriatales en rebanadas de cerebro provenientes de ratones normales. En el modelo farmacológico de la Enfermedad de Huntington la población neuronal del estriado es más susceptible a la toxina 3-NP y reproduce la patología observada en la HD, por lo que se utilizó para evaluar la modulación glutamatérgica corticoestriatal por el BDNF en ratones tratados con el 3-NP.

## **Hipótesis**

Conociendo que existen alteraciones en la población neuronal del estriado debido a la administración de la toxina 3-NP, es posible que exista una disminución en la respuesta sináptica poblacional comparada con la respuesta poblacional de las rebanadas de cerebro provenientes de ratones normales.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

- Analizar el efecto del BDNF sobre la excitabilidad neuronal en condiciones normales y en un modelo murino de la HD.

### **Objetivos particulares**

- Estudiar la modulación sináptica que ejerce el BDNF de la actividad excitatoria estriatal en ratones normales.
- Estudiar la modulación sináptica que ejerce el BDNF de la actividad excitatoria estriatal en un modelo murino de la enfermedad de HD.

## Material y Métodos

Para llevar a cabo los objetivos del presente trabajo, se utilizaron 14 ratones macho de la cepa C57/BL6 (C57BLACK6, o black 6 es la cepa endogámica de ratón de laboratorio más ampliamente usada para ser manipulada genéticamente en el estudio de las enfermedades humanas) de 9-13 gramos de peso (Harlan, México). Se formaron dos grupos, el grupo tratado con 3-NP (8 ratones) y el grupo control (6 ratones). A los ratones experimentales se les trató crónicamente con 3-NP vía intraperitoneal a una concentración de 15 mg/Kg durante cinco días; Se sacrificaron al séptimo día para realizar el registro poblacional neuronal *in vitro* en el estriado.

### *Obtención del tejido cerebral.*

Se decapitó al animal después de anestesiarlo con éter etílico; se extrajo el cerebro y se sumergió en un vaso de precipitados conteniendo una solución salina isotónica fría (4°C); compuesta de: 2.52M NaCl, 60.0mM KCl, 100.0mM CaCl<sub>2</sub>, 20.0mM MgCl<sub>2</sub>, 520.0nM NaHCO<sub>3</sub>, 10.0mM Glucosa, saturada con una mezcla de 95% O<sub>2</sub>/ y 5% CO<sub>2</sub> con una osmolaridad de 300 mOms por litro y un pH de 7.4.

Posteriormente se separaron ambos hemisferios cerebrales y se colocaron en una cámara de un vibroslicer (Pelco, TedPella) que contenía la solución previamente descrita. Se realizaron cortes sagitales (350µm), las rebanadas fueron colectadas un vaso de precipitados sumergiéndolas en la solución salina oxigenada.

Para realizar el registro poblacional por rebanada, estas se trasladaron a la cámara de registro. El flujo constante de la solución salina fue de 1 ±0.5 ml/min a una temperatura constante de 32 ± 0.05° C.

### *Registro poblacional de células estriatales en rebanadas.*

Una de las herramientas electrofisiológicas utilizadas para estudiar las respuestas sinápticas en el neostriado *in vitro*, es el registro del potencial de campo en la rebanada cerebral. Con esta técnica se evalúa el comportamiento de cientos de células en condiciones determinadas experimentalmente.

El potencial de acción registrado extracelularmente es una onda trifásica, dada por el cambio en la localización de los pozos y las fuentes de corriente activa. En la neurona durante el pico del potencial de acción, en la membrana del soma se da una corriente activa (llamada pozo), y en las dendritas se da una corriente pasiva (llamada fuente). Por convención, en un registro extracelular una onda hacia abajo es negativa (-) y representa una corriente entrante; mientras que una onda hacia arriba es positiva (+) y representa una corriente saliente.

Los registros se obtuvieron estimulando las fibras aferentes al neostriado (intensidad: 0-30 mV; duración: 0.04 ms; frecuencia: 0.1 Hz), colocando electrodos bipolares concéntricos de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro en la punta; A 500  $\mu\text{m}$  del electrodo de registro. Se emplearon electrodos de borosilicato (4-5  $\text{M}\Omega$  de resistencia) llenados con NaCl (0.9 %) como conductor (procedimiento descrito por Mendoza, 2001). La señal electrofisiológica se amplificó (MP-P15, GRASS) y se adquirió en línea con la ayuda de una plataforma de adquisición y análisis Lab View con una interfase AT-MIO (National Instruments).

En el caso de los animales tratados con 3-NP la estimulación necesaria para producir una espiga poblacional fue mayor (aprox. 10-40 mV) debido a la disminución de la población neuronal y por tanto a la disminución del reclutamiento de las neuronas, así, aumentando el estímulo, pudo observarse y registrarse mejor la respuesta poblacional.

Una vez obtenida la respuesta poblacional, se guardo un tiempo control de 10 minutos, al cabo de los cuales se procedió a añadir el BDNF a una



concentración de 50 ng/ml en un volumen de 50 ml a flujo constante de la solución previamente descrita. El lavado se realizó al término del flujo de los 50 ml. Para aislar la actividad sináptica glutamatérgica excitadora se utilizó un inhibidor de GABA (Bicuculina 10 $\mu$ M). Se midió la amplitud del potencial poblacional glutamatérgico únicamente.

### *Análisis de Resultados.*

En el registro poblacional de la transmisión sináptica se compararon los promedios de las respuestas glutamatérgicas y su modulación por BDNF del grupo control, y con el tejido cerebral proveniente de ratones tratados con 3-NP.

Los datos obtenidos fueron graficados en el programa Origin 7 (Microcal Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA); y analizados estadísticamente con el programa Sigma Stat 3.1 (Softeck, SPSS, Inc), utilizando las pruebas estadísticas de datos correlacionados (paired-test) y pruebas no paramétricas de datos no correlacionados (t-test). Los análisis estadísticos de cada experimento se encuentran condensados en el apéndice II.

### *Protocolo de pulso pareado*

Las terminales corticoestriatales se estimularon usando el protocolo de pulso pareado, el cual consiste en dar dos estímulos de la misma intensidad con un intervalo de entre 30-100 ms. Para analizar los cambios inducidos por el protocolo de pulso pareado se usa el cociente, que resulta de la división de las amplitudes  $S_2/S_1 * 100$ . Esta es una medida para analizar si existe cambio en la liberación de neurotransmisor y si ésta es pre- o post- sináptica. Si incrementa la liberación del neurotransmisor la facilitación por pulso pareado (FPP) disminuye, si decreta la liberación de neurotransmisor la FPP aumenta. Este protocolo se basa en la teoría del calcio residual que establece que los cambios en la FPP son resultado de las modificaciones en los niveles de Calcio<sup>2+</sup> intracelular en la terminal sináptica. La concentración de Calcio<sup>2+</sup> puede aumentar o disminuir como

respuesta a los estímulos de la misma intensidad dados cercanos en el tiempo, lo que modifica la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Katz Y Miledi, 1968; Leßman y Heumman, 1998), si el cambio es presináptico el cociente  $S_2/S_1 \cdot 100$  no se modifica. Si el cambio es postsináptico las amplitudes de ambas respuestas se modifican y por lo tanto el cociente  $S_2/S_1 \cdot 100$  cambia.

## Resultados

El Potencial de Campo es una respuesta estable que se mantiene durante el transcurso del experimento.

Para indagar que los cambios observados en la amplitud de la respuesta poblacional son debidos a las manipulaciones experimentales como la aplicación de la neurotrofina, y no al cambio propio de la respuesta sináptica, se procedió a grabar un registro control. En la figura 1 se muestra una gráfica que representa el curso temporal de la respuesta sináptica ( $S_1$ ), la cual se obtuvo de promediar la respuesta poblacional durante 20 minutos ( $n=10$ ). Se observa que la respuesta se mantiene estable a lo largo del tiempo.

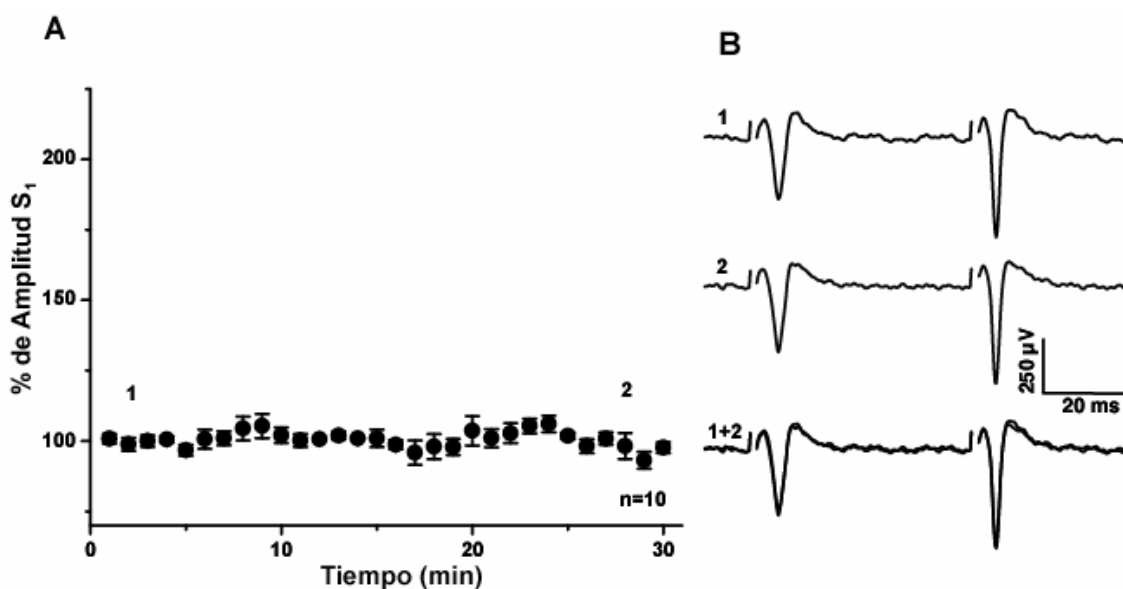


Figura 1- En **A** se muestra el porcentaje de cambio de la respuesta poblacional ( $S_1$ ) a lo largo del tiempo ( $\bar{X} \pm \sigma$ ). En **B** se muestran los trazos representativos del curso temporal 1 y 2 marcados en la gráfica. El tercer trazo muestra la sobre posición de ambos para compararlos y observar los cambios que ocurren después de cada curso.

Efecto de la neurotrofina BDNF sobre el estriado de ratones control.

Con el fin de determinar el efecto del BDNF sobre la respuesta poblacional glutamatérgica del estriado en rebanadas mantenidas *in vitro*, se determinó su efecto usando una concentración previamente reportada por otros laboratorios como efectiva para rebanadas cerebrales provenientes de roedores y registradas *in vitro* (50 ng/ml; Carmignoto, *et. al.*, 1997). La respuesta GABAérgica fue inhibida utilizando el inhibidor de los receptores GABA<sub>A</sub>: Bicuculina (10 µM).

La amplitud de la respuesta poblacional glutamatérgica aumentó un 70% ( $\pm 7\%$ ) respecto al control en tres registros (total 6 registros); ésta se observó 5 minutos después de haber aplicado la neurotrofina (BDNF), la amplitud se mantuvo estable al cabo de 15 minutos de haber aplicado el BDNF (Figura 2).

Existen diferencias significativas en la amplitud de la primera respuesta poblacional S<sub>1</sub> observada después de haber aplicado la neurotrofina BDNF ( $t_2 = -7.861$ ,  $P = 0.016$ ) respecto a la amplitud control (Figura 2). Mientras que la amplitud del segundo potencial S<sub>2</sub> no es estadísticamente significativa con respecto a S<sub>2</sub> control ( $t_2 = -3.628$ ,  $P = 0.068$ ), ver Apéndice II.

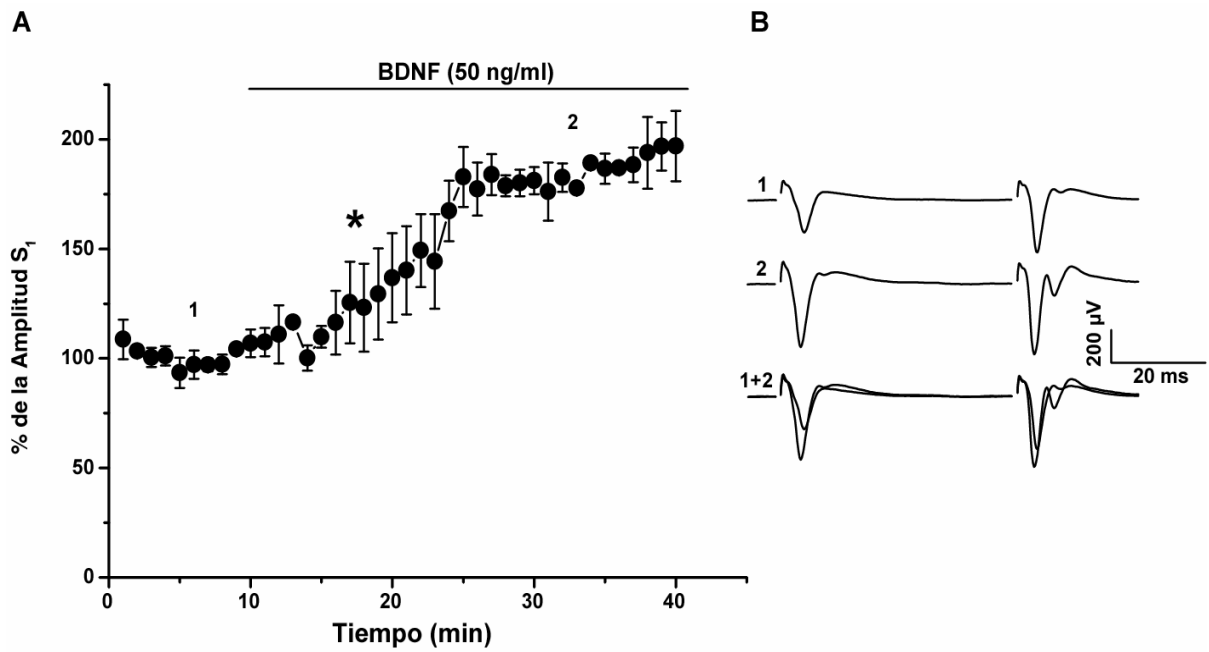


Figura 2- Gráfica en la que se muestra en **A** el incremento en la amplitud de la primera espiga del potencial de campo ( $S_1$ ) en las sinapsis glutamatérgicas, el aumento fue de un  $70 \pm 7\%$  respecto al control ( $\pm \sigma$ ) \* $P= 0.016$ . En **B** se muestran los trazos representativos del curso temporal; 1-antes de aplicar el BDNF, 2- después de aplicar la neurotrofina. El tercer trazo muestra la sobreposición de 1 y 2.

En la figura 3 se muestra el curso temporal de un registro antes, después de haber aplicado el BDNF y el lavado. Se observa que el efecto de la neurotrofina se mantiene, es decir, la respuesta poblacional glutamatérgica sigue incrementada en amplitud a pesar de ya no estar presente el BDNF (Figura 3).

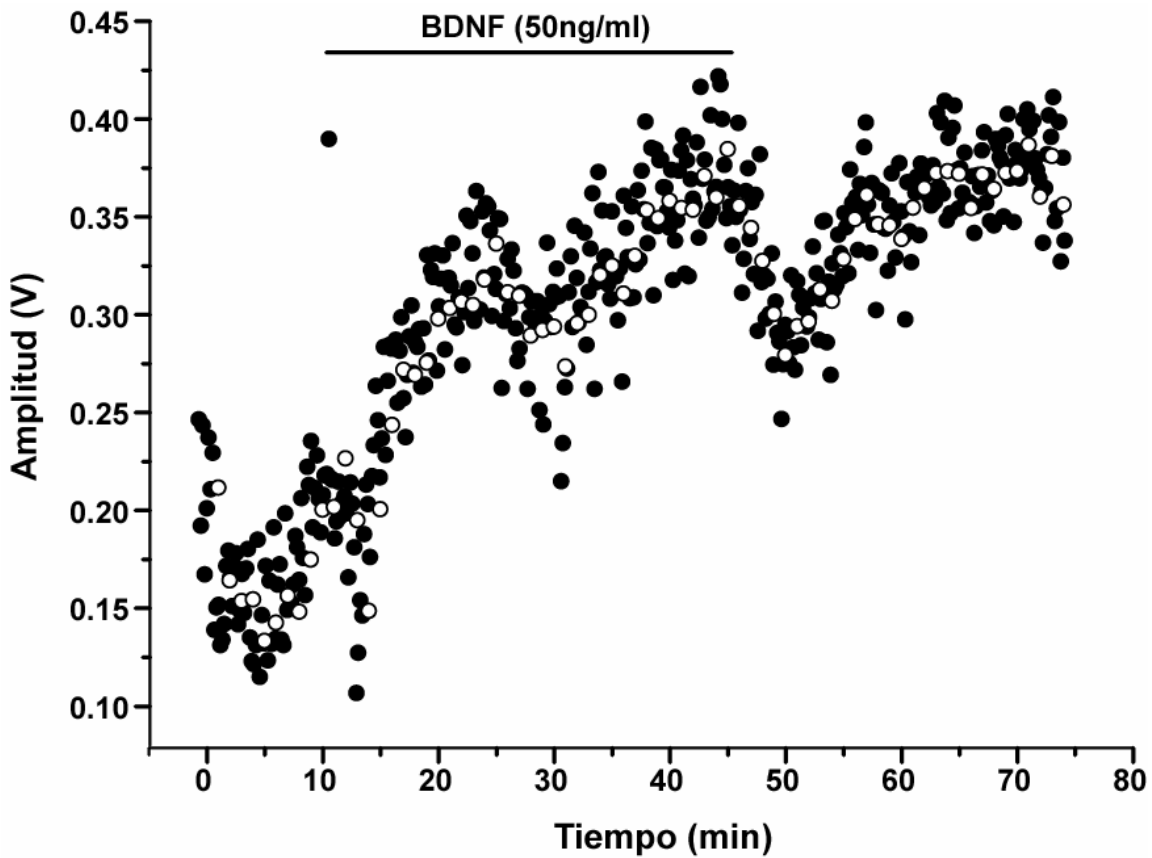


Figura 3- Gráfica en la que se muestra el curso temporal de las amplitudes observadas a lo largo del registro poblacional de las neuronas del estriado un experimento control en círculos negros, mientras que en círculos blancos se observa el promedio de los trazos. La barra negra indica el tiempo en que fue administrado el BDNF (50 ng/ml), al cabo del cual se procedió al lavado.

En tres registros (de 6) se observó un comportamiento transitorio negativo, es decir que la amplitud de la respuesta poblacional disminuyó después de haber agregado la neurotrofina y volvió a la amplitud control después de 20 minutos, aún estando el BDNF en el baño de la cámara (Figura 4).

Esta disminución fue de aproximadamente  $25\% \pm 3\%$  (promedio  $\pm \sigma$ ) respecto al control. La amplitud comenzó a disminuir a los 6 minutos de haber agregado el BDNF a la solución del baño de la cámara de registro; y regresó a la amplitud control al cabo de 26 minutos y se mantuvo estable.

Los cambios observados durante estos experimentos no son estadísticamente significativos en la amplitud  $S_1$  ( $t_{1,2} = 4.04$ ;  $P = 0.056$ ), ni en la amplitud  $S_2$  ( $t_{1,2} = 1.356$ ;  $P = 0.308$ ) después de aplicar la neurotrofina BDNF, ver Apéndice II. Como los cambios observados en estos experimentos no fueron estadísticamente significativos, se considera que el BDNF por tanto no tuvo efecto en la población neuronal del estriado de las rebanadas de cerebro de los ratones.

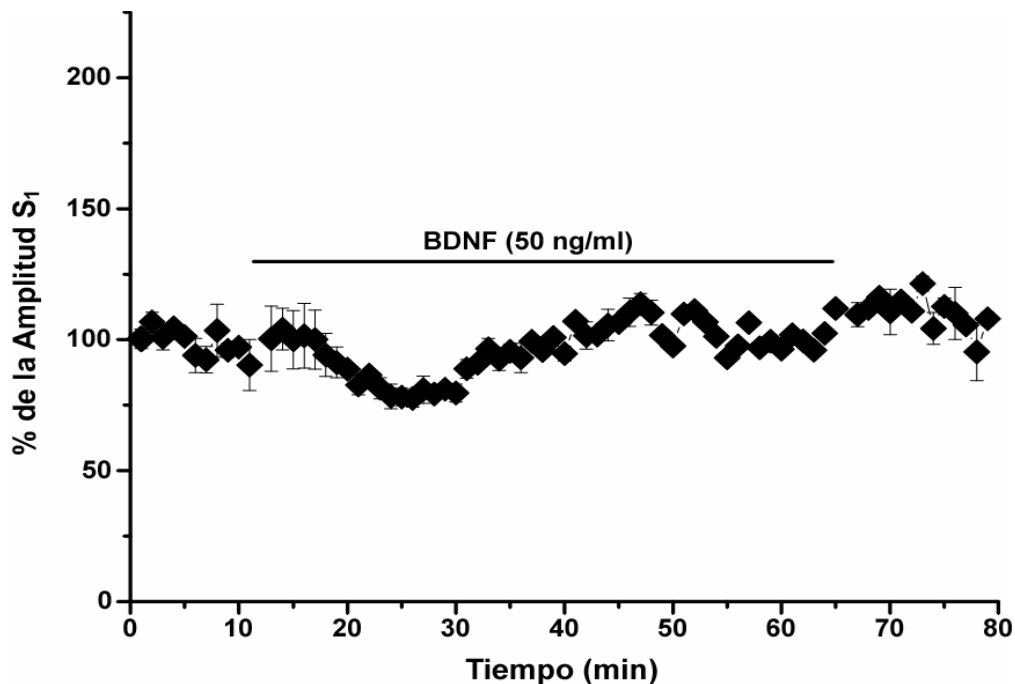


Figura 4- En esta gráfica se muestran los eventos sinápticos ocurridos durante la administración de la neurotrofina (BDNF, 50 ng/ml) en 3 experimentos. La amplitud disminuye  $25\% (\pm 3\%)$  (promedio  $\pm \sigma$ ) aunque se restablece al cabo del tiempo;  $P=0.056$ , ver Apéndice II.

### Modulación de la facilitación del pulso-pareado por el BDNF.

En el presente trabajo se observó que acompañado a los cambios en la amplitud sináptica hubo una variación en el FPP. En la mayoría de los registros en presencia de BDNF existió un decremento en la FPP, y el cociente S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub> cambió (ambas amplitudes incrementaron) después de haber administrado la neurotrofina, lo que sugiere que el BDNF incrementó la liberación del neurotransmisor a nivel presináptico (disminución en la FPP) pero también un probable cambio postsináptico (cambio el cociente S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>). (Ver adelante)

El cociente S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub> disminuyó en dos de los tres casos después de haber administrado el BDNF, mientras que en uno hubo un aumento (Tabla 1, Figura 5 A). Aunque en general la tendencia fue la disminución en el cociente de la FPP debido al protocolo del pulso pareado (Figura 5 B). La disminución fue de  $-15\% \pm 0.125\%$  (promedio  $\pm \sigma$ ) respecto al control.



Experimento	S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub>
	Antes	Después
1	1.68	1.1
2	1.32	1.07
3*	1.18	1.28

Tabla 1- Relación del cociente (S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>) antes y después de aplicar la neurotrofina. Solo un experimento (3\*) mostró un aumento en el cociente después de aplicar el factor trófico BDNF (50 ng/ml).

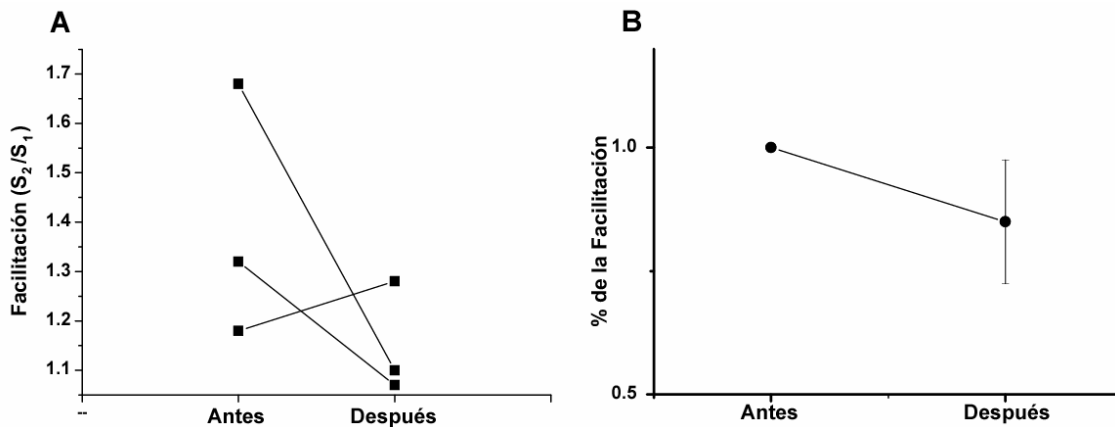


Figura 5- En **A** se muestra la facilitación obtenida en cada uno de los registros; mientras que en **B** es el promedio del cambio en el porcentaje de facilitación (promedio ±σ) inducido por la neurotrofina (BDNF); n=3, P=0.346.

La disminución observada en el cociente (S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>) por pulso pareado no es estadísticamente significativa ( $t_2=1.121$ ,  $P = 0.346$ , ver Apéndice II) después de haber aplicado la neurotrofina (BDNF). El aumento en la amplitud de ambos potenciales por lo tanto parece ser debida a mecanismos postsinápticos de la membrana, ya sea por el aumento en la fosforilación de los receptores a glutamato que genere un aumento de la apertura de los canales; o es la misma apertura, pero esta se mantiene abierta por más tiempo. Sin embargo nuestro diseño experimental no nos permite distinguir cual sería el mecanismo postsináptico responsable.

Efecto de la neurotrofina BDNF sobre el estriado de ratones tratados con 3-NP.

En estos experimentos se determinó la respuesta poblacional a la neurotrofina BDNF (50 ng/ml) sobre rebanadas de cerebro de ratones tratados intraperitonealmente con 3-NP. La respuesta GABAérgica fue inhibida con Bicuculina (10 $\mu$ M).

El aumento en la amplitud de la respuesta poblacional comenzó a observarse a los quince minutos de haber administrado la neurotrofina. Alcanzando su amplitud máxima después de 30 minutos (Figura 6).

En el lavado se observa que la amplitud regresa a las condiciones control. La amplitud aumenta un 25%  $\pm$  4% respecto al control. La amplitud máxima fue de 30 %  $\pm$  24% respecto al control.

Los cambios observados en la respuesta poblacional S<sub>1</sub> después de administrar el BDNF son estadísticamente significativos respecto a la amplitud antes de administrar el BDNF ( $t_4 = -2.974$ ;  $P = 0.041$ ; Figura 6); mientras que en la segunda respuesta (S<sub>2</sub>) no existen diferencias significativas ( $t_4 = -0.869$ ;  $P = 0.434$ ) ver Apéndice II.

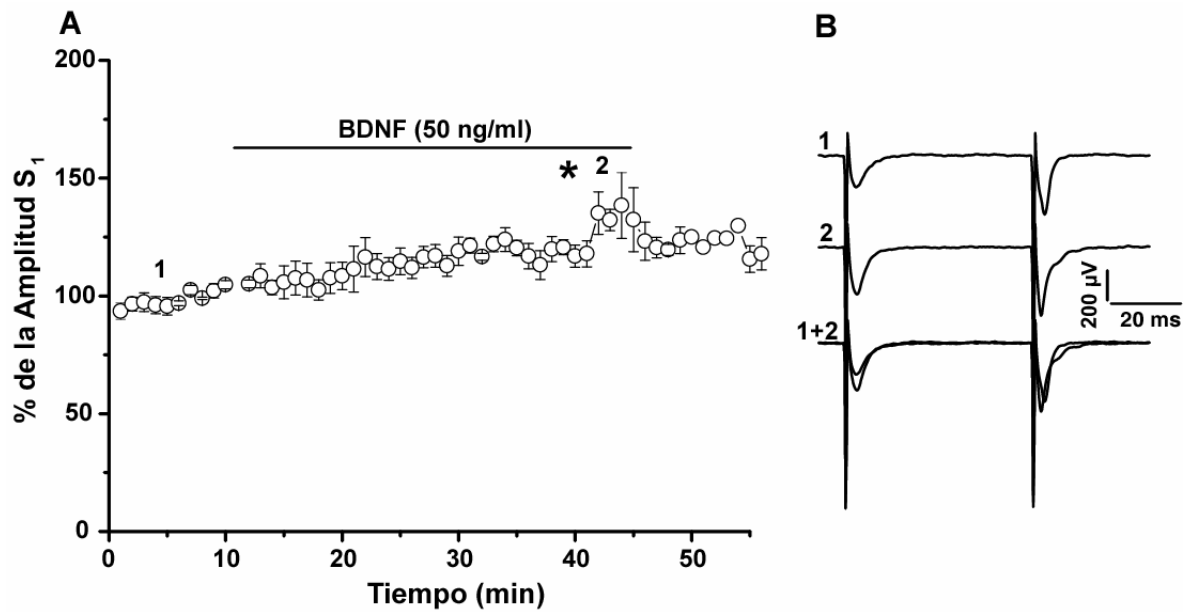


Figura 6- En esta gráfica en **A** se muestra el incremento de la amplitud de la primera espiga del potencial de campo en la sinapsis glutamatérgicas, este fue de un  $25 \pm 4\%$  respecto al control en animales tratados con el 3-NP (promedio  $\pm \sigma$ ),  $n=3$ ,  $*P=0.041$ . En **B** se muestran los trazos representativos 1 y 2 del curso temporal, más la sobreposición para observar los cambios en la respuesta

Modulación de la facilitación del pulso-pareado por la neurotrofina BDNF en animales tratados con 3-NP.

Para analizar el cambio en la respuesta sináptica poblacional se usó la Facilitación por pulso pareado (FPP). En todos los registros existió una disminución de la facilitación después de haber administrado la neurotrofina (BDNF, 50 ng/ml) (Tabla 2). En general la disminución fue de  $-11\% \pm 0.017\%$  respecto al control (Figura7).

La disminución de la FPP después de haber aplicado la neurotrofina es estadísticamente significativa ( $t_4 = 3.532$ ;  $P = 0.024$ , ver apéndice II).

Experimento	$S_2/S_1$	$S_2/S_1$
	Antes	Después
1	1.7	1.55
2	1.66	1.45
3	2.12	1.74
4	1.12	1.02
5	1.1	1

Tabla 2- Valores de FPP ( $S_2/S_1$ ) antes y después de aplicar la neurotrofina, en todos los casos existió una disminución en los valores de FPP después de aplicar el BDNF (50 ng/ml).

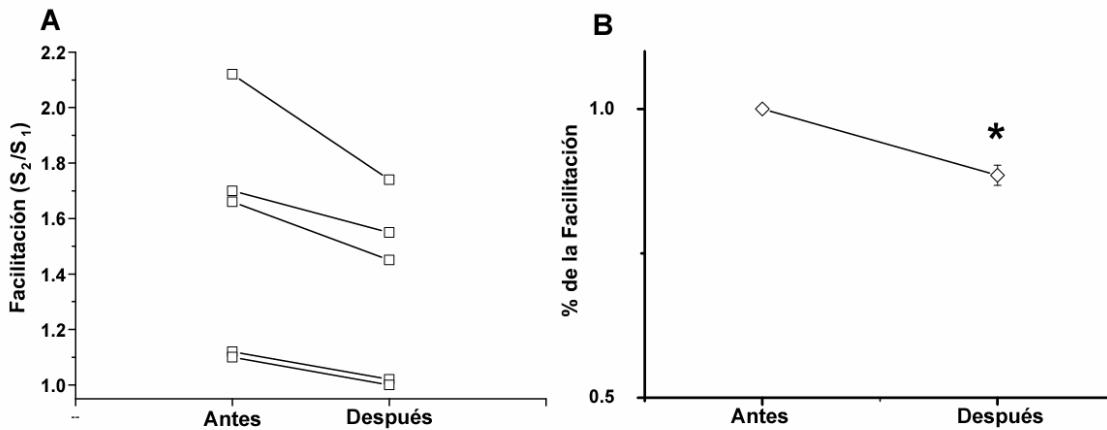


Figura 7- (A) Facilitación; (B) y porcentaje de facilitación (promedio  $\pm\sigma$ ) de cambio inducido por la neurotrofina (BDNF) en la facilitación sináptica producida por el protocolo de pulso pareado. n=5; \*P=0.024.

En estos casos se observa que el aumento en la amplitud es menor que el observado en los ratones en condiciones normales (solo el  $25\pm 4\%$ ) mientras que en estos últimos el aumento fue de  $70\pm 7\%$ . (Figura 8).

Comparando la respuesta sináptica S<sub>1</sub> antes de aplicar el BDNF no existen diferencias significativas ( $t_6=-1.258$ ;  $P=0.225$ ) y en la respuesta S<sub>2</sub> ( $t_6=-1.032$ ;  $P=0.342$ ) tampoco hay diferencias significativas. Y en cuanto a la respuesta después de haber aplicado el BDNF tampoco existen diferencias significativas (S<sub>1</sub>  $t_6=0.710$ ,  $P=0.504$ ; S<sub>2</sub>  $t_6=-0.0245$ ;  $P=0.981$ ). Lo que nos indica que a pesar de que hubo mayor aumento en las condiciones normales éste no fue significativo respecto a las amplitudes observadas en los ratones tratados con 3-NP (Figura 8).

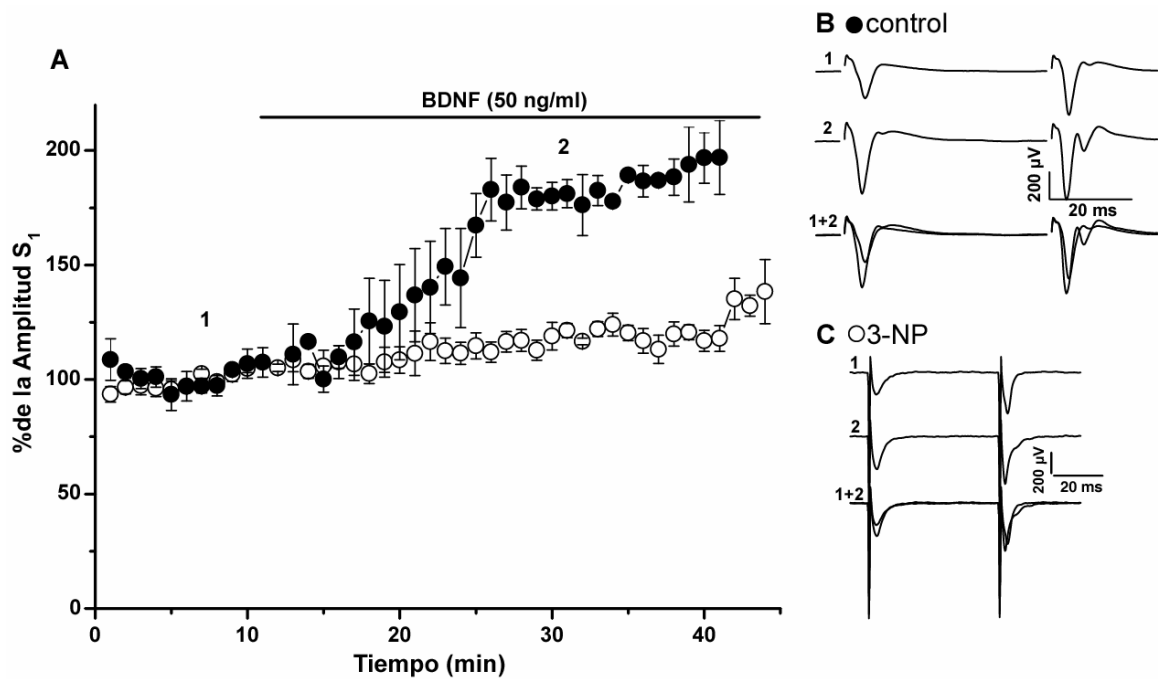


Figura 8- Comparación de la modulación del BDNF en las sinapsis corticoestriatales en condiciones control y en animales tratados con el 3-NP. Note como se reduce la modulación del BDNF en el potencial poblacional en este último caso (promedio  $\pm\sigma$ ) (A). En B están los trazos correspondientes a control, y la sobreposición de ambos (1+2). En C están los trazos correspondientes a 3-NP. 1-trazo antes de aplicar el BDNF; 2- trazo después de aplicar la neurotrofina, 1+2 es la sobreposición de ambos.

Comparando el cociente  $S_2/S_1$  después de haber administrado el BDNF en animales tratados con 3-NP y animales en condiciones normales este no es estadísticamente diferente ( $t_6 = -1.007$ ,  $P = 0.353$ , ver apéndice II) (Figura 9).

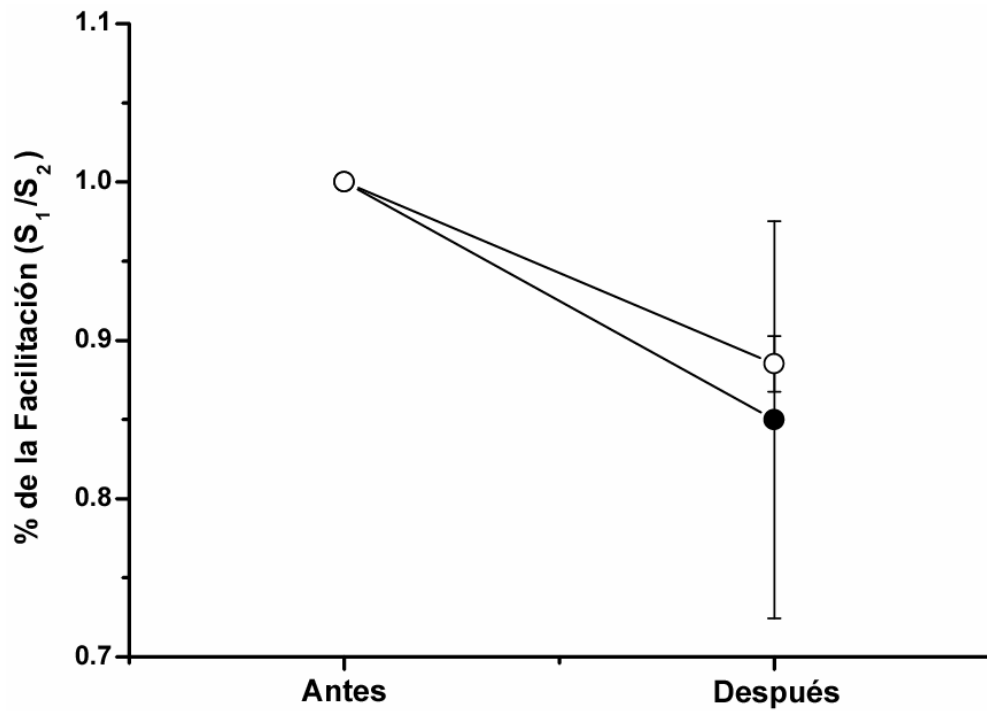


Figura 9- Porcentaje (%) de cambio inducido por las neurotrofinas en la facilitación sináptica producida por el protocolo de pulso pareado. En condiciones control (círculo negro) y con 3np (círculo blanco). Se observa que no hay un cambio significativo (promedio  $\pm\sigma$ )  $P=0.353$ .

Comparación del efecto de la neurotrofina BDNF en el estriado de ratones control y tratados con 3-NP en donde la neurotrofina no tuvo efecto.

En cuatro registros de ratones que fueron tratados intraperitonealmente con 3-NP, no se observó cambio en la amplitud de las respuestas sinápticas de  $S_1$  y  $S_2$ . Estadísticamente no existen diferencias significativas en la amplitud  $S_1$  respecto a la amplitud antes de administrar la neurotrofina ( $t_3= 2129$ ;  $P= 0.123$ , ver Apéndice II) (Figura 8; rombos blancos). En la amplitud  $S_2$  tampoco se observaron diferencias significativas después de haber administrado el BDNF (Wilcoxon Signed RankTest,  $P= 0.125$ ).

Con respecto a los ratones control antes de administrar la neurotrofina; la amplitud  $S_1$  de los ratones tratados con 3-NP, no es estadísticamente diferente ( $t_5= -0.801$ ,  $P= 0.459$ ). Asimismo la amplitud  $S_2$  tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas ( $t_5= -0.592$ ;  $P= 0.580$ ) (Figura 8; B).

Para el caso de las respuestas poblacionales  $S_1$  y  $S_2$  después de haber aplicado el BDNF si existen diferencias significativas  $S_1$  ( $t_5= 3.809$ ,  $P= 0.013$ ); esta diferencia es debida principalmente a que en los ratones control si se observó un incremento en la amplitud de la respuesta poblacional, mientras que en 4 de 9 ratones tratados con 3-NP no se observó cambio alguno como respuesta a la administración del BDNF (Figura 10; B y C).

En la respuesta poblacional  $S_2$  también existen diferencias significativas ( $t_5= 2.610$ ,  $P= 0.048$ , ver Apéndice II), la diferencia es debida a que en los ratones control existió un aumento en la amplitud del segundo potencial mientras que en los ratones experimentales no hubo efecto.



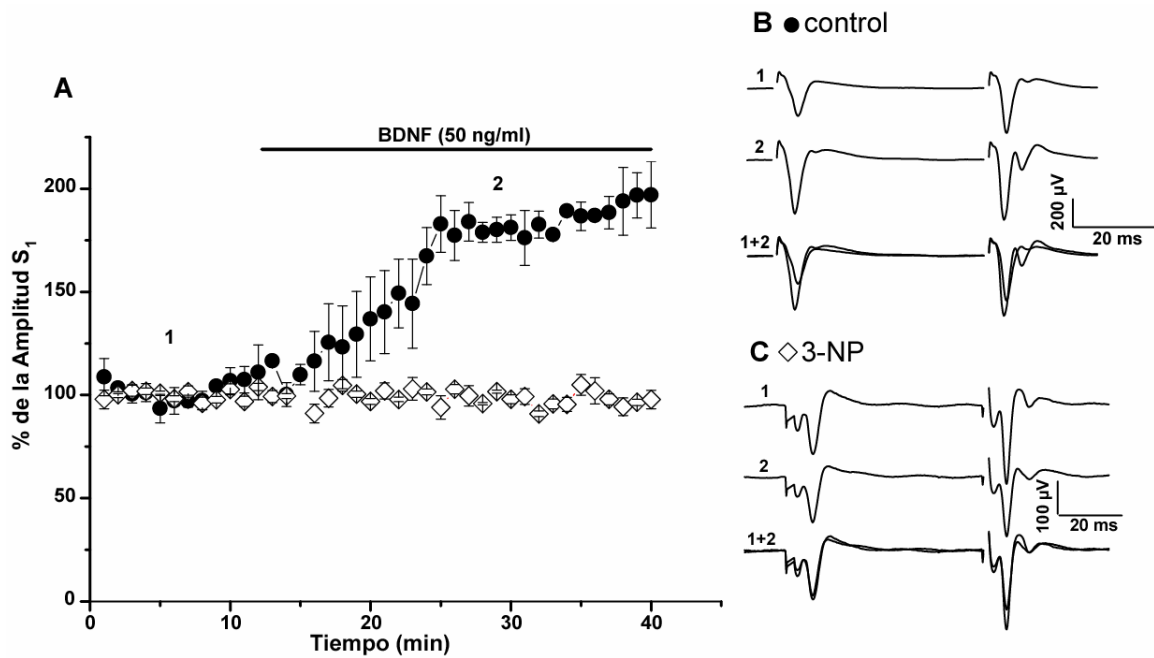


Figura 10- **A**, Comparación de la modulación del BDNF en las sinapsis corticoestriatales en condiciones control y en animales tratados con 3-NP en donde la neurotrofina no tuvo efecto sobre la respuesta sináptica. En **B** están los trazos correspondientes a control además de la sobreposición de ambos (1+2). En **C** están los trazos correspondientes a 3-NP. 1-trazo antes de aplicar el BDNF; 2- trazo después de aplicar la neurotrofina, 1+2 representa la sobreposición de ambos.

## Discusión

### Aumento en la amplitud de las sinapsis glutamatérgicas estriatales debido al BDNF.

En el presente trabajo se evaluó la modulación de las sinápsis corticoestriatales por el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF). En condiciones normales se observó que el BDNF aumenta la amplitud de las corrientes sinápticas excitatorias evocadas en el estriado en un 70%  $\pm$  7% (en 3 de 6 registros) y en los otros tres casos la disminuye en un 25%  $\pm$  3%; pero la amplitud regresa a la línea base antes del lavado.

Se ha reportado que las neurotrofinas (NT-3, BDNF, NT 4/5, NGF) potencian la transmisión sináptica principalmente en hipocampo de ratas y ratones (Leßman, 1998; Leßman y Heumman, 1998; Kang y Schuman, 1995). Otros trabajos incluyen áreas como la corteza visual, en donde el BDNF potencia la transmisión sináptica excitatoria (Carmignoto, *et. al.*, 1997; Akaneya, *et. al.*, 1997). Este aumento ocurre de manera rápida (minutos).

Las corrientes sinápticas pueden aumentar por un incremento en la liberación presináptica del transmisor o por un incremento en la sensibilidad postsináptica al transmisor (Stoop y Poo, 1996).

Se ha demostrado que seguido de la aplicación de BDNF en un cultivo de neuronas hipocampales ocurre un incremento rápido en la concentración de  $Ca^{2+}$  interno (Berninger, *et. al.*, 1993).

El mecanismo por el cual el BDNF produce una elevación en las concentraciones de  $Ca^{2+}$ , puede resultar de la acción de fosfolipasas C (PLC); ya que, tanto el BDNF como el NT-3 estimulan la fosforilación de PLC y subsecuentemente permiten un incremento en la concentración y en la hidrólisis de la inositol trifosfato ( $IP_3$ ) (Widmer, *et. al.*, 1993; Knipper, *et. al.*, 1993). Alternativamente, el calcio externo puede ser requerido para la transducción de

señales provocadas por el BDNF, y así la elevación de IP<sub>3</sub> desencadena liberación de Calcio de las vesículas internas (Stoop y Poo, 1996)

Se conoce que las neurotrofinas se unen a los receptores Trk que rápidamente se autofosforilan seguido de la fosforilación de otras proteínas, y genes que modifican (o afectan) la transcripción (Carmignoto, *et. al.*, 1997; Sheng y Greenberg, 1990).

Las fosfolipasas no son proteínas integrales de membrana; son proteínas solubles que se unen a la membrana por interacción de ésta con su dominio (TrkB) (Sheng y Greenberg, 1990; Widmer, *et. al.*, 1992; Zirrgiebel, *et. al.*, 1995; Carmignoto, *et. al.*, 1997:). Estas actúan sobre su sustrato (Fosfatidil inositol PIP<sub>2</sub>) hidrolizándolo y dando lugar a dos segundos mensajeros como son el DAG y el IP<sub>3</sub>. Que a su vez puede activar otras enzimas (como son las proteínas cinasas) que pueden fosforilar los receptores a Glutamato (NMDA y AMPA) y mantenerlos abiertos por mas tiempo o ampliar el diámetro de apertura; lo que explicaría la potenciación sináptica de forma postsináptica.

Por otra parte la potenciación sináptica es atribuible a la elevación en la liberación de neurotransmisores que es directamente afectada por los cambios en los niveles de Ca<sup>2+</sup> (incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular) (Leßman, 1998; Pandiella, *et. al.*, 1986). Lo que provoca un aumento en la liberación del neurotransmisor; es decir existe un aumento en la eficacia de la liberación de Glutamato desde las neuronas presinápticas (Leßman, 1998).

Usando el protocolo de Facilitación por Pulso Pareado (FPP), se ha visto que cuando incrementa la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el interior celular, la facilitación inducida por el protocolo de pulso pareado se reduce y si el efecto además afecta la membrana postsináptica las amplitudes de ambos potenciales presentan un cambio (Rahamimoff, 1968), como se observa en nuestros resultados. El efecto del BDNF en el FPP es consistente con la concentración elevada del Ca<sup>2+</sup> intracelular inducida por este factor (Stop y Poo, 1996).

Carmignoto, *et. al.* (1997) observaron que el aumento en la amplitud de las corrientes excitatorias ocurre de manera presináptica; las neurotrfinas BDNF y NGF afectan la probabilidad de liberación del neurotransmisor. Además la amplitud resultado del reclutamiento de varias terminales axónicas que coinciden en el mismo blanco neuronal.

El aumento en la amplitud de los potenciales de campo y de las corrientes excitatorias ocurre de una manera dosis-dependiente (Akaneya, *et. al.*, 1997), mediante la activación de las vías de señalización asociadas a la estimulación de los receptores tipo TrkB (Leßman y Heumman, 1998; Carmignoto *et. al.*, 1997).

Además del efecto positivo en la amplitud de la respuesta sináptica, también se observa que disminuye la amplitud de la respuesta (en 27% de los registros), aunque ésta se reestablece después de 30 min de haber aplicado el BDNF). Esta disminución no fue estadísticamente significativa ( $S_1$   $t_{1,2} = 4.04$ ;  $P = 0.056$ , ver Apéndice II). Por lo que, como ya antes se había mencionado, como el cambio no es estadísticamente significativo se concluye que el BDNF no tuvo efecto en estas rebanadas.

#### Aumento en la amplitud de las sinapsis glutamatérgicas estriatales por el BDNF en animales tratados con 3-NP.

Además de evaluar el papel del BDNF en la modulación sináptica en condiciones normales también se evaluó en un modelo murino de la enfermedad de Huntington. El modelo que se empleó fue el modelo farmacológico inducido mediante la aplicación del 3-NP.

Como ya se describió, la administración sistémica de la toxina mitocondrial 3-NP afecta a las neuronas espinosas medianas (NEM) de proyección; y produce cambios dendríticos similares a los observados en la enfermedad de Huntington (Beal, *et. al.*, 1993). Estos están caracterizadas por cambios en las ramificaciones dendriticas y el recurvamiento de las mismas; además de un incremento marcado

en la densidad de las espinas dendríticas (Brouillet, *et. al.*, 1993; Beal, *et. al.*, 1993; Reynolds, *et. al.*, 1998).

El tipo de lesión que produce la administración de la toxina 3-NP es de tipo excitotóxica, que hace a las neuronas más vulnerables a los niveles de glutamato endógeno por la reducción de ATP producido cuando el complejo II mitocondrial está inhibido (Fu, *et. al.*, 1994).

El tratamiento con 3-NP produce una reducción en el potencial de membrana, lo que puede activar indirectamente los receptores NMDA y por lo tanto existe un flujo excesivo de  $Ca^{2+}$ . (Dalbem, *et. al.*, 2005). Así mismo las neuronas espinosas medianas responden a la toxina 3-NP con una despolarización irreversible de la membrana (Saulle, *et. al.*, 2004), debido a la disminución de ATP que hace funcionar las ATPasas de membrana que mantienen la diferencia de potencial de las neuronas.

Aunado a todo esto, existe muerte neuronal (Beal, *et. al.*, 1993; Fu, *et. al.*, 1994; Wüllner, *et. al.*, 1994; Saulle, *et. al.*, 2004), por tanto hay menos población neuronal, lo que conlleva a un menor reclutamiento de la población (no pueden potenciarse). Así mismo puede ocurrir que como parte de las modificaciones que sufren las neuronas por el tratamiento; exista una disminución en la presencia de los receptores (Trk) y que por tanto exista una afectación en el aumento de la respuesta mediada por la activación de los receptores postsinápticos AMPA y NMDA; y por tanto la intensidad del estímulo haya aumentado ( $17 \pm 3$  Mv) respecto al control ( $8 \pm 1$  Mv); además de que la respuesta haya sido menor respecto al control.

La disminución en la respuesta sináptica puede ser resultado de una disminución en la respuesta postsináptica del receptor a glutamato (AMPA, NMDA). Para los casos en los que el BDNF no provocó cambio alguno esto puede deberse a que el 3NP disminuye las propiedades de membrana, reduciendo así la plasticidad sináptica y por tanto que no exista una respuesta de la población neuronal.

## Conclusiones

- En el presente trabajo se observó que el BDNF modula las sinápsis glutamatérgicas corticoestriatales incrementando la amplitud del potencial poblacional. Esta modulación parece ocurrir de una manera presináptica, es decir, mediante el aumento en la liberación del neurotransmisor. El aumento en la liberación del Glutamato puede ocurrir por la existencia de cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- En el modelo farmacológico con 3-NP de la HD, también existió un efecto modulador por parte del BDNF aunque este fue menor respecto al grupo control; ya que el 3-NP provoca una disminución en la plasticidad sináptica de las neuronas, así como muerte neuronal, y por tanto una respuesta menor.

## **APENDICE I**

### **Ganglios Basales**

Los ganglios basales (GB) están constituidos por un grupo de núcleos derivados del cerebro anterior entre los que se encuentran el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido externo e interno, la sustancia negra y el subtalámico (Brodal, 1992; Wilson, 1998) Todas estas estructuras establecen conexiones recíprocas. Anatómicamente, los ganglios basales son considerados como el componente principal del sistema extrapiramidal y regulan tanto la ejecución de programas motores como la integración de programas cognitivos.

El núcleo caudado y el putamen conforman la porción telencefálica de los ganglios basales denominada neostriado (Haines, 2003; Purves, 1997).

#### Aferentes

El neostriado (NE) es la principal entrada de información a los GB, recibe proyecciones de diferentes áreas de la corteza cerebral, incluyendo áreas motoras, sensoriales, de asociación y límbicas. Estas son de naturaleza glutamatérgica (excitatoria). Además de estas aferentes, el neostriado recibe fibras dopaminérgicas provenientes de la sustancia negra compacta (SNc) y del área ventral tegmental (VTA) y fibras serotoninérgicas de los núcleos del rafe dorsal. Además recibe entradas GABAérgicas del GPe (Pansky, *et. al.* 1988, Haines, 2003).

#### Eferentes

La mayor parte de las células estriatales son neuronas GABAérgicas que envían aferentes a la sustancia negra reticulata (SNr) y al paleostriado o globo pálido. Este último, constituido también por neuronas GABAérgicas, conforma la principal fuente de fibras eferentes de los ganglios basales. El globo pálido se subdivide en dos regiones. La primera conocida como el globo pálido lateral (GPL), envía proyecciones inhibitorias al NE, al globo pálido medial (GPM), a la SNc, al núcleo

reticular del tálamo y al núcleo subtalámico. Este último desarrolla conexiones recíprocas con el GPL, y recibe proyecciones directas de la corteza cerebral. El GPM constituye la segunda región del globo pálido, y envía proyecciones inhibitorias conjuntas con la SNr hacia el tallo cerebral y a los núcleos ventrolaterales del tálamo con algunas proyecciones a los núcleos, dorsomedial e intralaminares. Los núcleos ventro-laterales del tálamo, proyectan a las cortezas motoras primaria y suplementaria (Panzky, *op. cit.*, Haines, *op. cit.*).

Debido a sus relaciones anatómicas los ganglios basales presentan 4 circuitos básicos: 1) El circuito sensoriomotor o extrapiramidal que participa en el refinamiento de la información motora de la corteza cerebral; 2) El circuito oculomotor, involucrado en los movimientos sacádicos oculares; 3) El circuito asociativo, involucrado en el almacenamiento de la información y 4) El circuito límbico, involucrado en el almacenamiento de información y en funciones cognitivas (Haines, 2003).

#### Vía directa y Vía indirecta.

La *vía directa*, es la proyección estriatal (GABA/sustancia P/Dinorfina) hacia el GPi y la SNr, los cuales proyectan al tálamo, enviando proyecciones GABAérgicas. Esta vía cierra el circuito con la conexión del tálamo (proyecciones glutamatérgicas) hacia la corteza. La *vía indirecta*, es la proyección del NE (GABA/enk) hacia el GPe, el cual proyecta hacia el STN y éste a su vez proyecta hacia el complejo GPi/SNr. (Purves, 1997; Haines, 2003).



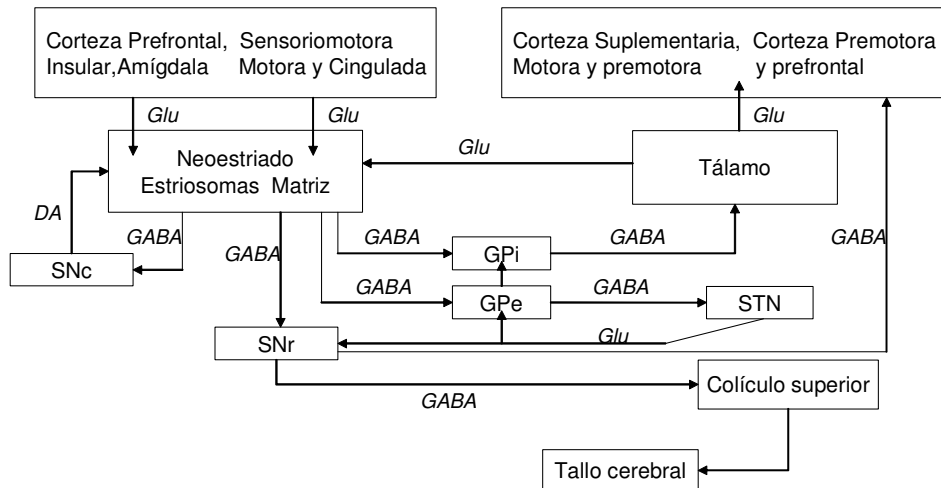


Figura 11- Conexiones de los Ganglios Basales (GB). Vía directa e indirecta.

## El Neostriado

El neostriado constituye la entrada principal a los ganglios basales. Está dividido citoarquitectónicamente en dos compartimentos, estriosomas y matriz, que se distinguen con base a sus características histoquímicas y relaciones anatómicas. Los estriosomas, se caracterizan por contener neuronas ricas en neuropéptidos como la met-enkefalina y sustancia P, así como una concentración alta de receptores a opioides. Los receptores reciben proyecciones de la corteza prefrontal, insular y la amígdala (Graybiel, 1990).

La matriz, por otro lado, presenta niveles altos de actividad de la enzima acetilcolinesterasa. La matriz recibe aferentes provenientes principalmente de las cortezas somatosensorial, motora, y cingulada, así como de los núcleos intralaminares tálamicos. No obstante que las aferentes cortico-estriatales se encuentran segregadas en los estriosomas y en la matriz, las aferentes dopaminérgicas cuyo origen se encuentra en diferentes grupos neuronales mesencefálicos, proyectan sobre ambos compartimentos. Por otro lado, las neuronas concentradas en los estriosomas proyectan principalmente a la SNc, mientras que aquellas localizadas en la matriz proyectan hacia la SNr, El GPM y al GPL (Graybiel, 1990, *op. cit.*).

## Citoarquitectura del neocóstriado

La población neuronal que conforma el neocóstriado es heterogénea morfológicamente. Se han identificado un tipo de neurona de proyección, la espinosa mediana y 5 tipos de interneuronas (Kita, *et. al.* 1985; Kawaguchi, *et. al.*, 1990).

### *Neuronas espinosas medianas*

Las neuronas espinosas medianas son células de proyección que constituyen alrededor del 90-95% de la población neuronal total del neocóstriado. Sus cuerpos celulares miden de 12 a 20µm de diámetro. Estas células se caracterizan por tener una gran cantidad de espinas en las dendritas distales al tronco principal. Kawaguchi y cols. (1990) clasifican a las neuronas espinosas medianas en dos subclases con base en la morfología y distribución anatómica de sus colaterales axónicas. La subclase prevalente presenta colaterales axónicas restringidas a la región de su campo dendrítico neuronal. El segundo tipo, menos común, presenta colaterales axónicas que se distribuyen ampliamente a lo largo del neocóstriado. Ambos subtipos celulares liberan GABA como neurotransmisor (Kawaguchi, 1993).

### *Interneuronas*

Las interneuronas forman una pequeña proporción del total de las células neocóstriatales. De acuerdo a su morfología y electrofisiología se han caracterizado 4 subtipos: Interneuronas gigantes colinérgicas no espinosas, interneuronas medianas no espinosas, interneuronas medianas lisas con varicosidades, e interneuronas inmunoreactivas a calretinina (Kawaguchi, *op. cit.*).

### *Interneuronas gigantes colinérgicas*

Las interneuronas gigantes colinérgicas representan menos del 3% de la población neuronal neocóstriatal. Estas células poseen un soma que mide entre 50-60µm de diámetro y árboles dendríticos pobremente ramificados. Comúnmente, su

axón se origina a partir de uno de los troncos dendríticos y establece conexiones simétricas axosomáticas escasas y contactos asimétricos axodendríticos mas abundantes. Las colaterales axónicas forman plexos abundantes en la matriz y su blanco principal son las neuronas espinosas medianas (Kawaguchi, 1993).

*Interneuronas medianas:*

a) *Interneurona GABAérgica inmunoreactiva a Parvalbúmina.*

Las interneuronas GABAérgicas inmunopositivas a parvalbúmina constituyen el 3 al 5% del total de las células neocorticales. Estas células poseen un soma de 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro y dendritas varicosas que se extienden de 200-300 $\mu\text{m}$  del cuerpo celular. Sus axones presentan un gran número de colaterales con distribución local, lo que permite el desarrollo de una amplia red de interconexiones. Establecen contactos con somas y troncos dendríticos de neuronas locales (Kita, 1993).

b) *Interneurona GABAérgica inmunoreactiva a Calretinina*

Las interneuronas GABAérgicas inmunopositivas a calretinina son interneuronas medianas sin espinas localizadas en la región rostral medial del neocórtex.

*Interneuronas que contienen somatostatina, neuropeptido Y y óxido nítrico sintetasa:*

Estos tipos neuronales representan en conjunto del 1-2% del total de las células corticales. Su soma mide de 12-25  $\mu\text{m}$  y presentan árboles dendríticos pobremente elaborados distribuidos espacialmente tanto en los estriosomas como en la matriz. Sus axones son largos con colaterales distribuidas sobre la región ocupada por las arborizaciones dendríticas. Estas neuronas establecen contactos con las neuronas espinosas medianas, y reciben aferentes corticales (Kawaguchi, *et. al.*, 1995).

### Inervación cortical y talámica en el neostriado

En el estriado existe una convergencia masiva de aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral, así como de los núcleos intralaminares y parafascicular del tálamo. Esta transmisión glutamatérgica comanda la actividad de las células estriatales (Purves, 1997; Haines, 2003).

Las proyecciones corticoestriatales provienen de las capas granular e infragranular de la corteza, la mayoría de estas aferentes proyectan topográficamente al estriado. Las cortezas de asociación se proyectan sobre la región rostral del putamen, así como sobre el cuerpo y cola del caudado. Las regiones sensoriomotoras de la corteza, se proyectan sobre el caudado dorsolateral y a la región postcomisural del putamen. La información límbica llega al núcleo acumbens, al caudado ventral y a la parte profunda del tubérculo olfatorio (Haines, *op. cit.*).

Este arreglo anatómico sugiere que la información cortical llega a los ganglios basales a través de circuitos sensoriomotores asociativos y límbicos organizados en paralelo. De forma que, existe una convergencia cortical dentro del estriado en donde dos áreas corticales pueden compartir la misma región sobreponiéndose. Las terminales corticales se arborizan en dominios restringidos de los campos dendríticos de las neuronas estriatales localizadas tanto en estriosomas como en la matriz (i.e. sinapsis de paso). De este modo las sinapsis cortico- y tálamo-estriatales se establecen, respectivamente, con la cabeza de las espinas dendríticas y con la parte distal de la arborización dendrítica de las neuronas espinosas medianas. Ambos tipos de aferentes forman sinapsis simétricas con las neuronas espinosas medianas. Las aferentes corticales también inervan a las interneuronas GABAérgicas, estableciendo con ellas contactos simétricos. Mientras que las aferentes corticales inervan principalmente a las células espinosas medianas las aferentes talámicas lo hacen sobre las interneuronas colinérgicas (Haines, 2003).

### Influencia excitatoria e inhibitoria en el neostriado

La activación de las aferentes corticales producen cambios sobre el potencial de membrana de las células estriatales. El curso temporal de estos cambios es semejante al de las depolarizaciones e hiperpolarizaciones espontáneas de las células espinosas medianas. Cuando las depolarizaciones de las aferentes corticoestriatales alcanzan el umbral de disparo, activan a las células espinosas medianas mediante la liberación de glutamato (Wilson, 1990, Calabresi, *et. al.* 1996).

Estas células poseen conductancias de potasio que mantienen el potencial de membrana negativo, un alto umbral de disparo, y baja resistencia. Además la activación de las interneuronas GABAérgicas por las aferentes corticales inducen la inhibición mediada a través de los receptores GABA<sub>A</sub> de las neuronas espinosas medianas. Las células espinosas medianas tienen a su vez interacciones inhibitorias recíprocas a través de sus colaterales, las cuales se establecen entre los axones de las neuronas espinosas medianas localizadas en la vecindad. Este proceso de inhibición se activa solamente cuando las células de proyección se activan. Debido a todo esto, se requiere de la estimulación temporal y/o espacial de las aferentes excitatorias para lograr que las células estriatales alcancen su umbral de disparo. De esta manera, las entradas excitatorias representan la principal fuente despolarizante de estas células (Wilson, 1993; Calabresi, *et. al.*, 1996).

### Interacciones sinápticas en el estriado

Las interacciones sinápticas rápidas en el neostriado se establecen, entre las aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral y de los núcleos intralaminares del tálamo con las células espinosas medianas. Por otro lado, éstas últimas establecen conexiones recíprocas GABAérgicas entre sí. En estudios *in vivo*, la activación de las aferentes corticales o talámicas produce potenciales sinápticos excitatorios seguidos de un potencial sináptico inhibitorio en las células espinosas medianas. *In vitro*, la estimulación estriatal provoca potenciales

sinápticos excitatorios (EPSCs, siglas en inglés) que se eliminan al reducir el  $\text{Ca}^+$ , al incrementar el  $\text{Mg}^{2+}$ , o en presencia de cobalto y TTX, indicando que son mediados sinápticamente. Las sinapsis rápidas glutamatérgicas están mediadas por tres tipos de receptores ionotrópicos, los propionato de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4 (AMPA), los N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y los sensibles a ácido kaínico, en tanto que las sinápsis GABAérgicas están mediadas principalmente por receptores  $\text{GABA}_A$ . Los efectos glutamatérgicos postsinápticos a largo plazo están mediados por receptores asociados a proteínas G, conocidos como metabotrópicos (mGluRs). En el neocórtex los EPSPs, aparecen como resultado de la activación de las sinapsis glutamatérgicas, como ha sido demostrado con el uso de antagonistas glutamatérgicos de los receptores AMPA/Kainato y en menor proporción de los receptores NMDA (Calabresi, *et. al.* 1990).

*Plasticidad sináptica*, es una característica esencial del sistema nervioso. Consiste en la capacidad para modificar de manera temporal o permanente los patrones de conexión sináptica para modificar sus rutas de interconexión entre las neuronas. Dichos cambios pueden traer como consecuencia la modificación del funcionamiento de los circuitos neurales y la forma en cómo se relacionan los sistemas modales en que se organiza el cerebro. Dicho proceso sucede durante y después de su maduración en procesos como la memoria y el aprendizaje.

## APENDICE II

### Análisis Estadísticos (SigmaStat 3.1).

- Experimentos realizados en ratones control. En todos los casos se ha impreso la interpretación que da el programa en inglés.

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF		S2/S1
	S1	S2		S1	S2	
30-Ene	0.177	0.298	1.68361582	0.365	0.402	1.10136986
31-Ene	0.15	0.198	1.32	0.27	0.289	1.07037037
07-Ago	0.083	0.098	1.18072289	0.238	0.306	1.28571429

#### Paired t-test:

Lunes, Enero 21, 2008, 10:14:46 a.m.

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Passed (P = 0.653)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s1cont	3	0	0.137	0.0484	0.0279
s1bdfcont	3	0	0.291	0.0661	0.0381
Difference	3	0	-0.154	0.0340	0.0196

t = -7.861 with 2 degrees of freedom. (P = 0.016)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.239 to -0.0699

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.016)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.952

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF		S2/S1
	S1	S2		S1	S2	
30-Ene	0.177	0.298	1.68361582	0.365	0.402	1.10136986
31-Ene	0.15	0.198	1.32	0.27	0.289	1.07037037
07-Ago	0.083	0.098	1.18072289	0.238	0.306	1.28571429

#### Paired t-test:

Lunes, Enero 21, 2008, 10:15:43 a.m.

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Passed (P = 0.166)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2cont	3	0	0.198	0.1000	0.0577
s2bdfcont	3	0	0.332	0.0609	0.0352
Difference	3	0	-0.134	0.0641	0.0370

t = -3.628 with 2 degrees of freedom. (P = 0.068)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.294 to 0.0250

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.068)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.473

The power of the performed test (0.473) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

- Experimentos realizados con ratones tratados con 3-NP en donde si hubo efecto del BDNF.

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF		S2/S1
	S1	S2		S1	S2	
12-Mar	0.273	0.463	1.6959707	0.376	0.583	1.55053191
23-Abr	0.073	0.121	1.65753425	0.099	0.144	1.45454545
31-Ago	0.24	0.51	2.125	0.257	0.449	1.74708171
23-Oct	0.202	0.226	1.11881188	0.234	0.24	1.02564103
23-Oct	0.208	0.23	1.10576923	0.258	0.259	1.00387597

**Paired t-test:**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:20:06 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.330)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s13np	5	0	0.199	0.0760	0.0340
s1bdnf 3np	5	0	0.245	0.0986	0.0441
Difference	5	0	-0.0456	0.0343	0.0153

t = -2.974 with 4 degrees of freedom. (P = 0.041)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.0882 to -0.00303

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.041)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.564

The power of the performed test (0.564) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF		S2/S1
	S1	S2		S1	S2	
12-Mar	0.273	0.463	1.6959707	0.376	0.583	1.55053191
23-Abr	0.073	0.121	1.65753425	0.099	0.144	1.45454545
31-Ago	0.24	0.51	2.125	0.257	0.449	1.74708171
23-Oct	0.202	0.226	1.11881188	0.234	0.24	1.02564103
23-Oct	0.208	0.23	1.10576923	0.258	0.259	1.00387597

**Paired t-test:**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:20:41 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.237)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2 3np	5	0	0.310	0.168	0.0750
s2bdnf 3np	5	0	0.335	0.177	0.0793
Difference	5	0	-0.0250	0.0643	0.0288

t = -0.869 with 4 degrees of freedom. (P = 0.434)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.105 to 0.0549



The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.434)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

- Comparación de la Facilitación por Pulso Pareado (FPP) en estriado de ratones control y en ratones tratados con 3NP antes de administrar el BDNF.

S2/S1 Control	S2/S1 3np control
1.68361582	1.6959707
1.32	1.65753425
1.18072289	2.125
	1.11881188
	1.10576923

#### t-test

Lunes, Enero 21, 2008, 10:23:21 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.792)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.491)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2/s1 cont	3	0	1.395	0.260	0.150
s2/s1 3 np	5	0	1.541	0.432	0.193

Difference -0.146

t = -0.521 with 6 degrees of freedom. (P = 0.621)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.831 to 0.539

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.621).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

- Comparación de la Facilitación por Pulso Pareado (FPP) estriado de ratones control y en ratones tratados con 3NP después de administrar el BDNF.

S2/S1control BDNF	S2/S1 3np +BDNF
1.10136986	1.55053191
1.07037037	1.45454545
1.28571429	1.74708171
	1.02564103
	1.00387597

**t-test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:24:24 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.766)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.185)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2/s1bdfncont	3	0	1.152	0.116	0.0672
s2/s1bdfn 3np	5	0	1.356	0.329	0.147

Difference -0.204

**t = -1.007 with 6 degrees of freedom. (P = 0.353)**

95 percent confidence interval for difference of means: -0.699 to 0.291

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.353).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

- Experimentos realizados con ratones tratados con 3-NP en donde no existió efecto del BDNF.

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF		S2/S1
	S1	S2		S1	S2	
03-Sep	0.155	0.251	1.61935484	0.15	0.217	1.44666667
17-Sep	0.144	0.151	1.04861111	0.142	0.149	1.04929577
18-Sep	0.224	0.219	0.97767857	0.19	0.187	0.98421053
15-Oct	0.132	0.323	2.4469697	0.107	0.292	2.72897196

**Paired t-test:**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:27:14 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.340)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s13np sin	4	0	0.164	0.0413	0.0206
s1 bdnf3np sin	4	0	0.147	0.0341	0.0170
Difference	4	0	0.0165	0.0155	0.00775

t = 2.129 with 3 degrees of freedom. (P = 0.123)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.00817 to 0.0412

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.123)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.260

The power of the performed test (0.260) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF		S2/S1
	S1	S2		S1	S2	
03-Sep	0.155	0.251	1.61935484	0.15	0.217	1.44666667
17-Sep	0.144	0.151	1.04861111	0.142	0.149	1.04929577
18-Sep	0.224	0.219	0.97767857	0.19	0.187	0.98421053
15-Oct	0.132	0.323	2.4469697	0.107	0.292	2.72897196

**Paired t-test:**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:28:31 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, Signed Rank Test begun

**Wilcoxon Signed Rank Test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:28:32 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
s2 3npsin	4	0	0.235	0.185	0.287
s2 bdnf3np sin	4	0	0.202	0.168	0.255

W= -10.000 T+ = 0.000 T- = -10.000 P(est.)= 0.100 P(exact)= 0.125

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that it is due to chance (P = 0.125).

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF		S2/S1
	S1	S2		S1	S2	
03-Sep	0.155	0.251	1.61935484	0.15	0.217	1.44666667
17-Sep	0.144	0.151	1.04861111	0.142	0.149	1.04929577
18-Sep	0.224	0.219	0.97767857	0.19	0.187	0.98421053
15-Oct	0.132	0.323	2.4469697	0.107	0.292	2.72897196

**Paired t-test:**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:30:07 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.234)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2/s1 sin	4	0	1.523	0.680	0.340
s2/s1 bdnf 3np sin	4	0	1.552	0.811	0.405
Difference	4	0	-0.0291	0.188	0.0940

t = -0.310 with 3 degrees of freedom. (P = 0.777)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.328 to 0.270

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.777)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.052

The power of the performed test (0.052) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

S1 control	S1 control 3np
0.177	0.155
0.15	0.144
0.083	0.224
	0.132

**t-test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:31:47 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.742)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.484)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s1cont	3	0	0.137	0.0484	0.0279
s13np sin	4	0	0.164	0.0413	0.0206

Difference -0.0271

t = -0.801 with 5 degrees of freedom. (P = 0.459)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.114 to 0.0598

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.459).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.  
 Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

S2 control	S2 control 3np
0.298	0.251
0.198	0.151
0.098	0.219
	0.323

**t-test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:34:01 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.761)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.182)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2cont	3	0	0.198	0.1000	0.0577
s2 3npsin	4	0	0.236	0.0714	0.0357

Difference -0.0380

t = -0.592 with 5 degrees of freedom. (P = 0.580)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.203 to 0.127

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.580).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

S1 control BDNF	S1 3np+ BDNF
0.365	0.15
0.27	0.142
0.238	0.19
	0.107

**t-test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:35:10 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.527)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.182)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s1bdfcont	3	0	0.291	0.0661	0.0381
s1 bdnf3np sin	4	0	0.147	0.0341	0.0170

Difference 0.144

t = 3.809 with 5 degrees of freedom. (P = 0.013)

95 percent confidence interval for difference of means: 0.0467 to 0.241

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.013).  
Power of performed test with alpha = 0.050: 0.840

S2 control BDNF	S2 3np+ BDNF
0.402	0.217
0.289	0.149
0.306	0.187
	0.292

**t-test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:35:34 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.320)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.733)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2bdfncont	3	0	0.332	0.0609	0.0352
s2 bdnf3np sin	4	0	0.211	0.0606	0.0303

Difference 0.121

t = 2.610 with 5 degrees of freedom. (P = 0.048)

95 percent confidence interval for difference of means: 0.00185 to 0.240

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.048).  
Power of performed test with alpha = 0.050: 0.492

The power of the performed test (0.492) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

S2/S1 control	S2/S1 3np
1.68361582	1.61935484
1.32	1.04861111
1.18072289	0.97767857
	2.4469697

**t-test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:36:27 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.697)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.451)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2/s1 cont	3	0	1.395	0.260	0.150
s2/s1 sin	4	0	1.523	0.680	0.340

Difference -0.128

t = -0.305 with 5 degrees of freedom. (P = 0.773)

95 percent confidence interval for difference of means: -1.211 to 0.954

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.773).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

S2/S1 control BDNF	S2/S1 3np+ BDNF
1.10136986	1.44666667
1.07037037	1.04929577
1.28571429	0.98421053
	2.72897196

**t-test**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:36:57 a.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

**Normality Test:** Passed (P = 0.117)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.419)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2/s1bdnfcont	3	0	1.152	0.116	0.0672
s2/s1 bdnf 3np sin	4	0	1.552	0.811	0.405

Difference -0.400

t = -0.828 with 5 degrees of freedom. (P = 0.445)

95 percent confidence interval for difference of means: -1.641 to 0.841

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.445).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

- Experimentos en donde se observó un efecto transitorio después de haber aplicado el BDNF.

experimento	Amplitud control		S2/S1	Amplitud BDNF	
	S1	S2		S1	S2
29-Oct	238	356	1.49579832	190	344
30-Oct	198	212	1.07070707	144	154
24-Sep	93	101	1.08602151	72	100

### Comparación de amplitudes S<sub>1</sub>

**Paired t-test:**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:41:50 a.m.

**Data source:** Data 1 in analisis estadistico

**Normality Test:** Passed (P = 0.244)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s1	3	0	176.333	74.889	43.237
s1bdnf	3	0	135.333	59.475	34.338
Difference	3	0	41.000	17.578	10.149

t = 4.040 with 2 degrees of freedom. (P = 0.056)

95 percent confidence interval for difference of means: -2.667 to 84.667

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.056)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.548

The power of the performed test (0.548) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

### Comparación de amplitudes S<sub>2</sub>

**Paired t-test:**

Lunes, Enero 21, 2008, 10:42:40 a.m.

**Data source:** Data 1 in analisis estadistico

**Normality Test:** Passed (P = 0.259)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2	3	0	223.000	127.855	73.817
s2bdnf	3	0	199.333	128.161	73.994
Difference	3	0	23.667	30.238	17.458

t = 1.356 with 2 degrees of freedom. (P = 0.308)

95 percent confidence interval for difference of means: -51.449 to 98.782

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.308)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.094

The power of the performed test (0.094) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.



## Comparación de la Facilitación

Lunes, Enero 21, 2008, 10:43:50 a.m.

### Paired t-test:

**Data source:** Data 1 in analisis estadistico

**Normality Test:** Passed (P = 0.110)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
s2/s1	3	0	1.218	0.241	0.139
s2/s1 bdnf	3	0	1.423	0.372	0.215
Difference	3	0	-0.205	0.179	0.103

t = -1.987 with 2 degrees of freedom. (P = 0.185)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.650 to 0.239

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.185)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.180

The power of the performed test (0.180) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

## Referencias

- Alberch, J., Pérez-Navarro, E., Canals, J. 2004 Cap 14 *Neurotrophic factors in Huntington's disease*. Progress in Brain Research. 146:195-229.
- Akaneya, Y., Tsumoto, T., Kinoshita, S., Hatanaka, H. 1997. *Brain-Derived Neurotrophic Factor Enhances Long-Term Potentiation in Rat Visual Cortex*. The Journal of Neuroscience, 17(17):6707-6716.
- Baquet, Z., Gorski, J., Jones, K. 2004. *Early Striatal Dendrite Deficits Followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain-Derived Neurotrophic Factor*. The Journal of Neuroscience. 24(17): 450-458.
- Bargas, J., Galarraga, E., y Aceves, J. 1998. *Los ganglios basales*. Capitulo 10. Fisiología. Células, órganos y sistemas. Comps: Muñoz-Martínez E.J. y García J. FCE. México. Vol 5 227-273.
- Beal, M., Brouillet, E., Jenkins, B., Ferrante, R., Kowal, N., Miller, J., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B., Hyman, B. 1993. *Neurochemical and Histologic Characterization of Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid*. The Journal of Neuroscience, 13(10): 4181-4192.
- Berninger, B., García, D., Inagaki, N., Hahnel, C., Lindholm, D. 1993. *BDNF and NT-3 induce intracellular  $Ca^{2+}$  elevation in hippocampal neurons*. NeuroReport, 4:1303-1306.
- Binder, D. K., Scharfman, H. E. 2004. *Brain-derived Neurotrophic Factor*. Growth factors, 22: 123-131.

• Brodal, P. 1992. *The Central Nervous System. Structure and Function*. Oxford University Press. Inc. Printed in the United States of America. Cap 10: 246-261.

• Brouillet, E., Jenkins, B., Hyman, B., Ferrante, R., Kowall, N., Srivastava, R., Roy, D., Rosen, B., Beal, M. 1993. *Age-Dependent Vulnerability of the Striatum to the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid*. *Journal of Neurochemistry*, 60(1): 356-359.

• Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F., Hantraye, P. 1999 *Replicating Huntington's Disease phenotype in experimental animals*. *Progress in Neurobiology*, 59:427-468

• Calabresi P., De Murtas, M., Mercuri, N., Bernardi, G. 1990. *Kainic acid on Neostriatal Neurons Intracellular Record in vitro: Electrophysiological Evidence for Differential Neuronal Sensitivity*. *Journal of Neuroscience*, 10: 3960-3969.

• Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N., Bernardi, G. 1996. *The Corticostriatal Projection; from Synaptic Plasticity to Dysfunctions of the Basal Ganglia*. *TINS*, 19: 19-24.

• Carmignoto, G., Pizzorusso, T., Tia, S., Vicini, S. 1997. *Brain-derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor Potentiate Excitatory Synaptic Transmission in the rat visual cortex*. *Journal of Physiology*, 498(1): 153-164.

• Canals, J., Pineda, J., Torres-Peraza, J., Bosch, M., Martín-Ibañez R., Muñoz, T., Mengod, G., Ernfors, P., Alberch, J. 2004. *Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates the Onset and Severity of Motor Dysfunction Associated with Enkephalinergic Neuronal Degeneration in Huntington's Disease*. *The Journal of Neuroscience*, 24(35): 7727-7739.

• Chao, M. 2003. *Neurotrophins and their Receptors: a Convergence Point for Many Signalling Pathways*. *Natural Review Neuroscience*, 4: 299-309.

• Coles, C., Edmondson, D., Singer, T. 1979. *Inactivation of Succinate Dehydrogenase by 3-Nitropropionate*. *The Journal of Biological Chemistry*, 25(254): 5161-5167

• Dalbem, A., Silveria, C., Pedroso, M., Breda, R., Von Werne Baes, C., Bartmann, A., Costa da Costa, J. 2005. *Altered Distribution of Striatal Activity-Dependent Synaptic Plasticity in the 3-nitropropionic Acid Model of Huntington's Disease*. *Brain Research*, 1047:148-158.

• Fu, Y., He, F., Zhang, S., Huang, J., Zhang, J., Jiao, X. 1994. *3-Nitropropionic Acid Produces Indirect Excitotoxic Damage to Rat Striatum*. *Neurotoxicology and Teratology*, 17(3):333-339.

• Fusco, F., Zuccato, C., Tartari, M., Martorana, A., De March, Z., Giampa, C., Cattaneo, E., Bernardi, G. 2003. *Co-localization of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolic acid-lesioned rat brain*. *European Journal of Neuroscience*, 18: 1093-1102.

• Gauthier, L., Charrin, B., Borrell-Pagés, M., Dompierre, J., Rangone, H., Cordelières, F., DeMey, J., MacDonald, M., Leßmann, V., Humbert, S., Saudou, F. 2004. *Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF vesicular Transport along Microtubules*. *Cell*, 118: 127-138.

• Graybiel, P. 1990. *Neurotransmitters and Neuromodulators at the Neostriatum and the Neostriatal Control of Voluntary Movement*. *Brain Research Review*, 5:109-132.

• Haines, D. 2003. *Principios de Neurociencia*. 2da ed. Elsevier Science, España.

• Hernández-Echeagaray, E. 2004. *Avances sobre la Neurobiología de la Enfermedad de Huntington*. En Temas Selectos de Neurociencias III. Ed. Javier Velásquez Moctezuma. UAM, 33-41pp.

• Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. 1997. *Neurociencia y Conducta*. Prentice Hall, Madrid. 114-117 pp.

• Kang, H., Schuman, E. 1995. *Long-lasting Neurotrophin-induced Enhancement of Synaptic Transmisi3n in the Adult Hippocampus*. *Science*, 267: 1659-1662.

• Katz, B., Miledi, R. 1968. *The role of Calcium in Neuromuscular Facilitation*. *Journal of Physiology*, 195: 481:492.

• Kawaguchi, Y., Wilson, C., Emson, P. 1990. *Proyeccion Subtypes of rat Neostriatal Matrix Cells Revealed by Intracellular Injection of Biocytin*. *Journal of Neuroscience*, 10: 3421-3438.

• Kawaguchi, Y. 1993. *Physiological, Morphological and Histochemical Characterization of three Classes of Interneurons in Rat Neostriatum*. *Journal of Neuroscience*, 13: 4908-4923.

• Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C. 1995. *Striatal Interneurons: Chemical, Physiological and Morphological Characterization*. *Trend Neurosci*. 18: 527-535

• Kita, T., Kita, H., Kitai, S. 1985. *Active Membrane Properties of rat Neostriatal Neurons in an in vitro Slice Preparation*. *Exp. Brain Research*, 60: 54-62.

• Kita H. 1993. *GABAergic Circuit of the Striatum*. Progress Brain Research, 95:51-72.

• Knipper, M., Beck, A., Rylett, J., Breer, H. 1993. *Neurotrophin Induced Second Messenger Responses in rat Brain Synaptosomes*. NeuroReport, 4:483-486.

• Leegwater-Kim, J., Cha, JH. 2004. *The Paradigm of Huntington's disease: Therapeutic Opportunities in Neurodegeneration*. NeuroRx, 1(1): 128-138.

• Leßmann, V. 1998a. Review *Neurotrophin-Dependent Modulation of Glutamatergic Synaptic Transmission in the Mammalian CNS*. Gen. Pharmacology, 31(5): 667-674.

• Leßmann, V., Heumann, R. 1998b. *Modulation of Unitary Glutamatergic synapses by Neurotrophin-4/5 or Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hippocampal Microcultures Presynaptic Enhancement depends on pre-established paired-pulse Facilitation*. Neuroscience, 86(2): 399-413.

• Ludolph, A., He, F., Spencer, P., Hammerstad, J., Sabri, M. 1991. *3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin*. Can. Journal Neurology Science, 18: 492-498.

• Mendoza, E. 2001. *Modulación presináptica de las Aferentes Glutamatérgicas Neoestriatales para la Activación de Receptores a Opiáceos  $\mu$  y  $\delta$* . Tesis de Licenciatura. UNAM. ENEP- IZTACALA.

• Nishino, H., Kumazaki, M., Fukuda, A., Fujimoto, I., Shimano, Y., Hida, H., Deshpande, S., Shimizu, H., Morikawa, S., Inubushi, T. 1997. *Acute 3-Nitropropionic Acid Intoxication induces Striatal cell Death and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier: involvement of Dopamine Toxicity*. Neuroscience Research, 27: 343-355.

- Pandiella-Alonso, A., Malgaroli, A., Vicentini, L., Meldolesi, J. 1986. *Early rise of cytosolic Ca<sup>2+</sup> induced by NGF in PC12 and chromaffin cells*. FEBS Letters, 208: 48-51.
  
- Pansky, B., Allen, D., Budd, C. 1988. *Unit Five: The Basal Ganglia*. Review of Neuroscience. Macmillan Publishing Company. USA.
  
- Poo, M. 2001. *Neurotrophins as Synaptic Modulators*. Natural Review Neuroscience, 2(1):24-32.
  
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A., McNamara, J. 1997. *Invitación a la Neurociencia*. Ed. Medica-panamericana. Buenos Aires Argentina. 444-452 pp.
  
- Rahamimoff, R. 1968. *A Dual Effect of Calcium ions on Neuromuscular Facilitation*. Journal of Physiology, 251: 471-480.
  
- Reynolds, D., Carter, R., Morton, A. 1998. *Dopamine Modulates the Susceptibility of Striatal Neurons to 3-nitropropionic acid in the rat model of Huntington's disease*. Journal of Neuroscience, 18: 10116-10127.
  
- Saulle, E., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Tropepi, D., Pisani, A., Morari, M., Marti, M., Rossi, L., Papa, M., Bernardi, G., Calabresi, P. 2004. *Neuronal Vulnerability Following Inhibition of Mitochondrial Complex II: a possible ionic mechanism for Huntington's disease*. Molecular and Cellular Neuroscience, 25:9-20.
  
- Sheng, M., Greenberg, J. 1990. *The Regulation and Function of c-fos and other Immediate early genes in the Nervous System*. Neuron, 4: 447-485.

• Stoop, R., Poo, M. 1996. *Synaptic Modulation by Neurotrophic Factors: Differential and Synergistic Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Ciliary Neurotrophic Factor*. *The Journal of Neuroscience*, 16(10):3256-3624.

• Widmer, H., Knüsel, B., Hefti, F. 1992. *Stimulation of Phosphatidylinositol hydrolysis by Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in rat Cerebral Cortical Neurons Developing in Culture*. *Journal of Neurochemistry*, 59: 2113-2124.

• Widmer, H., Kaplan, D., Rabin, S., Beck, K., Hefti, F., Knusel, B. 1993. *Rapid Phosphorylation of Phospholipase C gamma 1 by Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in Cultures of Embryonic rat Cortical Neurons*. *Journal of Neurochemistry*, 60: 2111-2123.

• Wilson, C. 1990. *The basal Ganglia*. In: *The synaptic organization of the brain*. Ed. Sheperd G.M. Oxford University Press: New York, 279-316 pp.

• Wilson, C. 1993. *The Generation of Neural Firing Patterns in Neostriatal Neurons*. *Progress Brain Research*, 99: 277-297.

• Wilson, C. 1998. *Basal Ganglia*. In: *The Synaptic Organization of the Brain*. 4ed, Ed. Shepherd, G.M. Oxford University Press. USA. 329-376 pp.

• Wüllner, U., Young, A., Penney, J., Beal, M. 1994. *3-Nitropropionic Acid Toxicity in the Striatum*. *Journal of Neurochemistry*, 63(5):1772-1781.

• Zirrgiebel, U., Ohga, Y., Carter, B., Berninger, B., Inagaki, N., Thoenen, H., Lindholm, D. 1995. *Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival*. *Journal of Neurochemistry*, 65: 2241-2250.



- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M., Friedlander, R., Silani, V., Hayden, M., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E. 2001. *Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease*. *Science*, 293: 493-498.

- Zuccato, C., Cattaneo, E. 2007. *Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Huntington's Disease*. *Progress in Neurobiology*, 81: 294-330.