



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Estudio electrofisiológico de la modulación en la
transmisión glutamatérgica corticoestriatal por la
neurotrofina 3 (NT-3) en un modelo farmacológico de la
enfermedad de Huntington**

TESIS

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Jorge Alberto Miranda Barrientos

Asesora:

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray



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.

Dedicatorias:

Este trabajo con el que concluyo mi carrera y en sí, toda la carrera se la dedico a mis padres, el Sr. Florencio Miranda Herrera y la Sra. Aida Ivonne Barrientos Noriega, que me han apoyado y han estado conmigo cada día de mi vida;. Con su gran ejemplo me han enseñado el valor de la perseverancia, la responsabilidad, y el estudio.

Papá, mamá:

Gracias por todo lo que me han dado, gracias a ustedes soy lo que en este momento soy y me esforzare todos los días para que estén orgullosos de mi, ya que yo estoy orgulloso y agradecido con la vida de que ustedes sean mis padres y de todo el amor, cariño y comprensión que me han dado.

También este trabajo está dedicado a mi hermano, Carlos Miranda Barrientos, que a pesar de los problemas cotidianos que atañen a un par de hermanos, siempre se ha preocupado por mí y por lo que hago.

Carlillos:

Eres un gran hermano, gracias por el apoyo que he tenido de ti.

Agradecimientos:

A mis padres y a mi hermano que han estado conmigo toda mi vida y que siempre han apoyado todas las decisiones que he tomado, gracias por dejarme elegir mi carrera, mi futuro y por las palabras de aliento que me han ayudado a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi familia del lado paterno Familia Miranda Herrera que se han interesado en las cosas que hago.

A mi familia del lado materno la Familia Barrientos Noriega que se han interesado en las cosas que hago.

A los amigos y compañeros que encontré en la carrera: Mireya, Jose, Mich, Miguel, Pilar, Carmen, Chente, Christian, Enrique, Emma, Puga, Juan Carlos, Franchini y Marduck que me ayudaron e hicieron mas agradable la estancia en la carrera.

A mis amigos de la preparatoria: Diego, Gustavo, Marco, Federico, Carlos, Herwin, Elena, Diana y Natalie que siempre han mostrado interés en todo lo que hago, me han dado palabras de aliento en los momentos difíciles y siempre han confiado en mi.

A mis profesores de la carrera que me enseñaron los conocimientos necesarios para poder seguir adelante después de concluir esta etapa

A mi asesora de tesis la Doctora Elizabeth Hernández Echeagaray que me abrió las puertas de su laboratorio para desarrollar este trabajo y que durante todo este tiempo siempre me ha

ayudado a comprender las bases teóricas de mi trabajo, y se ha convertido en mi mentora en esta etapa de mi formación.

Al técnico del laboratorio Ernesto Mendoza Duarte que siempre estuvo dispuesto a ayudarme con la técnica que realicé en el laboratorio y por la asesoría teórica que me brindó cada vez que lo necesitaba

A mis amigos del laboratorio, Neto, Erika, Angélica y Sandra que han hecho la estancia en el laboratorio muy agradable y que siempre han estado ahí para ayudarme a entender mejor los conceptos necesarios para realizar este trabajo.

Al Dr. Maximiliano Ibarra que gentilmente me mostró toda la UBIMED y me presento con la que a futuro se convirtió en mi asesora de tesis.

Índice General

1.- Abreviaturas	5
2.- Introducción	7
3.- Marco teórico	10
3.1.- Capítulo I.- sistema nervioso y transmisión sináptica	10
3.11.- Ganglios basales	10
3.12.- Transmisión sináptica	13
3.13.- Tipos de sinapsis	13
3.131.- Sinapsis química	13
3.132.- Receptores ionotrópicos	14
3.133.- Receptores metabotrópicos	14
3.14.- Neurotransmisores	15
3.15.- Liberación de neurotransmisor	15
3.16.- Modulación sináptica	16
3.17.- Plasticidad	17
3.18.- Transmisión glutamatérgica	18
3.2.- Capítulo II.- Enfermedad de Huntington	19
3.21.- Alteraciones observadas en la EH	20
3.22.- Tratamiento y perspectivas en la EH	23
3.3.- Capítulo III.- modelos de la enfermedad de Huntington	25
3.31.- Modelo de la enfermedad de Huntington con 3-NP	26
3.32.- Características y estructura del 3-NP	27
3.33.- Toxicidad del 3-NP	27
3.34.- Mecanismo de acción del 3-NP	27
3.35.- Establecimiento del 3-NP como modelo de la enfermedad de Huntington	28
3.4.- Capítulo IV.- neurotrofinas	29
3.41.- Receptores de neurotrofinas y señalización	30
3.42.- Activación de la vía PLC γ	31

3.43.- Activación de la vía Ras/ERK	31
3.44.- Activación de la vía PI-3 cinasa	32
3.45.- Neurotrofina 3	33
3.46.- Estudios previos sobre efectos de la NT-3 en la modulación sináptica	33
4.- Hipótesis	35
5.- Objetivos	35
6.- Metodología	36
6.1.- Material	36
6.2.- Obtención de rebanadas	37
6.3.- Registro electrofisiológico	37
6.4.- Tratamiento de ratones con 3-NP	38
6.5.- Registro de campo	39
6.6.- Protocolo de pulso pareado	41
7.- Resultados	43
7.1.- La neurotrofina 3 modula positivamente la sinapsis glutamatérgica y disminuye la facilitación en el protocolo de pulso pareado	44
7.2.- Modulación glutamatérgica de la neurotrofina-3 en el modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington por el 3NP	47
7.3.- Comparación de la modulación en la transmisión glutamatérgica del NT-3 en condiciones control vs modelo del 3-NP	52
8.- Discusión	54
8.1.- La NT-3 incrementa la transmisión glutamatérgica corticoestriatal	54
8.2.- Activación de las vías PLC γ y PI-3 cinasa e incremento de Ca ⁺² por IP-3 relacionadas con el efecto de la NT-3	55
8.3.- Activación de receptores NMDA y NOS en la postsinapsis relacionados con el efecto de la NT-3	57

8.4.- Posible incremento en la transmisión y/o expresión de receptores AMPA pudiera explicar el efecto neuromodulador de la NT-3	58
8.5.- Modulación en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en el modelo del 3-NP de la EH	61
8.6.- Pérdida del efecto neuromodulador de la NT-3 en el modelo del 3-NP de la EH	61
8.7.- Posible relación en la activación y expresión de receptores NMDA con la pérdida del efecto de la NT-3	61
9.- Conclusiones	64
10.- Referencias	65

Índice de figuras y gráficas

Figura 1.- Esquema de ganglios basales	11
Figura 2.- Transmisión de la información vía directa e indirecta	12
Figura 3.- Tipos de sinapsis	14
Figura 4.- Pérdida de conexión corticoestriatal	22
Figura 5.- Vías de señalización activadas por las neurotrofinas	32
Figura 6.- Potencial de campo	40
Figura 7.- Propagación del potencial de acción	40
Figura 8.- facilitación y depresión por pulso pareado	42
Figura 9.- posible mecanismo molecular de la NT-3	60
Gráfica 1.- Curso temporal del % de amplitud de S ₁ control largo	43
Gráfica 2.- Curso temporal del % amplitud S ₁ en condiciones control	45
Gráfica 3.- Curso temporal del % amplitud S ₂ en condiciones control	45
Gráfica 4.- % de facilitación en condiciones control	46
Gráfica 5.- Curso temporal control largo condiciones control vs 3-NP	48
Gráfica 6.- Curva intensidad / amplitud control vs 3-NP	49
Gráfica 7.- Curso temporal del % amplitud S ₁ tratados con 3-NP	50
Gráfica 8.- Curso temporal del % amplitud S ₂ tratados con 3-NP	50
Gráfica 9.- % de facilitación tratados con 3-NP	51
Gráfica 10.- Curso temporal del % amplitud S ₁ control vs 3-NP	52
Gráfica 11.- % de facilitación condiciones control vs 3-NP	53

Abreviaturas

- 3-NP.- Ácido 3 nitropropiónico
- Akt.- Serina/treonina cinasa
- AMPA.- Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- AMPc.- Adenosina monofosfato cíclico
- ATP. Adenosina trifosfato
- BAD.- Proteína activada en la vía MAP cinasa
- BDNF.- Factor neurotrófico derivado del cerebro
- CaMKII.- Calcio calmodulin cinasa II
- CREB.- Proteína unidora del elemento de respuesta del AMPc
- DAG.- Diacilglicerol
- EH.- Enfermedad de Huntington
- ERK.- Cinasa regulada por señal extracelular
- FAD.- Flavin Adenin Dinucleótido
- GAD.- Descarboxilasa del ácido glutámico
- Glu.- Glutamato
- Grb2.- Receptor 2 de unión del factor de crecimiento
- HD-YAC.- Cromosoma artificial de levadura para la enfermedad de Huntington
- htt.- Huntingtina
- IP-3.- Inositol trifosfato
- IT-15.- transcrito interesante 15
- LTD.- Depresión a largo plazo
- LTP.- Potenciación a largo plazo
- MAP.- Proteínas activadas por mitógeno
- NMDA.- N-Metil-D-Aspartato
- NGF.- Factor de crecimiento nervioso
- NOS.- sintetasa de óxido nítrico
- NT-3.- Neurotrofina 3
- NT-4/5.- Neurotrofina 4/5

- NT-6.- Neurotrofina 6
- PI-3 K.- Fosfatidil inositol 3 cinasa
- PKA.- Proteín cinasa A
- PKC.- Protein cinasa C
- PLC- γ .- Fosfolipasa C gama
- PtdIns(4,5)P2.- Fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato
- QUIN.- Ácido quinolínico
- Ras.- Proteína activada por la vía IP-3 cinasa
- SNC.- Sistema nervioso central
- SNP.- Sistema nervioso periférico
- SNAP-25.- Proteína asociada a sinaptosoma
- Syn I.- Sinapsina I
- Trk.- Receptor tirosin cinasa
- TrkA.- Receptro tirosin cinasa A
- TrkB.- Receptor tirosin cinasa B
- TRC.- Receptor tirosin cinasa C

Introducción

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo hereditario dominante, el cual se presenta debido a la mutación del gen IT15 que codifica para una proteína de bajo peso molecular llamada Huntingtina (htt). Algunas de las características que se observan en la EH son movimientos involuntarios llamados coreas, demencia y **muerte selectiva de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado** (Graveland et al., 1985).

En los últimos años se han hecho grandes avances en la comprensión de la EH, esto gracias a estudios realizados en modelos animales tanto farmacológicos como transgénicos. Sin embargo, los mecanismos que subyacen de la fisiopatología de la enfermedad siguen sin dilucidarse por completo. Se ha sugerido que durante el establecimiento de la enfermedad existen cambios importantes en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal (Cepeda et al., 2003 y Rossi 2006), así mismo, existe evidencia de excitotoxicidad producida por la liberación masiva de glutamato y la activación exacerbada de receptores a glutamato tipo NMDA en las etapas tempranas de la enfermedad (Cepeda et al 2003). Posteriormente parece haber la desconexión entre las neuronas piramidales que proyectan sus axones hacia el núcleo estriado, y las neuronas espinosas medianas de este núcleo.

Por otra parte, algunas de las alteraciones observadas en enfermedades neurodegenerativas, se han relacionado con la disminución en el aporte de factores tróficos.

Los factores tróficos son péptidos que tienen funciones regulatorias sobre la biología, crecimiento y diferenciación celular (Therengui, 1999, Yuen 2001). En la EH se ha documentado el decremento en la expresión de BDNF (Brain derived neurotrophic factor) (Zuccato et al., 2005), factor trófico responsable de mantener la sobrevivencia de las neuronas espinosas medianas del estriado. Al parecer la huntingtina mutada altera la transcripción de BDNF en el núcleo (Zuccato et al 2001).

Debido al papel que desempeña el BDNF en la sobrevivencia de las neuronas espinosas medianas y las alteraciones ya descritas en la síntesis de BDNF durante la enfermedad, se ha generado un gran interés en el estudio del BDNF como una posible alternativa terapéutica. Sin embargo, se ha dejado de lado el estudio de las demás neurotrofinas que posiblemente podrían tener un papel importante en la protección de las neuronas espinosas medianas debido a la gran similitud que guardan entre si, tanto en estructura como en las vías de señalización que activan, lo cual las hacen candidatas para la búsqueda de nuevas maniobras terapéuticas.

En este trabajo utilizando la técnica electrofisiológica de registro de campo, reportamos el papel neuromodulador de la neurotrofina-3 (NT-3), sobre la actividad sináptica glutamatérgica de la vía corticoestriatal, tanto en condiciones fisiológicas normales como en un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington,

Con el fin de poner en un contexto adecuado los resultados obtenidos en esta investigación, este trabajo de tesis se encuentra organizado de la siguiente manera:

- En el primer capítulo del marco teórico se da un breve repaso de algunos conceptos básicos acerca del sistema nervioso, su organización, comunicación sináptica, modulación y plasticidad.
- En el segundo capítulo se enmarca el estado de conocimiento actual de la enfermedad de Huntington, su etiología, estudios realizados sobre la enfermedad y perspectivas en el estudio de la misma.
- En el tercer capítulo se habla acerca de algunos modelos experimentales usados para el estudio del Huntington, tanto farmacológicos como transgénicos haciendo énfasis en el modelo del ácido 3 nitropropiónico (3-NP) debido a que este fue el modelo utilizado en esta investigación

- En el último capítulo del marco teórico se habla acerca de la familia de las neurotrofinas, su función y su relación con la enfermedad de Huntington, profundizando en la neurotrofina 3 y el papel que tiene sobre la modulación sináptica.
- Posteriormente, en el capítulo de material y métodos se explica la metodología utilizada y se describe de manera general la técnica de registro de campo y el protocolo de pulso pareado.
- Seguido del capítulo de material y métodos se exponen los resultados obtenidos y se discuten, dando así un mejor entendimiento acerca de la modulación glutamatérgica por el NT-3 tanto en condiciones fisiológicas normales como en el modelo del 3 NP.
- Finalmente, se enlistan las conclusiones a las cuales se llegó tras realizar este trabajo de tesis y se proponen nuevas perspectivas de investigación orientadas a seguir con esta línea de investigación.

Capítulo I

Sistema Nervioso y transmisión sináptica

La organización del sistema nervioso es altamente compleja; está formada por miles de millones de células que forman circuitos altamente especializados. Esta especialización en el sistema nervioso, se debe en parte al tipo de células que contiene; las células gliales y las neuronas y por otro, a los circuitos que ellas forman.

Para su estudio, el sistema nervioso se ha dividido en sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). El SNC está formado por el cerebro, cerebelo y medula espinal, mientras que el SNP está formado por los nervios que salen de la medula espinal hacia los blancos que inervan; glándulas, músculo liso y músculo estriado e incluye al sistema nervioso autónomo con su parte simpática y parasimpática (revisado en Kandel, 1998).

El cerebro a su vez está conformado por diferentes estructuras relacionadas con diferentes funciones en el SNC. La corteza, los ganglios basales, el hipocampo, el hipotálamo entre otras, son algunas de estas estructuras y las lesiones o alteraciones en su fisiología han ayudado a discernir la función de las mismas (revisado en Purves, 2001).

Ganglios basales

Los ganglios basales son estructuras subcorticales que incluyen al núcleo caudado, el putamen los cuales forman el neocórtex, la sustancia nigra reticulata, sustancia nigra pars compacta, el globo pálido y el núcleo subtalámico (figura 1). Estos núcleos se encuentran relacionados con la ejecución de programas motores aprendidos y reciben conexiones glutamatérgicas provenientes de la corteza y del tálamo (revisado en Kandel 1998).

Las conexiones entre los ganglios basales son numerosas y ordenadas, cada conexión proveniente de la corteza proyecta sobre diferentes regiones en el estriado y se relaciona con funciones conductuales específicas (revisado en Kandel, 1998)

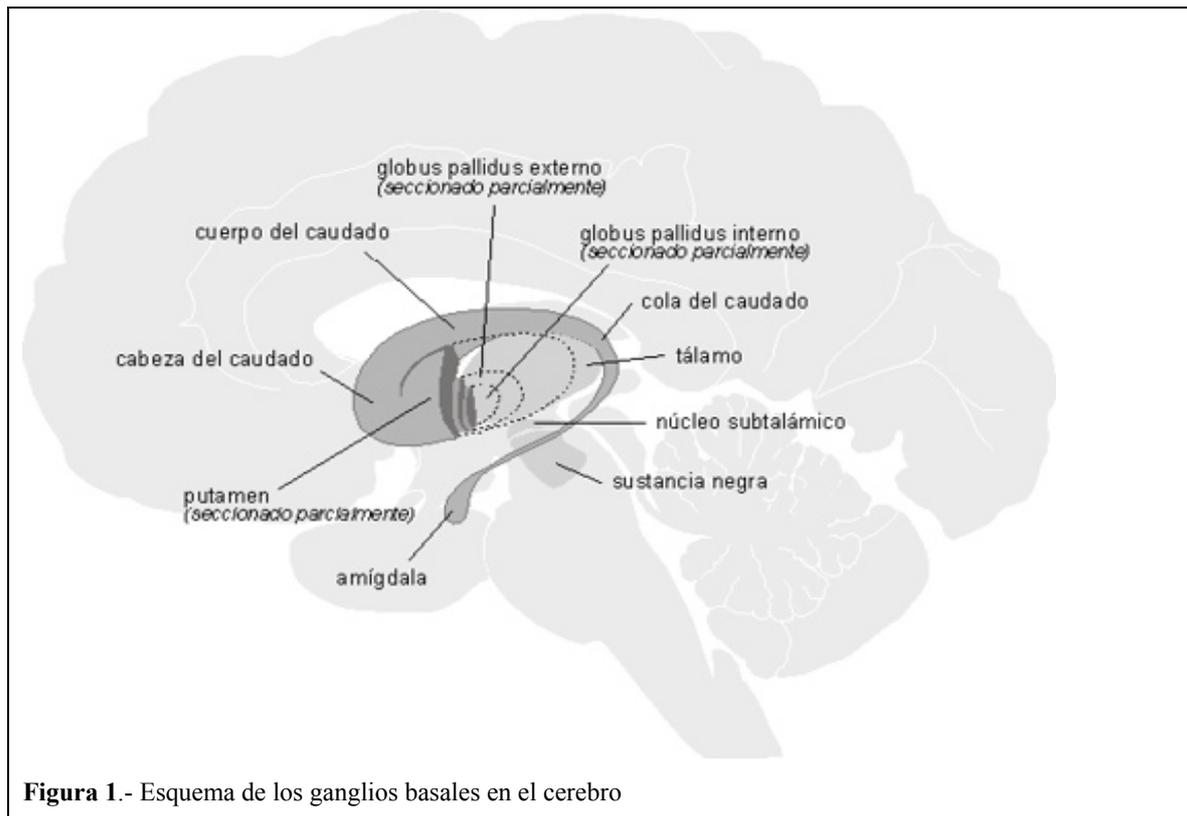


Figura 1.- Esquema de los ganglios basales en el cerebro

De manera general las conexiones glutamatérgicas provenientes de la corteza hacen contacto en el neostriado con unas neuronas de proyección llamadas neuronas espinosas medianas, las cuales son de naturaleza gabaérgica y conforman el 95% de la población neuronal del neostriado. Las neuronas espinosas medianas mandan información al tálamo a través de dos vías, la directa y la indirecta. En la vía directa los axones de las neuronas espinosas medianas proyectan sobre el globo pálido interno, en el globo pálido interno ocurre un relevo sináptico y sale la información hacia el tálamo. En la vía indirecta los axones de las espinosas medianas proyectan sobre el globo pálido externo, la información del globo pálido externo se envía a el núcleo subtalámico que posteriormente manda la información al globo pálido interno, donde al igual que en la vía directa, se manda la

información al tálamo. Después del tálamo en ambas vías la información regresa a la corteza cerrando el circuito (revisado en Kandel 1998 y Purves 2001) figura 2.

Las dos vías controlan la ejecución del movimiento, de manera general la vía directa promueve el movimiento mientras que la indirecta lo inhibe. Se ha visto que las neuronas del estriado que conforman la vía directa expresan receptores D_1 y sustancia P, mientras las que conforman la vía indirecta expresan receptores D_2 y encefalina.

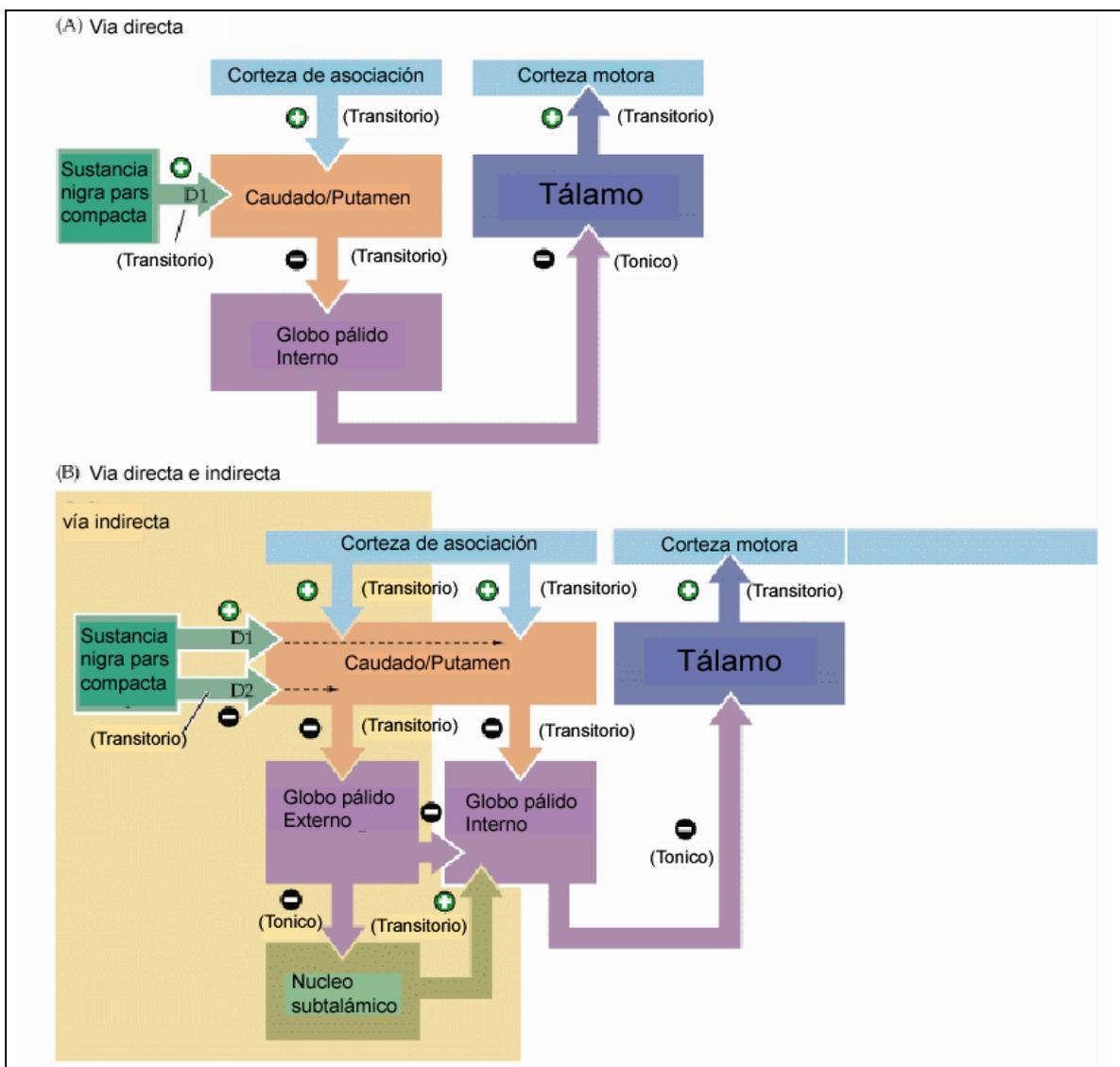


Figura 2.- Esquema que muestra la transmisión de la información en la vía directa y la vía indirecta (tomada de Purves., 2001)

Las alteraciones en los ganglios basales se han relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas asociadas a la alteración de los movimientos voluntarios como lo son el Parkinson en donde se lesiona la sustancia nigra pars compacta y el Huntington en donde se lesionan principalmente, las neuronas espinosas medianas del estriado (ver capítulo 2).

Transmisión sináptica

Tipos de sinapsis

Las neuronas se encargan de la transmisión de la información a través de una especialización anatómica y funcional llamada sinapsis. La palabra sinapsis viene de la palabra “sinapteína”, que Sir Charles Scott Sherrington y colaboradores formaron con las palabras griegas sin-, que significa "juntos", y hapteina, que significa "con firmeza". (Tomado de la Wikipedia). Existen dos tipos de sinapsis, las eléctricas y las químicas. En las sinapsis eléctricas, una neurona se comunica con otra a través de uniones estrechas llamadas gap junctions, quienes se forman por hemi canales constituidos por proteínas llamadas conexinas, que permiten el paso de iones de una célula a otra. De modo que cuando en una neurona hay cambios en el potencial de membrana, este se propaga a la otra a través de estos canales. Este tipo de sinapsis están presentes principalmente durante el desarrollo en mamíferos, en peces o invertebrados y son muy escasas en el sistema nervioso de mamíferos adultos. La velocidad con la que se llevan a cabo este tipo de sinapsis es rápida (menos de 2 microsegundos).

Sinapsis químicas

Por otro lado hay sinapsis químicas en las cuales se liberan moléculas neurotransmisoras en lugares estructural y funcionalmente especializados. En las sinapsis químicas existe una neurona presináptica la cual libera al neurotransmisor y una postsináptica, la cual tiene receptores específicos para ese neurotransmisor.

Receptores ionotrópicos

Algunos de estos receptores se encuentran acoplados a canales iónicos, de forma que, al unirse el neurotransmisor con su receptor, provocan un cambio conformacional que abre el canal iónico. Este tipo de receptores los cuales forman un canal iónico que se abre al unirse con su ligando se les llama receptor ionotrópico.

Receptores metabotrópicos

No todos los receptores de neurotransmisores están acoplados a canales iónicos, existen receptores que están acoplados a proteínas de membrana que activan cascadas de señalización después de unirse al neurotransmisor. A este tipo de receptores se les denomina receptores metabotrópicos. Los efectos que se obtienen al ser activados son más lentos que los observados con los receptores ionotrópicos ya que estos receptores no activan de manera directa a un canal iónico, si no que a través de la activación de las cascadas de señalización intracelular, ejercen sus efectos en los canales iónicos afectando la excitabilidad neuronal.

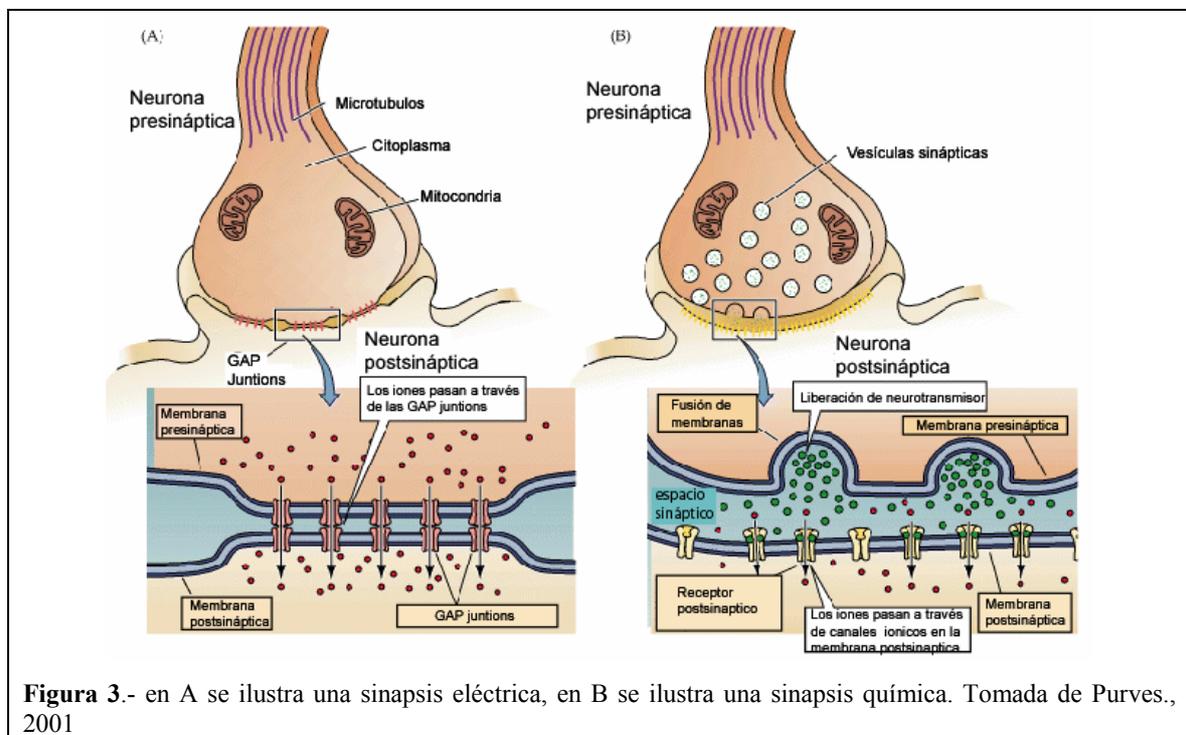


Figura 3.- en A se ilustra una sinapsis eléctrica, en B se ilustra una sinapsis química. Tomada de Purves., 2001

Neurotransmisores

Hoy en día se conocen más de 50 moléculas que actúan como neurotransmisores o neuromoduladores y su naturaleza química es diversa, así tenemos a las aminas biogénicas como la serotonina, aminoácidos como el glutamato, péptidos como la vasopresina e incluso gases como el óxido nítrico. De acuerdo al efecto que producen en la membrana postsináptica los neurotransmisores pueden dividirse en neurotransmisores excitatorios e inhibitorios. Si un neurotransmisor favorece la despolarización de la membrana, este es excitatorio, si producen una hiperpolarización este es inhibitorio.

Un gran número de neurotransmisores se encuentran almacenados en vesículas dentro de la terminal presináptica y su liberación en el espacio sináptico es el primer paso para la transmisión de la información.

Liberación de neurotransmisor

Hoy en día se encuentran bien descritos los procesos moleculares por los cuales el neurotransmisor se libera en el espacio sináptico. El mecanismo de liberación se le conoce como exocitosis. Cuando un potencial de acción llega a la célula, esta se despolariza abriendo canales de Na^+ , dejando entrar este ión a cambio de la salida de K^+ , al ocurrir esta despolarización en la terminal axónica se abren los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que se encuentran en la terminal sináptica, dejando entrar Ca^{2+} al interior de la célula; El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular induce varios procesos de señalización como la fosforilación de una proteína del citoesqueleto llamada sinapsina I, la cual ancla las vesículas que contienen al neurotransmisor con el citoesqueleto. Cuando la sinapsina I se fosforila, se liberan y se movilizan las vesículas que contienen al neurotransmisor. Por otra parte en las vesículas se encuentra varias proteínas involucradas en el proceso de exocitosis, entre ellas, una proteína llamada sinaptobrevina forma un complejo macromolecular con dos proteínas de la membrana plasmática llamadas syntaxina y SNAP-25. La formación de este complejo ocasiona que la membrana de la vesícula y la membrana plasmática se unan físicamente a través de la interacción de la sinaptofisina por parte de la vesícula sináptica

con la sinaptofilina en a membrana plasmática lo cual forma el poro de fusión por donde se libera el neurotransmisor.

La transmisión de la información y la respuesta sináptica pueden modificarse a lo largo del tiempo de diferentes maneras, este cambio involucra diferentes procesos moleculares que traen consigo un cambio en la respuesta sináptica ante un estímulo, estos mecanismos van desde la modulación de la respuesta sináptica hasta los procesos de plasticidad.

Modulación sináptica

La eficiencia en la transmisión sináptica puede modificarse a través de diferentes tipos de moléculas llamadas neuromoduladores. Los neuromoduladores actúan uniéndose a receptores metabotrópicos o del tipo tirosina cinasa, los cuales activan diversas vías de señalización interna que traen como consecuencia el incremento o decremento en la respuesta sináptica mediada por un neurotransmisor.

Un ejemplo de neuromodulador es la norepinefrina. Al unirse la norepinefrina a los receptores β , esta activa a una proteína G que a su vez activa a la adenilatociclase; esta enzima incrementa los niveles de AMPc, el cual funciona como segundo mensajero. Al incrementarse los niveles de AMPc se activan diferentes proteínas como la proteína cinasa A (PKA), ésta es capaz de fosforilar canales de K^+ haciendo que éstos se cierren, produciendo que la conductancia de potasio disminuya. Cuando un estímulo excitador llega a esa célula esta está mas susceptible a la excitación debido a la reducción en la conductancia de este ión incrementado la respuesta sináptica ante el estímulo (revisado en Bear., 2001).

El ejemplo anterior no es el único mecanismo de modulación existente. La activación de diferentes tipos de receptores por los distintos neuromoduladores en las diversas poblaciones neuronales ocasiona que se activen diferentes vías de señalización

interna, producción de distintos segundos mensajeros y por lo tanto diferentes efectos en la transmisión sináptica.

Otras vías de señalización pueden incluir el incremento en el calcio intracelular, esto es lo que ocurre cuando es activada la PLC- γ por la activación de receptores Trk que trae como consecuencia la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). La producción de IP₃ trae como consecuencia que se libere calcio intracelular de diferentes organelos como el retículo endoplásmico liso. El incremento en el Ca²⁺ intracelular puede tener diversos efectos relacionados con la exocitosis y transmisión sináptica entre otros (revisado en Bear., 2001).

Plasticidad sináptica

El reforzamiento y debilitamiento de las conexiones nerviosas son eventos comunes en el sistema nervioso y se cree que forman parte de la base molecular de procesos complejos que ocurren en el cerebro como aquellos relacionados con el aprendizaje y la memoria.

Existen diferentes tipos de plasticidad clasificándose de acuerdo a su duración en plasticidad a corto o largo plazo, además del efecto que éstos tienen, ya sea incrementando o disminuyendo la respuesta sináptica.

Ciertos tipos de actividad así como manipulaciones farmacológicas pueden generar plasticidad a largo plazo ya sea por el incremento en la respuesta a un estímulo (Long term potentiation [LTP]) o bien por el decremento (long term depression [LTD])

Los mecanismos que tratan de explicar estos dos tipos de plasticidad incluyen la activación de diferentes tipos de receptores. La activación de receptores NMDA en la postsinapsis se ha relacionado con la generación LTP mientras que la activación de receptores AMPA y receptores metabotrópicos se ha relacionado con la generación de LTD en el cerebelo (revisado en Purves., 2001)

Transmisión glutamatérgica

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia en el SNC, éste se encuentra involucrado con procesos tan diversos como la comunicación, proliferación, supervivencia celular, en la apoptosis, el aprendizaje y la memoria entre otros, así como en procesos patológicos como la epilepsia, lesiones cerebrales y en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer y la EH (Lujan. R., 2004).

Existen 3 grandes familias de receptores ionotrópicos de glutamato, los receptores AMPA, Kainato y NMDA. Estos nombres fueron dados de esta manera debido a su agonista específico. Tanto los receptores AMPA como Kainato son activados al unirse el glutamato, estos receptores están unidos a un canal iónico permeable a Na^+ y K^+ por lo que favorecen la generación potenciales de acción excitatorios (revisado en Bear., 2001).

Los receptores NMDA también son permeables a Na^+ y generan potenciales de acción excitatorios, sin embargo los receptores NMDA al ser activados también son permeables a Ca^{+2} por lo cual la activación de los receptores NMDA está relacionado con diferentes procesos tanto fisiológicos como la plasticidad sináptica así como procesos patológicos como excitotoxicidad (revisado en Bear 2001).

Los receptores NMDA en el potencial de reposo de la membrana celular se encuentran bloqueados por Mg^{+2} y a pesar de que el glutamato se una a ellos, estos receptores no se abrirán, por lo cual es necesario para la activación de los receptores NMDA que la célula se despolarice para quitar así el bloqueo de Mg^{+2} .

Los receptores AMPA y los NMDA se pueden encontrar en la misma sinapsis por lo cual es común que los potenciales sinápticos generados por glutamato tengan un componente producido por la activación de los receptores AMPA así como un componente producido por la activación de los receptores NMDA.

Capítulo II

Enfermedad de Huntington

La EH es una enfermedad poco común que afecta de 5-7 de cada 100,000 personas y es transmitida de manera autosómica dominante. En donde el gene IT15 localizado en los brazos cortos del cromosoma 4 (4p 16.3) sufre una mutación debido a la aparición de un triplete (CAG) repetido en múltiples ocasiones. En condiciones normales este gene codifica a una proteína de ≈ 350 kDa llamada huntingtina y al presentarse la mutación en dicho gene, ésta sufre una poliglutaminación. La presencia del triplete CAG en el gen IT15 es común en la población y éste se puede encontrar repetido hasta 35 veces sin que produzca la enfermedad sin embargo, cuando se pasa este número de repeticiones normales se manifiesta la enfermedad. El número de repeticiones del triplete está relacionado con la severidad de la enfermedad, a mayor número de ellas menor será la edad en que ésta se manifiesta, las personas que tienen un número de 36-40 repeticiones presentan la enfermedad sin penetrancia completa y cuando se sobrepasan las 40 repeticiones la enfermedad se presenta con penetrancia completa (revisado en Walker, 2007).

A partir de que se encontró que la huntingtina mutada era la responsable de la aparición de la enfermedad de Huntington se han hecho grandes avances en su estudio y en el entendimiento de algunos de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, sin embargo, no se ha dilucidado por completo la función de la huntingtina, ni los procesos celulares y moleculares que subyacen a la enfermedad.

En la actualidad se sabe que la Huntingtina se encuentra distribuida en todo el organismo aunque las concentraciones más altas se encuentran en el cerebro, principalmente en neuronas espinosas medianas del estriado (Strong et al 1993), sin embargo aun no se ha dilucidado su función biológica. Se creó que la huntingtina es esencial durante la embriogénesis ya que se ha observado que animales knock out del gen de la huntingtina no llegan a término, también existe evidencia que la huntingtina está relacionada con el tráfico de vesículas y en la excitotoxicidad (Di-Figlia et al 1995) por lo cual se piensa que algunas de las alteraciones provocadas por la huntingtina mutada están

relacionadas con la transmisión sináptica. Hay evidencia de que la huntingtina regula la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Zuccato et al, 2001 y Cattaneo et al, 2005) el cual, está relacionado con la sobrevivencia de las neuronas espinosas medianas, lo cual explicaría, al menos en parte, el por qué de la susceptibilidad de ese tipo neuronal durante la fisiopatología de la enfermedad.

Alteraciones observadas en la EH

Algunas de las alteraciones en el cerebro producidas por el Huntington se pueden localizar en la corteza en las placas 3,5 y 6, CA1 del hipocampo (Spargo et al 1993), el giro angular en el lóbulo parietal (McDonald et al 2002), células purkinje del cerebelo (Jeste et al 1984), el tálamo (Heinsen 1999) y en el núcleo estriado donde se observa una disminución de su volumen acompañado de un aumento en el volumen del ventrículo (Stober et al 1984).

Las alteraciones en el núcleo estriado y en especial la susceptibilidad de las neuronas espinosas medianas de este núcleo durante la EH han generado gran interés para el estudio de la enfermedad.

Una de las teorías que tratan de explicar la susceptibilidad de esta estirpe neuronal es la excitotoxicidad (DiFigglia, 1990). La excitotoxicidad es producida por una hipersensibilidad de las neuronas hacia neurotransmisores excitatorios como el glutamato. Como se mencionó previamente, la liberación de glutamato activa receptores acoplados a canales iónicos que permiten la entrada de Ca^{2+} cuyos niveles deben estar regulados de manera estricta, al incrementar la concentración de Ca^{2+} se activan cascadas intracelulares que activan caspasas y enzimas proteolíticas que pueden conducir a la muerte celular.

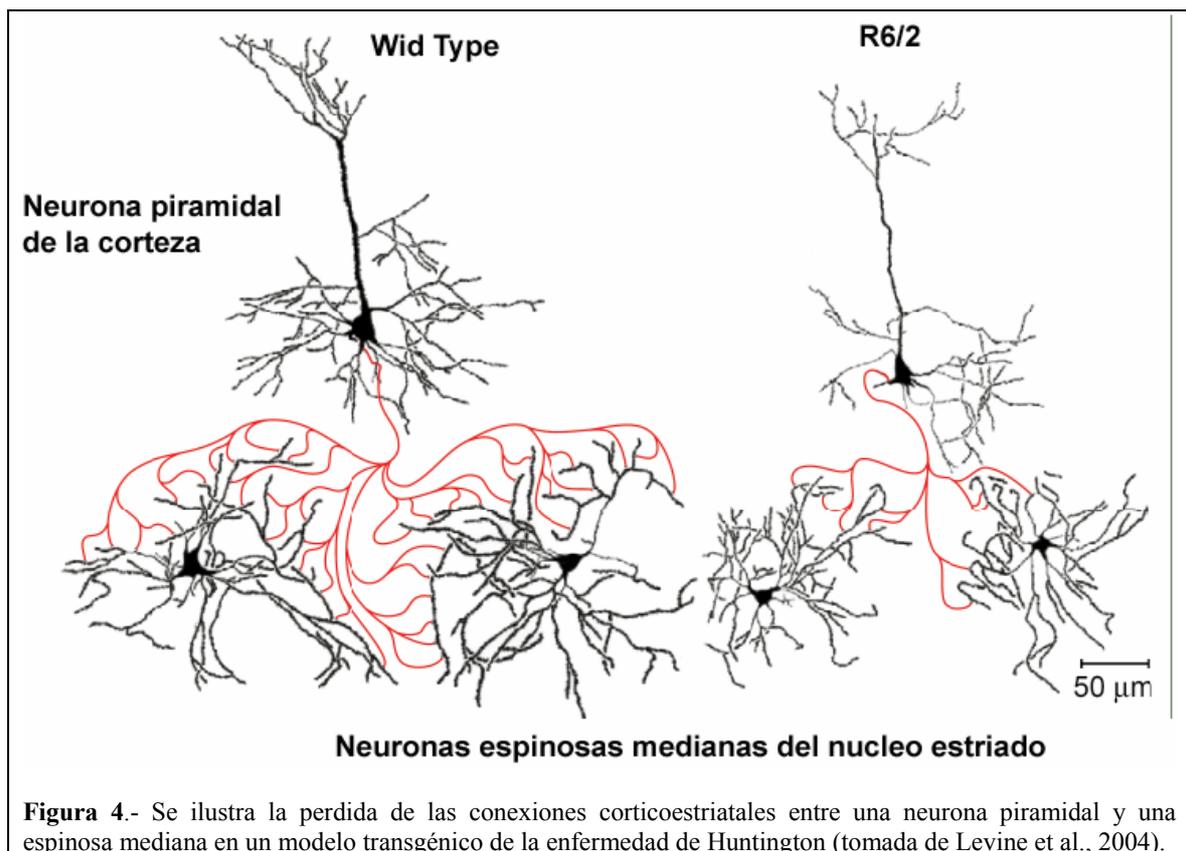
Ya que las neuronas espinosas medianas reciben una gran cantidad de conexiones glutamatérgicas provenientes de la corteza donde se han descrito alteraciones importantes y que la administración de agonistas glutamatérgicos como el ácido quinolínico reproducen diferentes síntomas observados en la EH, una alteración en la sensibilidad de las neuronas

espinosas medianas hacia el glutamato es una buena opción para tratar de explicar el deterioro observado en el núcleo estriado.

Existe evidencia electrofisiológica que indica cambios en las propiedades de reposo de la membrana plasmática de las neuronas espinosas medianas, en particular, en los ratones transgénicos R6/2 se ha visto que la capacitancia de la membrana se ve significativamente disminuida (Cepeda et al 2001), lo cual indica reducción en el tamaño celular, por otro lado se ha documentado el incremento en la resistencia de entrada, lo cual podría deberse en parte a cambios en el número y propiedades de canales de K^+ (Luthi-Carter et al., 2000). Los cambios producidos en las corrientes de potasio, las cuales se encargan de regresar a la célula al voltaje de reposo después de que ocurra un cambio en el voltaje de la membrana debido a una despolarización o hiperpolarización, hacen que las neuronas espinosas medianas permanezcan mayor tiempo despolarizadas, en parte, debido a alteraciones en la corriente rectificadora de K^+ (Ariano et al 2005), lo cual genera que los receptores NMDA los cuales son voltaje dependientes y que se encuentran bloqueados por el Mg^{2+} en el voltaje de reposo, se desbloqueen y generen una entrada masiva de Ca^{2+} , el cual puede activar diferentes vías de señalización interna que pueden ser tóxicas para la célula.

Por otra parte, también se han descrito alteraciones en la transmisión sináptica corticoestriatal a través de estudios realizados tanto en modelos transgénicos como farmacológicos de la enfermedad de Huntington (Cepeda et al 2003 y Rossi 2006) donde se ve desconexión progresiva entre las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado y las neuronas piramidales de la corteza. Las alteraciones observadas en la transmisión corticoestriatal aparecen en etapas previas a la aparición de la sintomatología de la enfermedad, lo cual indica que el daño producido por la enfermedad tiene que ser muy grande para poder observar el fenotipo conductual de la misma. Algunos investigadores creen que esta desconexión se da como un mecanismo de protección ante los insultos provocados por la hipersensibilidad de las neuronas espinosas medianas por el glutamato.

Si bien la desconexión entre las neuronas espinosas medianas y la corteza puede ser un mecanismo de protección ante la excitotoxicidad producida por el glutamato, esto no quiere decir que el glutamato no se esté liberando desde la corteza y que éste pueda activar receptores extrasinápticos de glutamato. Se ha descrito que los receptores extrasinápticos difieren en composición de las subunidades que conforman los receptores que se encuentran en la especialización sináptica. En cultivos de células hipocampales se ha observado que mientras la activación de receptores sinápticos NMDA inducen la actividad de CREB y la expresión de BDNF, la activación de los receptores extrasinápticos tiene efectos opuestos; inactivando la vía de señalización de CREB y generando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y muerte celular (Hardingham et al 2002). Teniendo en consideración lo anterior es posible que conforme se de el avance de la enfermedad el rol de los receptores extrasinápticos sea mayor contribuyendo a la degeneración.



La desconexión corticoestriatal también puede participar en la muerte de las neuronas espinosas medianas a través de la falta de aporte de factores tróficos, hay evidencia que muestra que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es liberado en la sinapsis junto con el glutamato, cuando se desconecta la neurona piramidal y la espinosa mediana, esta última deja de recibir el BDNF sintetizado por la piramidal, debido a que este factor es el encargado de la supervivencia de las neuronas espinosas medianas. La disminución en la disponibilidad de BDNF se asocia a la muerte de esta estirpe neuronal.

Tratamiento y perspectivas en la EH

En la actualidad los fármacos utilizados para el tratamiento del Huntington sólo son de mantenimiento es decir, únicamente tratan de retardar la degeneración o contender con los síntomas que se expresan durante la enfermedad, sin embargo aun no se cuenta con una terapia adecuada para el manejo de la enfermedad, por esto los investigadores tratan de encontrar terapias que mejoren la expectativa de vida de las personas afectadas por la EH. Algunos de los fármacos administrados a pacientes con EH son los inhibidores de la liberación de glutamato como el Riluzol que tratan de evitar el daño causado por la hipersensibilidad de las neuronas espinosas medianas al glutamato y la activación de receptores extrasinápticos. Una de las esperanzas como tratamiento es la utilización de BDNF exógeno que actuaría tratando de rescatar a las neuronas espinosas medianas las cuales sufren un déficit en el aporte de este factor trófico tanto por la interferencia de la huntingtina mutada en su síntesis como por la desconexión corticoestriatal que evitaría que se libere este factor en el espacio sináptico.

Se ha reportado que la administración *in vitro* de BDNF incrementa la transmisión glutamatérgica (Li et al 1998), la cual se ve en gran parte reducida en el transcurso de la enfermedad por la desconexión corticoestriatal, por lo cual el uso de BDNF podría evitar o retardar esta progresiva desconexión. Sin embargo, se debe de tener en cuenta que el incremento en la transmisión glutamatérgica debiera ser controlado ya que también se puede incrementar la conductancia de los receptores NMDA generando excitotoxicidad.

Si bien el BDNF es una alternativa terapéutica promisoriosa también existen otros péptidos emparentados con el BDNF que pudieran ayudar en el tratamiento del Huntington, dichos péptidos son los demás integrantes de la familia de las neurotrofinas; ya que por su gran similitud en estructura y vías de señalización que activan surgen también como candidatos terapéuticos (ver Capítulo 4).

Capítulo III

Modelos de la enfermedad de Huntington

Para poder comprender mejor los cambios fisiopatológicos a nivel celular que subyacen a la enfermedad de Huntington, se han generado, a lo largo del tiempo distintos modelos animales capaces de imitar diferentes características de la enfermedad de Huntington.

Debido a la complejidad de la enfermedad y dilemas éticos y morales que vienen acompañados del estudio de una enfermedad neurodegenerativa en humanos, estos modelos son muy útiles para poder comprender mejor todos aquellos procesos fisiopatológicos que se llevan a cabo durante el transcurso de la enfermedad, incluso en etapas muy tempranas donde aun no se manifiesta el fenotipo de la misma.

Algunos modelos animales hechos en roedores, primates y hasta la mosca *Drosophila* han sido utilizados en distintas aproximaciones experimentales de la EH.

Los primeros modelos utilizados para el estudio de la EH fueron modelos farmacológicos, donde a través de la administración de algún fármaco se lograba reproducir algunas características tanto conductuales como fisiológicas de la enfermedad.

El primer modelo animal de la EH fue la administración de ácido quinolínico (QUIN) en 1976, el cual es un agonista de los receptores NMDA de glutamato (revisado en Walker. 2007). También se ha empleado la administración del ácido quisqualíco y kaínico los cuales son agonistas de los receptores AMPA y Kainato, respectivamente. Otros modelos utilizan lesiones electrolíticas en el estriado.

La administración intracerebral o sistémica del ácido 3 nitropropiónico (3-NP) también se ha utilizado como modelo para el estudio de la EH. El 3-NP es un inhibidor selectivo e irreversible de la succinato deshidrogenasa del complejo II mitocondrial (Alston et al, 1977., Coles et al, 1979), la inhibición de esta enzima genera desacople metabólico de

la fosforilación oxidativa resultando en un déficit energético, debido al decremento en la producción de ATP. Esta situación conduce a las células espinosas medianas del estriado a padecer stress oxidativo. A nivel conductual, el 3-NP logra reproducir varias de las características conductuales, morfológicas y fisiopatológicas de la EH.

Posteriormente con la identificación del gene responsable de la EH en 1993, la llegada de las técnicas de biología molecular y la aparición de los primeros animales transgénicos, se ha logrado desarrollar diversos animales transgénicos en los cuales se ha podido incluir en el genoma del animal el gene de la EH que codifica para la huntingtina mutada. Con esto, los animales desarrollan la patofisiología de manera muy similar a la que aparece en los humanos, evitando la alteración de otros sistemas como lo que ocurre con la administración sistémica de fármacos para producir el modelo de la EH (García-Ramos et al 2007).

Existen modelos transgénicos a los cuales les es incorporado todo el gene IT15 como los HD-YAC (Yeast Artificial Chromosome), en otros modelos tan solo se les incorpora el exón 1 de este gene, como en la cepa R6/2. La forma como se incorpora el inserto transgénico, así como el número de repeticiones del triplete CAG en el transgen genera la aparición de diferentes sintomatologías y alteraciones relacionadas con la EH así como la severidad de estas (García-Ramos, R., 2007).

Modelo de enfermedad de Huntington con ácido 3 nitropropiónico

El 3-NP fue originalmente aislado por Gorter en 1920 como ácido hiptagénico de una planta llamada *hiptage benghalensis*, el cual erróneamente se caracterizó como ácido hidroxámico. Posteriormente, Carter y McChesny corrigieron la estructura del ácido hiptagénico como ácido 3- nitropropiónico, el cual fue el primer compuesto orgánico nitrogenado aislado de una planta.

Características químicas y estructura del ácido 3-nitropropiónico

El 3-NP es un ácido carboxílico de tres carbonos, con un sustituyente nitro en el tercer carbono, el cual le da características muy distintas al ácido propiónico. El sustituyente nitro le proporciona electroactividad al compuesto lo cual le proporciona sus propiedades farmacológicas.

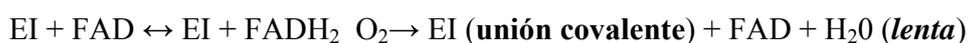
Toxicidad del 3-NP

El 3-NP inhibe *in vitro* tanto a la succinato deshidrogenasa como a la fumarasa, siendo así que la inhibición sobre la succinato deshidrogenasa es de manera irreversible, mientras que la fumarasa es de manera reversible. Como ya antes se mencionó, el grupo nitro en el carbono tres le proporciona actividad biológica al 3-NP y su forma di aniónica es la que le permite inhibir irreversiblemente a la succinato deshidrogenasa.

Mecanismo de acción:

El 3-NP tiene una gran similitud estructural con el ácido succínico, por lo cual la inhibición sobre la succinato deshidrogenasa se da de manera competitiva. El mecanismo molecular por el cual el 3-NP inhibe a la succinato deshidrogenasa, está dado en dos etapas; en la primera etapa el 3-NP inhibe de manera rápida pero no irreversible a la enzima, posteriormente una molécula de Flavin Adenina Dinucleotido (FAD), oxida al 3-NP en 3-nitroacrilato el cual va a unirse a los grupos sulfhidrilo del sitio activo de la enzima por enlaces covalentes produciendo así una inhibición irreversible de la enzima. Esta segunda etapa se lleva con una velocidad de reacción mucho menor a la de la primera etapa.

Mecanismo de acción 3-NP



E = Enzima (Succinato deshidrogenasa) I = inhibidor (3-NP) FAD= Flavin adenina dinucleotido

Establecimiento del 3-NP como modelo de HD

Los primeros indicios de que el ácido 3 nitropropiónico emula diversas características fisiopatológicas de la EH, se dio después de que se presentaron diversos casos de intoxicación por consumo de la caña de azúcar en China. Las personas afectadas manifestaron síntomas parecidos a los reportados para la EH. Durante los estudios realizados para conocer las causas de la intoxicación, se aislaron varias especies de *Artthrinium* las cuales producían 3-NP y se logró aislar este compuesto y determinar que este era el responsable de las intoxicaciones y los síntomas mostrados.

Hay evidencia que muestra que la administración del 3-NP induce muerte celular selectiva de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado (Broulliet et al., 1995; Saulle et al., 2003).

Si bien en la actualidad los modelos transgénicos de la EH proporcionan gran parte de la información nueva que se obtiene para el estudio de esta enfermedad y su uso es cada vez mayor, el modelo del 3-NP no está en desuso debido a que reproduce diversas características anatómicas y conductuales observadas en los cerebros postmortem de pacientes afectados por la EH, así como el fenotipo conductual y varias de las alteraciones celulares y moleculares observadas en los cerebros de los modelos animales transgénicos de la EH.

Existen estudios donde se comparan los modelos transgénico y el modelo del 3NP y se encuentran alteraciones semejantes, por ejemplo alteraciones en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal (Cepeda et al., 2003; Rossi et al., 2006).

Capítulo IV

Neurotrofinas

Las neurotrofinas son péptidos que forman parte de un grupo de moléculas llamadas factores tróficos pero cuyas acciones se sitúan en el sistema nervioso, estos factores tróficos son proteínas secretadas por diferentes líneas celulares y tienen funciones regulatorias sobre la biología, crecimiento y diferenciación celular durante el desarrollo y etapas adultas del organismo (Therengui, 1999, Yuen 2001).

El grupo de las neurotrofinas son moléculas funcional y estructuralmente relacionadas que incluyen al factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT4/5).

La primer neurotrofina se describió en 1948 y fue el NGF por Rita Levi-Montalcini. En ese entonces se encontró que el NGF tenía funciones regulatorias sobre poblaciones específicas de neuronas periféricas (revisado en Levi-Montalcini. 1987). Posteriormente en los años 80's Yves Barde, Hans Thoenen y colaboradores purificaron un péptido al cual llamaron factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual promovía la sobrevivencia de neuronas sensoriales periféricas (revisado en Purves, 2001). Posteriormente 6 laboratorios independientes reportaron un tercer miembro de la familia de las neurotrofinas al cual se le llamó neurotrofina-3 (NT-3) (revisado en Purves 2001) que al igual que los dos anteriores tiene funciones regulatorias sobre poblaciones neuronales específicas (Huang et al., 2001). Hoy en día se han descrito otros miembros de esta familia como lo son la NT-4/5 y la NT-6 (revisado en Purves 2001).

Las neurotrofinas ejercen sus funciones biológicas uniéndose a receptores celulares que se encuentran en las membranas de sus células blanco. Los receptores de las neurotrofinas son parte de la familia de receptores tirosina cinasa (Trk); cada neurotrofina tiene un receptor específico de alta afinidad, siendo el receptor específico para el NGF el TrkA, el receptor para el BDNF es el TrkB mientras que el NT-3 es el TrkC y finalmente para el NT-4/5 es el TrkB al igual que para el BDNF. Existe también un receptor común a

todas las neurotrofinas, el cual es un receptor de baja afinidad llamado p75, el cual tiene actividad regulatoria sobre la acción de las neurotrofinas (Huang et al 2003).

Los diferentes receptores para las neurotrofinas tienen una distribución heterogénea en el sistema nervioso lo cual genera que las neurotrofinas actúen en sitios y poblaciones específicos del sistema nervioso, sin embargo una misma población neuronal puede tener diferentes receptores a neurotrofinas. Así mismo, las neurotrofinas pueden tener efectos diferentes en otras poblaciones neuronales y varias neurotrofinas pueden tener efecto en una sola población neuronal (Huang et al, 2001).

Algunos estudios muestran que las neurotrofinas pueden tener dos modos de acción sobre la actividad sináptica en función del tiempo: la potenciación de las conexiones a corto plazo la cual toma segundos o minutos y uno a largo plazo donde existe formación de nuevas conexiones nerviosas y plasticidad que toma horas o días (Lu, 2004).

Receptores de neurotrofinas y señalización

El mecanismo de acción de las neurotrofinas después de haberse unido a su receptor específico Trk, es mediante la cascada de activación de las tirosina cinasas las cuales pueden ejercer su acción mediante tres vías de señalización, la fosfolipasa C (PLC γ), la activación de la fosfatidilinositol cinasa (PI-3K) y las MAP cinasas, las cuales entre otras cosas, activan factores de transcripción en el núcleo y tienen efectos sobre la diferenciación celular, inactivación de proteínas pro-apoptóticas, crecimiento axónico, arborización y sobrevivencia de las células.

Los receptores Trk contienen 10 residuos de tirosina conservados en todos los receptores Trk, estos residuos son fosforilados cuando la neurotrofina se une al receptor Trk. Los residuos Y670, Y674 y Y675 son fosforilados primero y controlan la actividad cinasa del receptor; posteriormente se fosforilan los demás residuos de tirosina, quienes generan sitios de anclaje de diferentes proteínas, permitiendo la activación de las diferentes vías de señalización de las neurotrofinas (Huang et al 2001).

Como se mencionó con anterioridad, además de los respectivos receptores específicos Trk a neurotrofinas la presencia del receptor común el p75 es determinante para que se logre tener un efecto con las neurotrofinas. Se ha encontrado que es necesaria una interacción previa de la neurotrofina con el p75 para ocasionar una modificación en la estructura tridimensional de la neurotrofina y que esta pueda unirse con mayor especificidad a su respectivo receptor Trk (Hunag., 2003) y poder desencadenar la cascada de señalización a través de alguna o varias de las vías de señalización anteriormente mencionadas.

Activación de la vía PLC γ

Se ha visto que al ser fosforilado el residuo Y785 de tirosina del Trk, recluta a la PLC γ que al ser fosforilada, se activa y ésta hidroliza a algunos ácidos grasos formando inositol trifosfato (IP3) y diacil glicerol (DAG). El inositol trifosfato produce incremento del calcio intracelular al liberar el calcio de sus reservorios intracelulares; el calcio a su vez activa diferentes proteínas como la calcio-calmodulina cinasa, fosfatasas y algunas isoformas de la proteína cinasa C. La producción de DAG activa a algunas isoformas de la proteína cinasa C regulada por DAG. En las células PC 12 se ha visto que la activación de la proteína cinasa C y sus isoformas reguladas por DAG son necesarias para el crecimiento neurítico (Huang 2001).

Activación de la vía Ras/ERK (MAP Kinasas)

La activación de RAS/ERK es muy compleja en un primer paso, después de la fosforilación del residuo Y4910 de tirosina se recluta a la proteína sch, al ser fosforilada sch ésta recluta un complejo formado por Grb2 y el factor de intercambio de Ras (SOS), éste complejo activa a RAS generando diversas vías de señalización intracelulares, entre ellas se encuentra la activación de PI3 cinasa, la activación de la vía raf/ERK, la activación de la p38 MAP cinasa. La vía de activación de la ERK activa finalmente factores de transcripción como CREB, que son indispensables para la sobrevivencia y diferenciación diversas líneas celulares (Huang, 2001).

Activación de la vía PI-3 cinasa

La PI-3 cinasa puede activarse por una vía dependiente de RAS y por otra independiente de RAS, donde en la primera; PI-3 es activada directamente por la acción de RAS y en la otra vía esta es activada por un complejo de Grb2 que activa a proteínas GAB y estas activan a PI-3. Los productos de la activación de IP-3 activan Akt, la cual tiene efectos sobre un gran número de enzimas que promueven la supervivencia neuronal. Akt actúa inhibiendo a BAD la cual es una proteína proapoptótica, también inhibe a p53 y activa la vía de las MAP cinasas, que ésta a su vez, activa factores de transcripción necesarios para la supervivencia celular (Huang 2003) ya antes descritos.

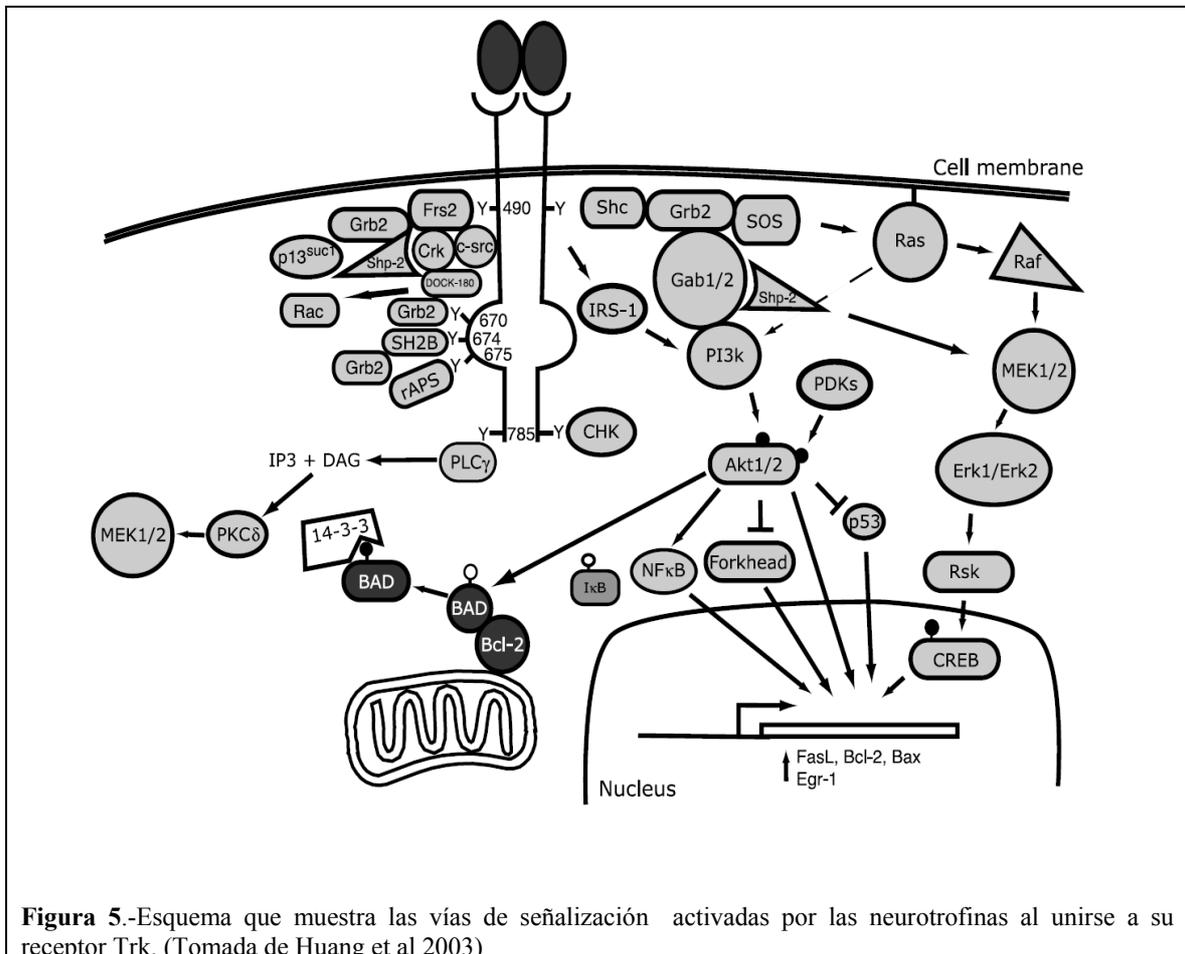


Figura 5.-Esquema que muestra las vías de señalización activadas por las neurotrofinas al unirse a su receptor Trk. (Tomada de Huang et al 2003)

Neurotrofina 3

La neurotrofina 3 (NT-3) es parte de la familia del gene del factor de crecimiento nervioso (NGF) y se ha encontrado que sostiene la sobrevivencia y diferenciación de neuronas sensoriales periféricas (Ernfors, 1990), así como que incrementa la sobrevivencia y diferenciación de neuronas de la médula espinal (Henderson, 1993), del ganglio auditivo (Ávila, 1993) y del hipocampo (Collazo, 1992), además de inducir la diferenciación de precursores corticales.

Aun no se conoce con exactitud los mecanismos moleculares por los cuales el NT-3 ejerce sus efectos, sin embargo se sabe que el NT-3 al unirse con su receptor Trk C, incrementa las concentraciones de calcio intracelular y modula los canales de calcio/potasio mediante una cadena de señalización tirosina cinasa en corteza, hipotálamo e hipocampo

La mayoría de los estudios realizados con NT-3 se han hecho en el sistema nervioso periférico (SNP) debido a que los receptores TrkC están ampliamente distribuidos en el SNP y poco se ha hecho en el sistema nervioso central (SNC); algunos trabajos en el SNC han evaluado la modulación sináptica en el hipocampo, corteza e hipotálamo, sin embargo aun no se ha reportado como modula la respuesta glutamatérgica en el núcleo estriado.

Estudios previos sobre los efectos del NT-3 en la modulación sináptica

A pesar de que aún no se ha estudiado como el NT-3 modula la transmisión glutamatérgica en el núcleo estriado, si se han realizado estudios sobre la modulación sináptica del NT-3 en otros núcleos del sistema nervioso como hipotálamo y corteza.

Se ha reportado que el NT-3 potencia la transmisión glutamatérgica en cultivos de células corticales mediante la inhibición de la transmisión GABAérgica (Kim. et al., 1994), sin embargo esta inhibición de la transmisión GABAérgica que tiene como consecuencia un incremento en la actividad glutamatérgica no ocurre así en periodos previos del desarrollo y establecimiento del sistema nervioso. En periodos del desarrollo donde GABA tiene una

función excitatoria en el sistema nervioso central, el NT-3 tiene una regulación positiva de la transmisión GABAérgica en cultivos de células de hipotálamo (Gao and Van den Pol., 1999).

Como se mencionó con anterioridad, aun no se sabe con exactitud el papel que desempeña la NT-3 en el núcleo estriado, sin embargo por estudios realizados en el laboratorio, sabemos que la NT-3 se expresa en las células del núcleo estriado hacia los 42 días posnatales en células positivas a la GAD por lo que la NT-3 podría participar en el funcionamiento estriatal.

Si bien en la EH las alteraciones en los niveles de BDNF son una causa posible de la muerte de las neuronas espinosas medianas y la utilización de este factor trófico es una alternativa terapéutica prometedora, la utilización de otros factores tróficos como la NT-3 para el tratamiento de la enfermedad aun son una alternativa poco estudiada.

Posiblemente el primer candidato después del BDNF para ser estudiado como alternativa terapéutica es el NT-4/5 debido a que activa el mismo receptor, sin embargo se sabe que la expresión del receptor TrkB está disminuida tanto en el estriado posmortem de pacientes de Huntington, como en modelos animales de la enfermedad (Gines et al., 2006), por lo cual la búsqueda de otros factores tróficos que activen otros receptores Trk es también atractiva.

HIPOTESIS

La actividad glutamatérgica corticoestriatal puede modularse con la neurotrofina-3 y esta modulación se alterará en animales tratados con el inhibidor mitocondrial 3NP.

Objetivo general:

- Evaluar electrofisiológicamente con la técnica de registro poblacional si; la neurotrofina-3 modula la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en cerebros de ratones en condiciones fisiológicas normales y en el modelo farmacológico de ácido 3-nitropropiónico

Objetivos particulares:

- Evaluar electrofisiológicamente con la técnica de potencial de campo, si la neurotrofina-3 modula la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en rebanadas de tejido cerebral provenientes de ratones control
- Evaluar electrofisiológicamente con la técnica de potencial de campo, si la neurotrofina-3 modula la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en rebanadas de tejido cerebral provenientes de ratones tratados con el 3-NP para inducir el modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington.
- Evaluar si el efecto de la neurotrofina-3 en la modulación de la transmisión glutamatérgica corticoestriatal es a nivel pre y/o postsináptico mediante el estudio de los cambios en la facilitación por pulso pareado.

Material y Método

Material:

Material biológico

- Ratones macho de la cepa C57/BL6 de 30 días de nacidos de Harlam.

Reactivos:

- Ácido ascórbico
- Bicarbonato de sodio
- Bicuculina
- Cloruro de calcio
- Cloruro de magnesio
- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- Glucosa
- Neurotrofina 3
- Tiourea

Obtención de rebanadas

Se utilizaron ratones C57/BL6 de 30 días de nacidos (al comienzo del tratamiento) los cuales se anestesiaron profundamente con éter etílico y posteriormente eran sacrificados mediante decapitación. El cerebro se extrajo del cráneo, se le cortó los bulbos olfatorios y el cerebelo y se sumergió por 60 segundos en solución isotónica fría (4° C), que contenía: (Cloruro de calcio (2 mM), Cloruro de potasio (3 mM), Cloruro de magnesio (1 mM), Cloruro de sodio (125 mM), Bicarbonato de sodio (26 mM), Tiourea (0.20 mM), Glucosa (0.01 M), Ácido ascórbico (0.20 mM) pH 7.4). Trascorrido un minuto se separaron los dos hemisferios, se colocaron en un vibratomo y se realizaron cortes sagitales de 400 micrómetros. Las rebanadas se incubaron por 1 hora en la misma solución isotónica a temperatura ambiente antes de realizar el registro.

Registro electrofisiológico

Las rebanadas utilizadas para el registro eran colocadas en la cámara de registro donde se perfundían con la misma solución antes descrita, gasificada constantemente con una mezcla 95%/5% O₂/CO₂. Se añadía bicuculina (antagonista, bloqueador de receptores GABA A) (10 µM) al baño para bloquear las corrientes GABAérgicas, en la cámara de registro con un flujo de 1-1.5 ml/min. En los experimentos en los cuales se administró la neurotrofina-3 (50ng/ml) esta era incorporada al baño.

El registro electrofisiológico se realizó en el estriado dorsolateral, utilizando para ello un electrodo de estimulación bipolar situado en el cuerpo caloso para estimular los axones de las neuronas piramidales de la corteza que inervan al estriado. Así mismo, la señal se detectó con un electrodo de registro (borosilicato) situado aproximadamente entre 2 y 3 milímetros del electrodo de estimulación, éste contenía la misma solución isotónica antes mencionada en el interior. Se utilizó un protocolo de pulso pareado con un distancia de 50 milisegundos entre cada pulso para evocar la respuesta poblacional y evaluar cambios en la facilitación.

La estimulación utilizada para evocar la espiga poblacional oscilaba en un rango de 5 a 30 mV y con una duración de aproximadamente entre 100 y 200 microsegundos, una vez encontrada una respuesta poblacional tanto el voltaje como la duración eran ajustados para obtener una mejor espiga poblacional. Para ajustar el voltaje al cual se realizó el registro, en cada rebanada se realizó una curva intensidad-respuesta y se tomó el voltaje que pudiera evocar la amplitud media de la respuesta poblacional y con una facilitación de aproximadamente 1.5, la frecuencia con la que se estimulaba era de 0.1 Hz.

Para los controles largos se grabaron aproximadamente entre 30-40 minutos con estimulación continua con el fin de demostrar que la respuesta obtenida no se veía afectada a lo largo del tiempo. En los experimentos donde se administró el NT-3 se grabaron primero aproximadamente 10 minutos de control, posteriormente se añadía al baño la neurotrofina-3 en presencia de bicuculina y se grababa aproximadamente 30 minutos, posteriormente se realizaba un lavado y se grababa durante 10-15 minutos más.

Los datos obtenidos de los registros se digitalizaron con ayuda de la tarjeta ATM10 acoplada a un sistema de análisis de señales de un programa hecho en casa y se analizaron y graficaron con el software Origin 7.0.

Tratamiento de ratones con 3-NP

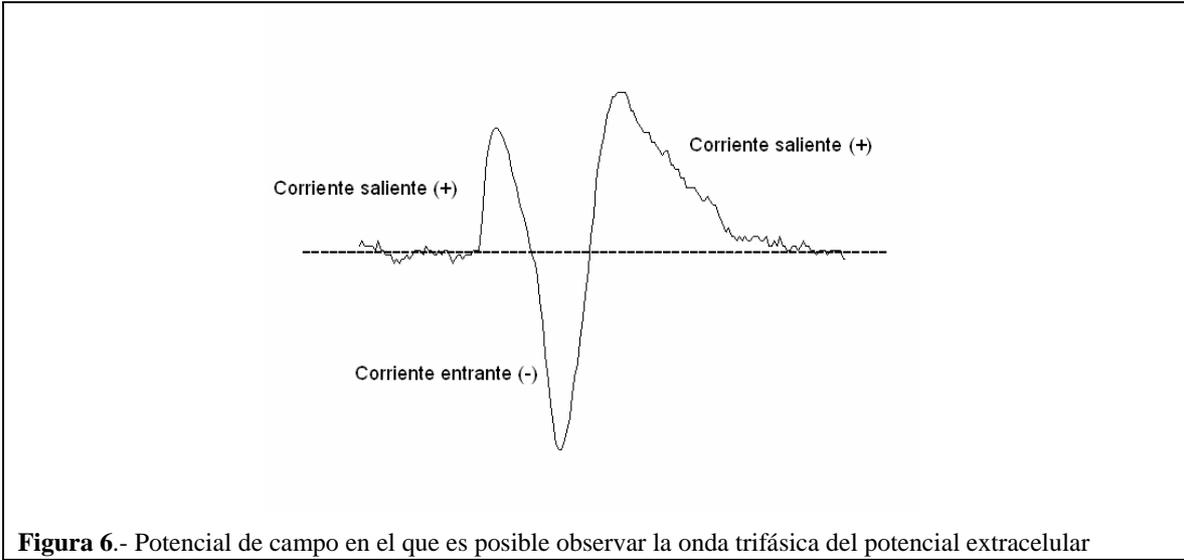
Para el tratamiento de los ratones con 3-NP se administró el 3-NP en una dosis de 15 mg/Kg vía intraperitoneal durante 5 días y se realizó el registro electrofisiológico a las 48 hrs después de la última administración.

Registro de Campo

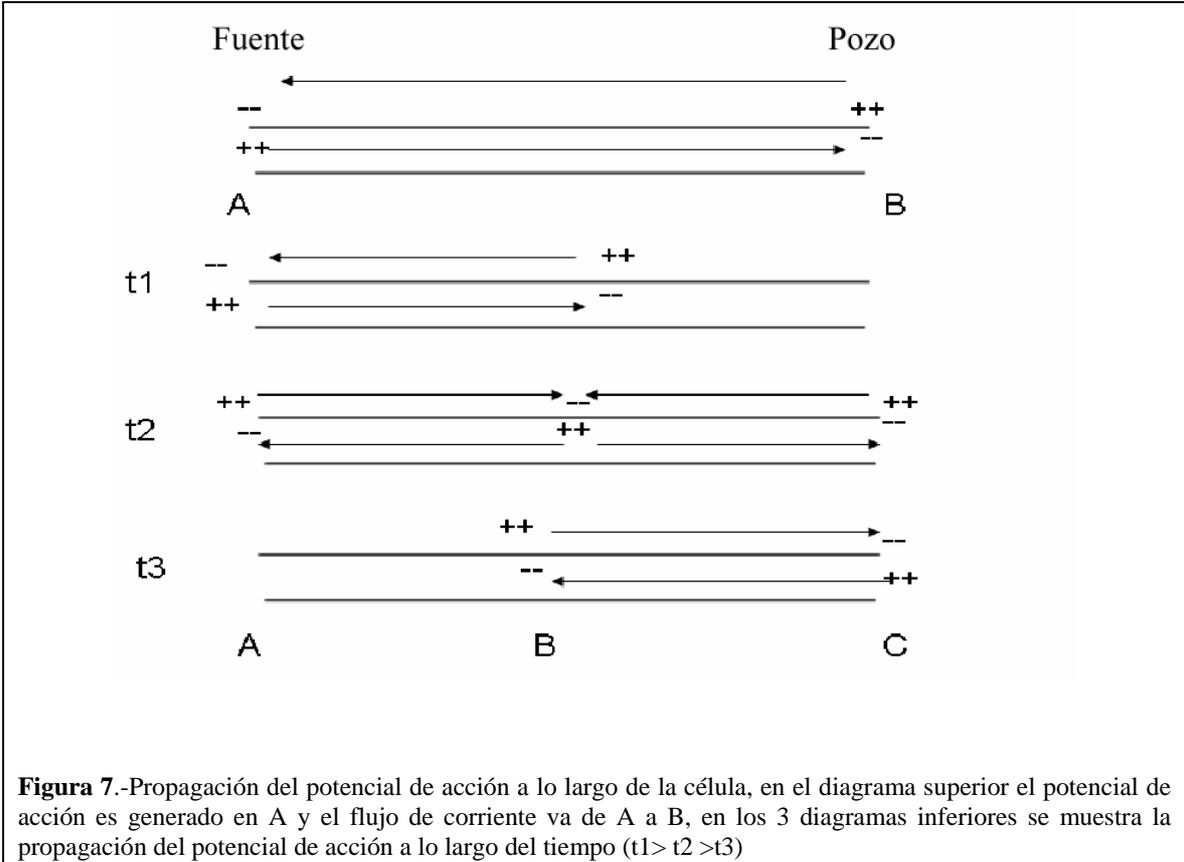
El potencial de campo es una técnica electrofisiológica que permite realizar registros extracelulares de una población neuronal que permite observar los cambios en las corrientes iónicas resultado de la sumatoria de varios potenciales de acción sincronizados, asociados a la actividad de dicha población neuronal. Por lo tanto, el tamaño de una espiga poblacional está dado por el tamaño de la población neuronal.

El medio extracelular donde se encuentra la población neuronal, funciona como un conductor permitiendo que las corrientes se propaguen a través de la neurona. En estado de reposo una neurona está uniformemente polarizada, por lo que no hay ningún flujo de corriente, sin embargo, cuando una neurona se activa por un impulso nervioso o un estímulo eléctrico artificial como en el caso de un registro *in vitro*; ésta deja de estar uniformemente polarizada y crea flujos de corriente comportándose como un dipolo.

En un potencial extracelular se pueden observar los cambios en las corrientes debido a la formación de pozos y fuentes (los pozos son corrientes entrantes a las células y son por convenio representados negativamente (-), las fuentes son corrientes salientes y son representadas por convenio positivamente (+)). Generalmente cuando se observa un potencial de acción o de campo registrado extracelularmente este es una onda trifásica (figura 6). Esto es debido al cambio en la posición de los pozos y fuentes a lo largo del tiempo, es decir; al generarse un potencial de acción en un sitio determinado de la célula (A), este genera que en el sitio donde se produjo el potencial exista una corriente entrante y por lo tanto un pozo, al mismo tiempo se produce una diferencia en la corriente con respecto a un punto lejano en la célula (B) produciendo así una fuente con respecto al punto A, posteriormente al propagarse la corriente, el punto B se convierte en un pozo y A pasa a ser una fuente, al seguir propagándose la corriente B vuelve a convertirse en una fuente mientras que en otro punto lejano de B por la diferencia en la corriente se genera un pozo (revisado en Johnston., 1995; ver figura 7).



Los potenciales de campo al evaluar el comportamiento de una población permiten evaluar el comportamiento de la población misma ante un impulso y descartar efectos obtenidos por el comportamiento único de una célula.



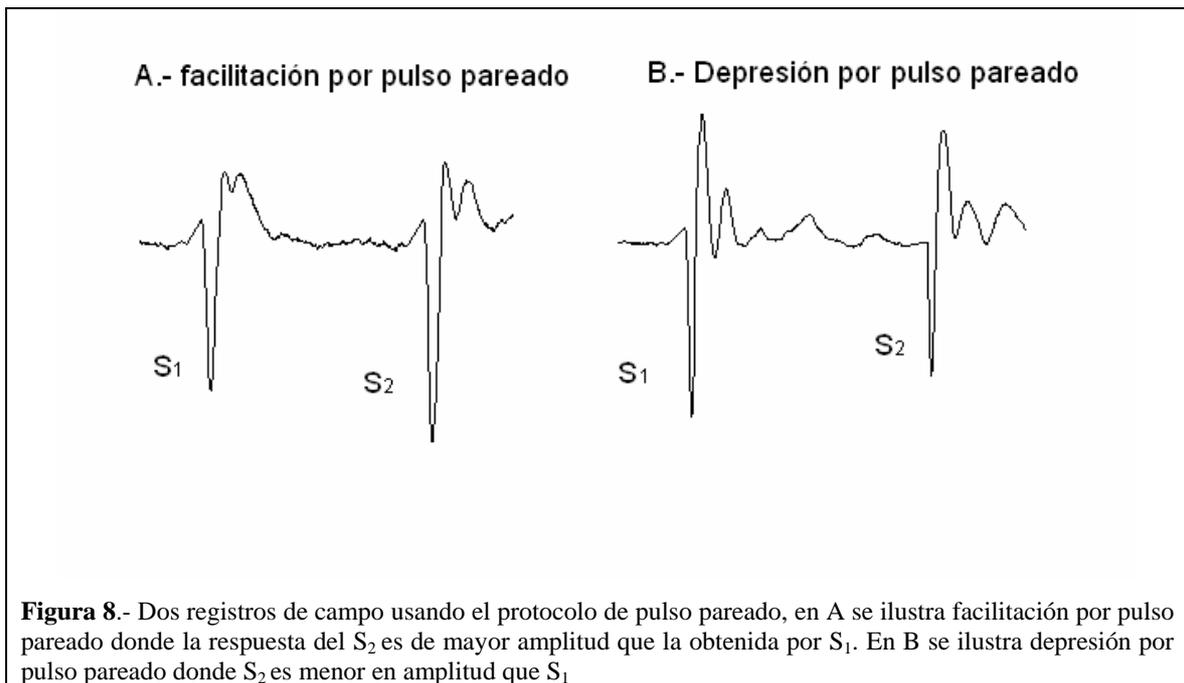
Protocolo de pulso pareado

El protocolo de pulso pareado consiste en dar dos estímulos de la misma intensidad y duración, cercanos en el tiempo, esto genera que la respuesta al segundo estímulo se vea influenciada por el primero, así dependiendo de la intensidad incrementará o decrementará la amplitud de la respuesta, estos cambios en la respuesta pueden ser mediados por mecanismos presinápticos y/o postsinápticos.

Cuando se estimula una neurona con un pulso eléctrico, ésta se despolariza y produce que los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes que se encuentran en la terminal nerviosa se abran dejando entrar Ca^{2+} al interior de la célula, el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, genera entre otras cosas, que las vesículas que contiene al neurotransmisor se fusionen con la membrana plasmática y éste sea liberado en el espacio sináptico. El Ca^{2+} regresa a sus concentraciones intracelulares normales mediante mecanismos encargados de amortiguar las concentraciones de calcio, sin embargo, los sistemas de amortiguamiento de calcio tienen cinéticas más lentas que los sistemas que dejan entrar al Ca^{2+} por lo cual, si existe un segundo estímulo cercano en el tiempo este genera que otra vez se abran los canales de Ca^{2+} y el Ca^{2+} entre de nuevo a la célula. Si la estimulación ocurre antes de que el Ca^{2+} haya regresado a las concentraciones basales, se suma con el Ca^{2+} que entra en la respuesta al segundo estímulo al que ya se encontraba en la terminal por lo cual existe una sumatoria de Ca^{2+} y se produce una mayor probabilidad de liberación de neurotransmisor en el segundo impulso, este mecanismo se le conoce como teoría del calcio residual (ver Katz y Miledi, 1968).

De igual forma, si desde el primer estímulo se libera mucho neurotransmisor por la intensidad de la estimulación se genera depresión por pulso pareado (figura 8). Cuando se utilizan concentraciones altas de Ca^{2+} (4mM) o bien el primer estímulo es muy grande, la entrada masiva de calcio vacían las vesículas presinápticas con el primer estímulo, haciendo que cuando llegue el segundo estímulo haya menos neurotransmisor disponible que liberar.

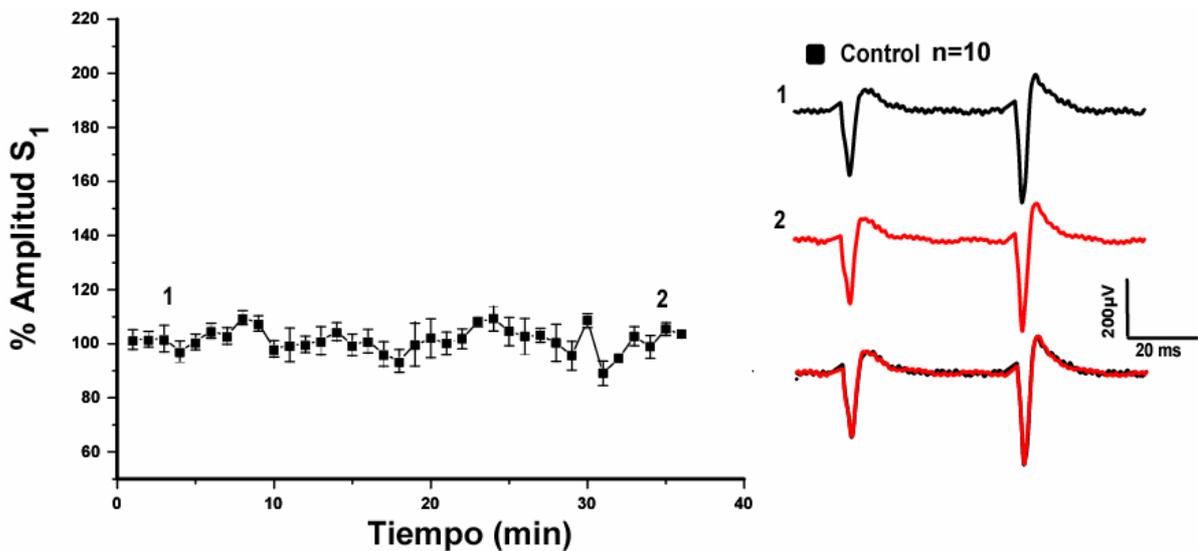
Evaluar la relación S_2/S_1 permite dilucidar si el efecto observado por la acción de un fármaco se encuentra a nivel pre o postsináptico. Si un fármaco tiene efecto a nivel postsináptico la relación S_2/S_1 no cambiará, debido a que se seguirá liberando la misma cantidad de neurotransmisor en S_1 y S_2 antes y después de la administración del fármaco, sin embargo los receptores postsinápticos generarán una respuesta mayor o menor con la misma cantidad de neurotransmisor con respecto a antes de la administración del fármaco debido a la apertura de un mayor o menor número de canales que se encuentren en la postsinapsis o bien, de un mayor o menor tiempo en el que estos permanezcan abiertos. Si la relación S_2/S_1 se modifica, estaría ocurriendo un cambio en la liberación de neurotransmisor, si el efecto del fármaco es incrementar la liberación del neurotransmisor, el S_1 incrementará y a pesar de que ocurra una sumatoria de Ca^{2+} la respuesta del S_2 no incrementará debido a la finita disponibilidad de neurotransmisor en la terminal sináptica.



Resultados

En este trabajo de tesis se evaluó la modulación de la neurotrofina 3 (NT-3) sobre las aferentes glutamatérgicas corticoestriatales, usando la técnica de registro de campo con el protocolo de pulso pareado.

Con la finalidad de mostrar que la amplitud de la espiga poblacional obtenida en un registro poblacional no cambia durante el tiempo, los primeros experimentos realizados fueron controles de más de 30 minutos de duración. La gráfica 1 muestra el porcentaje de la amplitud de la espiga poblacional del S_1 en un periodo de 38 minutos, como puede observarse, no existen cambios en la amplitud durante el transcurso del registro. Este tipo de experimentos nos permite atribuir cualquier cambio en la amplitud de la respuesta del S_1 a la manipulación farmacológica que hacemos en nuestro diseño experimental, así al observar un cambio en la amplitud de la espiga poblacional se puede aseverar que esto es debido al efecto producido por la neurotrofina y no por un debilitamiento de la señal, fatiga sináptica o reclutamiento de nuevas fibras que son sincronizadas por la estimulación continua.



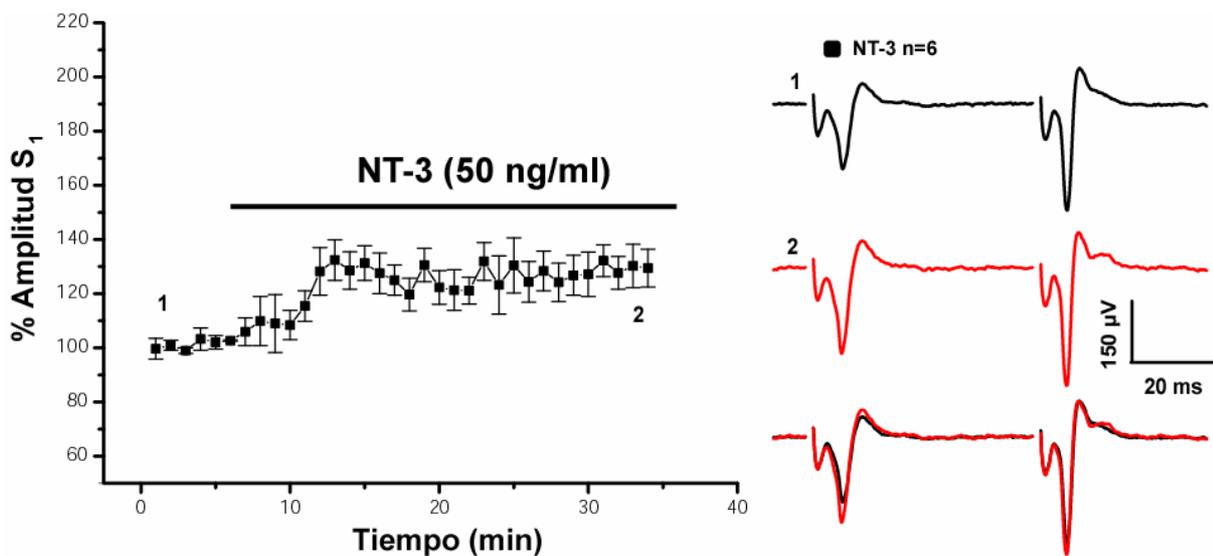
Gráfica 1.- Curso temporal de 10 experimentos donde la amplitud del S_1 no varía en relación al tiempo. a la derecha se observan trazos representativos de un experimento, 1 al principio del experimento, 2 en los minutos finales y abajo 1 y 2 sobrepuestos.

La neurotrofina 3 modula positivamente la sinapsis glutamatérgica y disminuye la facilitación en el protocolo de pulso pareado

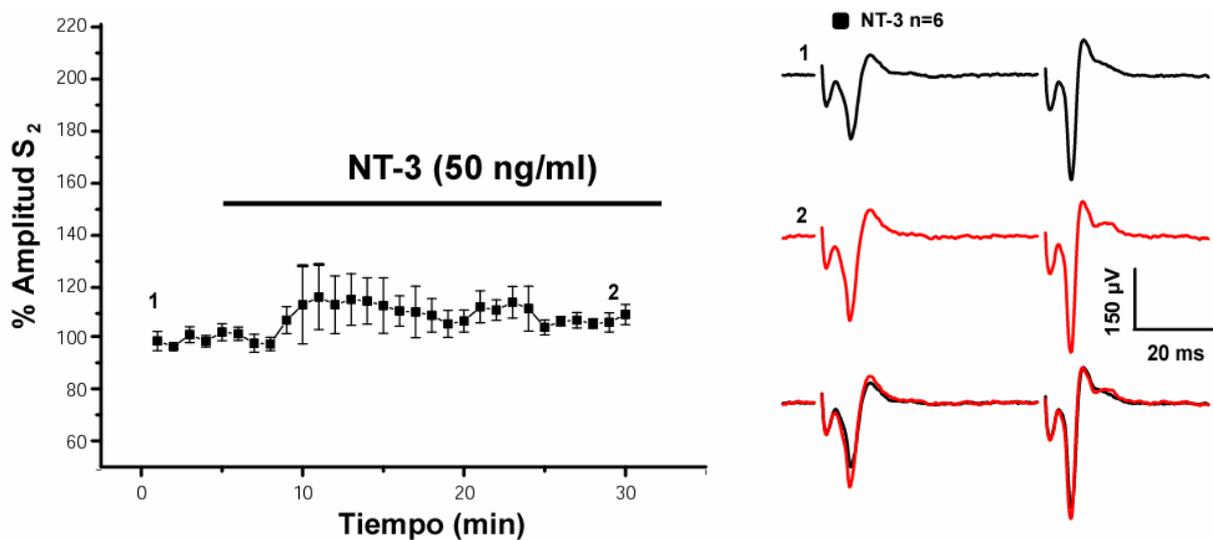
Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que de un total de 12 experimentos en los cuales se aplicó NT-3 (50ng/ml), 6 mostraron un incremento en la amplitud de la espiga poblacional en el S₁, un experimento mostró un decremento en la amplitud del S₁ mientras el resto no mostró cambio alguno. Para analizar nuestros resultados separamos los datos en grupos de acuerdo al efecto observado ya que normalmente en este tipo de experimentos no siempre es posible observar el mismo efecto del fármaco debido a diferentes causas las cuales se explicarán en la discusión de los resultados. Los datos que mostramos de ahora en adelante son los resultados encontrados en el grupo donde tuvimos un efecto sobre la amplitud de la espiga poblacional.

Al realizar el análisis a los datos obtenidos de los 6 experimentos que mostraron un incremento en la amplitud de la primera espiga poblacional encontramos que el incremento fue del $26 \pm 7.6\%$, el resultado de la prueba estadística T de Wilcoxon indicó que el incremento observado en la amplitud del S₁ fue estadísticamente significativo ($p=0.031$) (gráfica 2).

Por otra parte al analizar la amplitud de la espiga poblacional producida por el segundo estímulo (S₂), se encontró un ligero incremento de la amplitud de la espiga poblacional después de haberse aplicado la NT-3, dicho incremento fue del $6.407 \pm 5.9\%$ con respecto al control, al realizar la misma prueba estadística utilizada para los datos del S₁ encontramos que este incremento no fue significativo ($p=0.313$) (gráfica 3).

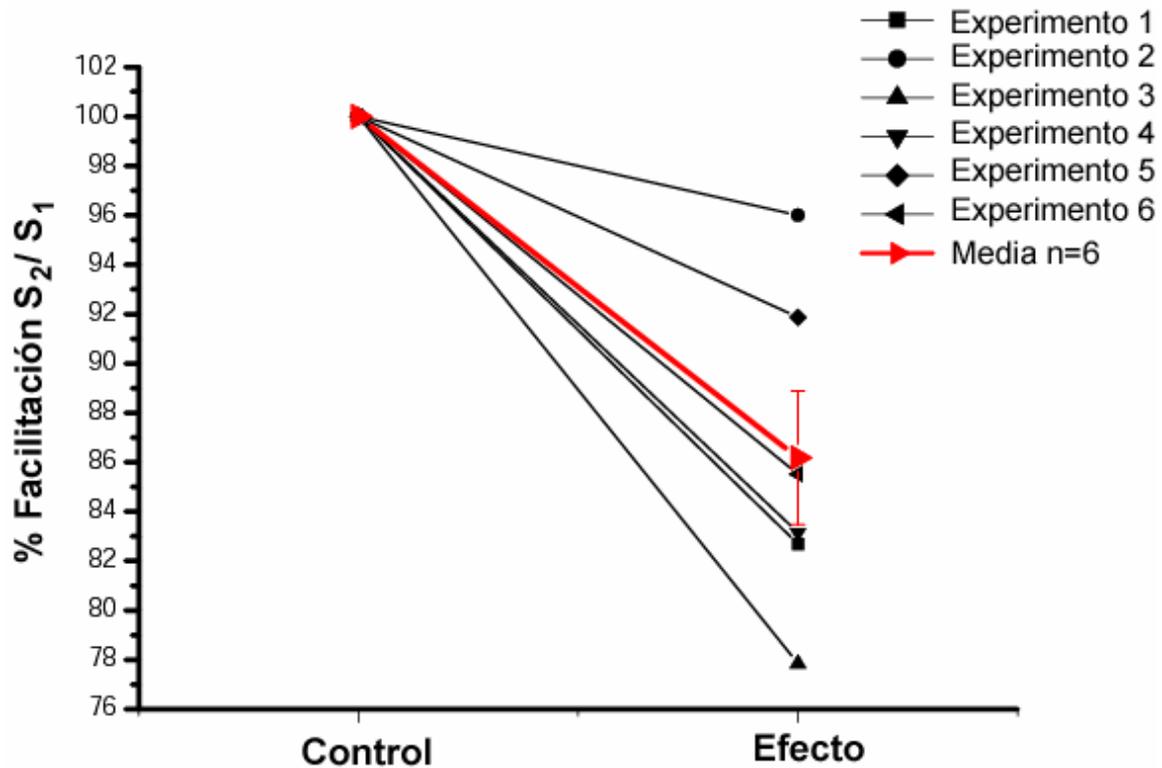


Gráfica 2.- Curso temporal de la amplitud de S_1 en condiciones control, la amplitud del S_1 incrementa $26 \pm 7.6\%$ con la aplicación de NT-3 con respecto al control. A la derecha trazos representativos antes de la administración de la NT-3 negro y después de la aplicación de NT-3 50 ng/ml en rojo, abajo los dos trazos sobrepuestos.



Gráfica 3.- Curso temporal de la amplitud de S_2 en condiciones control, la amplitud del S_2 incrementa $6.40 \pm 5.9\%$ con respecto al control. A la derecha trazos representativos antes de la administración de la NT-3 en negro y después de la administración de la NT-3 50ng/ml en rojo, abajo los dos trazos sobrepuestos

Al evaluar el % de facilitación en el protocolo de pulso pareado analizamos, el cociente entre la amplitud de la espiga poblacional producida por el segundo estímulo y la espiga producida por el primer estímulo (S_2 / S_1), encontrando que hubo una disminución de la misma en los 6 experimentos después de haberse aplicado la NT-3 (13.82 ± 2.70 S.E.) (Gráfica 4)



Gráfica 4.- % de facilitación (S_2 / S_1) antes y después de la administración de NT-3, en negro se encuentran los valores de facilitación de cada uno de los experimentos que mostraron un incremento en el S_1 , en rojo se muestra la media de los valores de facilitación, todos normalizados al control

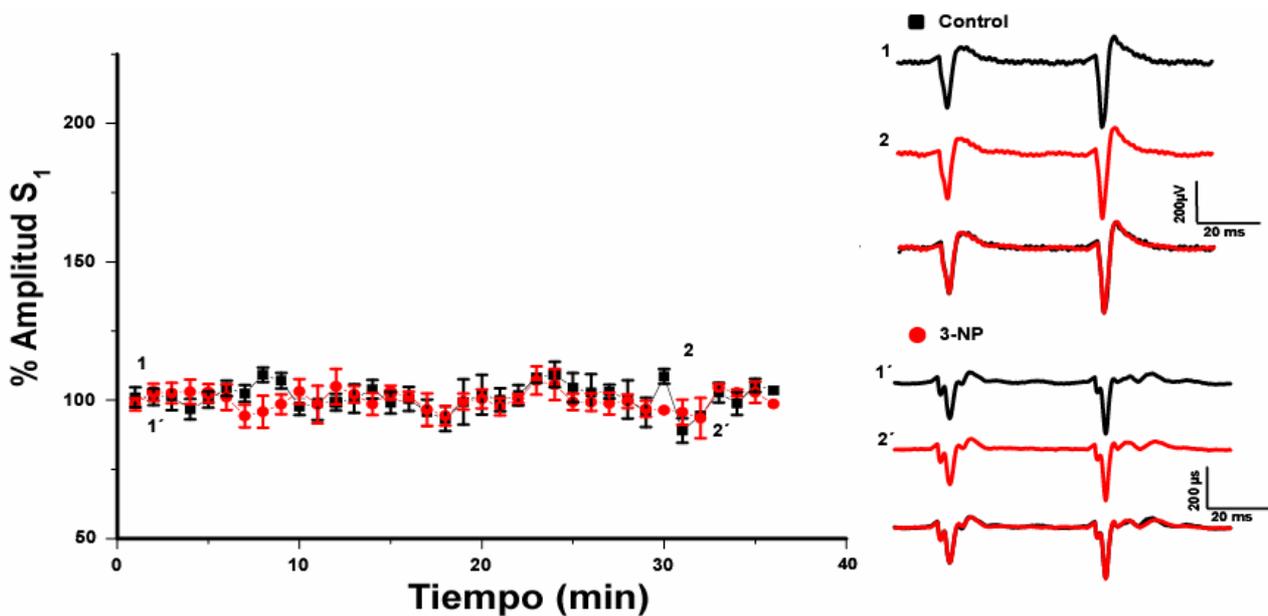
Para poder dilucidar la presencia de un efecto postsináptico, evaluamos cambios en la pendiente de regreso de la espiga poblacional y encontramos que no hay diferencia significativa ($p= 0.195$) en los valores de las pendientes antes (0.0573) y después (0.0659) de administrar la neurotrofina (Tabla 1) con lo cual se descarta la participación de un efecto a nivel postsináptico.

Tabla 1.- Valores de la pendiente de la espiga poblacional antes y después de administrar la NT-3 en condiciones control

	Control	NT-3 (50 ng/ml)
1	0.01752	0.02276
2	0.05688	0.05548
3	0.06223	0.08024
4	0.03105	0.03511
5	0.08176	0.11354
6	0.09442	0.08806
Media	0.0573	0.0659

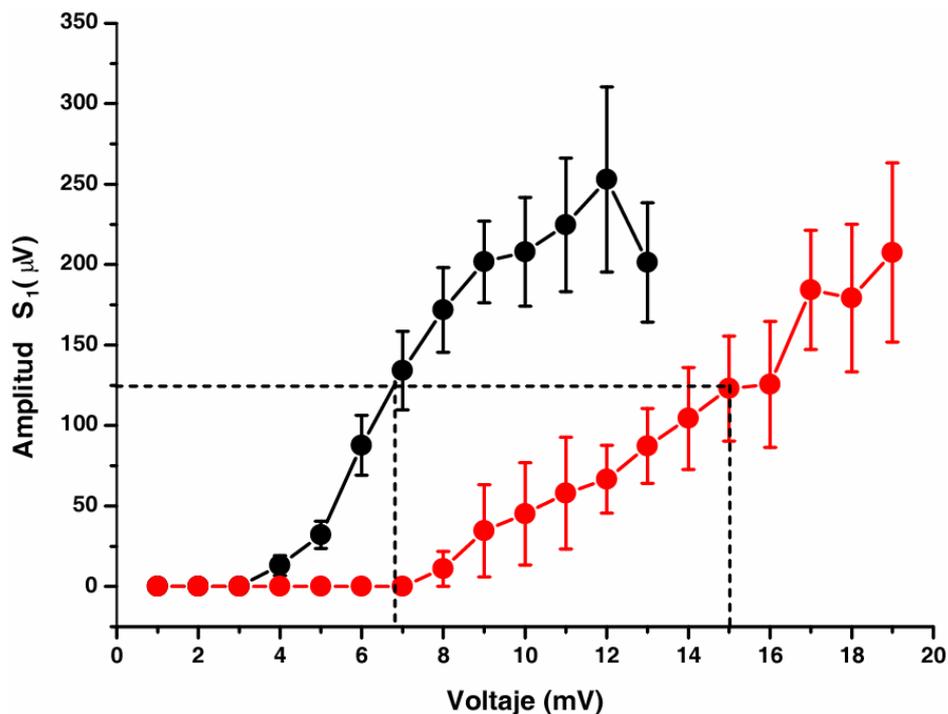
Modulación glutamatérgica de la neurotrofina-3 en el modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington por el 3NP

Después de haber encontrado un papel positivo en la modulación glutamatérgica de la NT-3 en las neuronas corticoestriatales de ratones control, evaluamos si en el modelo farmacológico de la EH producido por el 3-NP persistía dicho efecto sobre la modulación en la transmisión glutamatérgica. Los primeros experimentos realizados fueron controles largos que al igual que en condiciones control tenían la finalidad de mostrar la estabilidad del registro a lo largo del tiempo y en este caso mostrar que a pesar de que existiera un posible daño a las neuronas espinosas medianas por el 3NP, éste no interfiera con la estabilidad del registro electrofisiológico. En la gráfica 5 se muestra la estabilidad de los registros realizados durante 38 minutos a las rebanadas cerebrales procedentes de ratones tratados con el 3-NP junto con el registro de los controles largos de las rebanadas control. Como se puede observar la estabilidad de los registros provenientes del grupo tratado con el 3-NP es similar al del grupo control. Esto permite realizar los experimentos con la NT-3 y observar la presencia de un efecto atribuible a la neurotrofina al igual que en el grupo control.



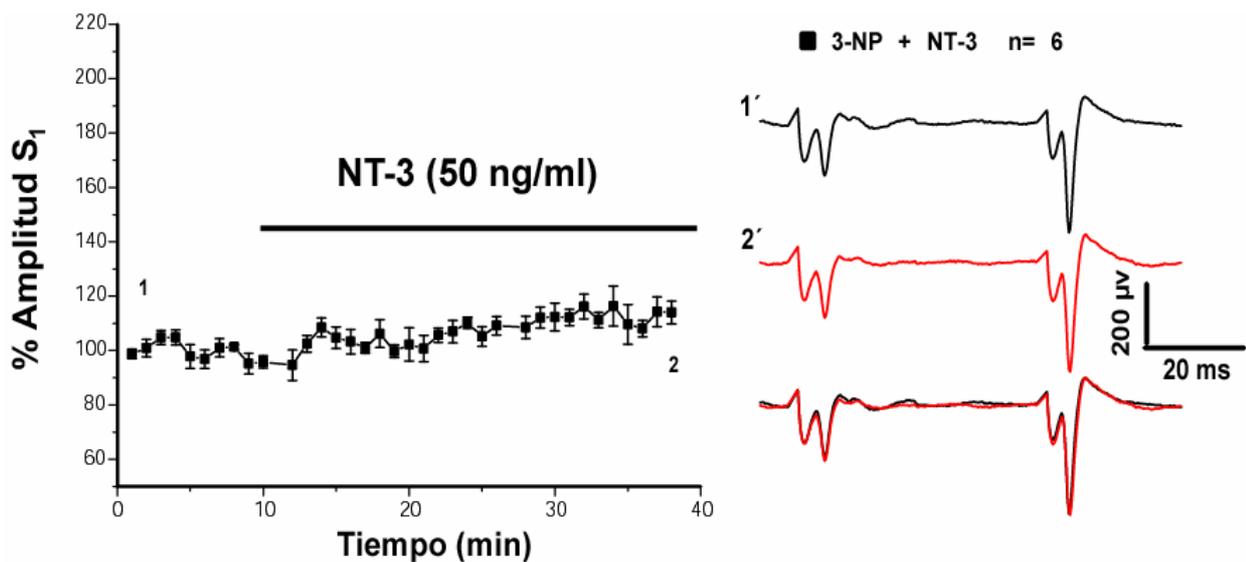
Gráfica 5.- Curso temporal de la amplitud de S_1 en condiciones control en negro y de ratones administrados con el 3-NP en rojo. La amplitud de ninguno de los 2 grupos varía con respecto al tiempo. A la derecha arriba trazos representativos de un registro hecho en una rebanada proveniente de un ratón control y abajo trazos representativos hechos en una rebanada proveniente de un ratón tratado con 3-NP.

Cabe destacar que a pesar de tener la estabilidad en el registro electrofisiológico en el grupo tratado con 3-NP, la obtención de dichos registros fue mucha más complicada, es decir, al momento de encontrar una espiga poblacional observamos que era difícil sincronizar la espiga poblacional, además teníamos que incrementar el voltaje para obtener una espiga de una amplitud similar a la del grupo control. En la gráfica 6 se muestran las curvas intensidad respuesta del grupo control y de los tratados con 3-NP, mostrando un corrimiento a la derecha del grupo tratado con 3-NP, esto nos indica que existe posiblemente, daño en las neuronas espinosas medianas hecho por el 3-NP.

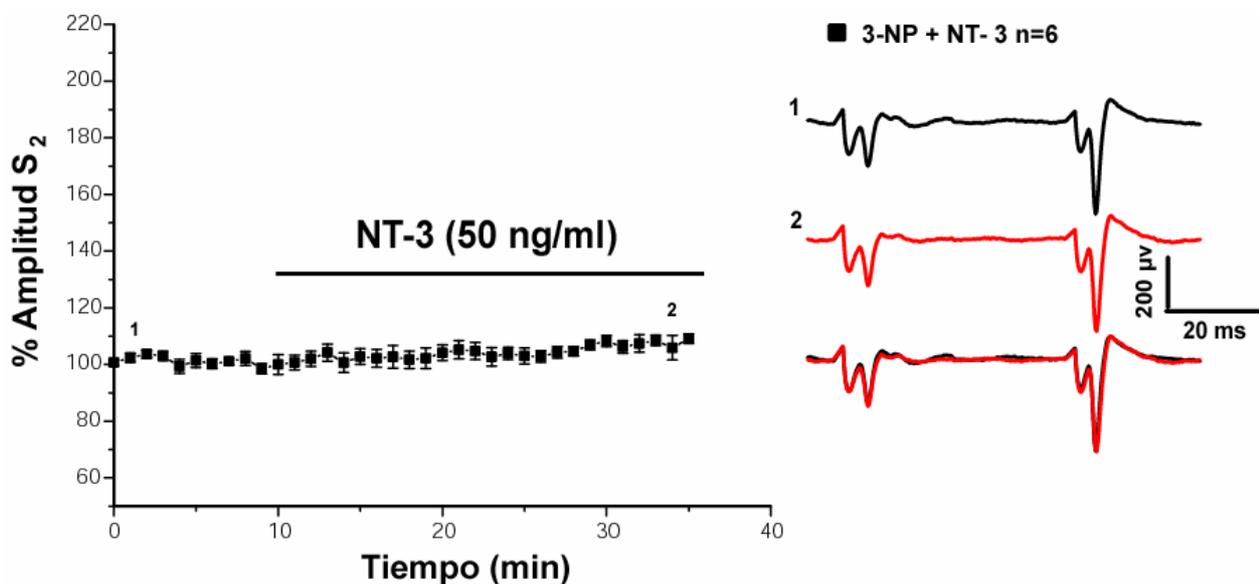


Gráfica 6.- Curva intensidad respuesta (voltaje vs amplitud de la espiga poblacional del S₁) en negro promedio de las curvas realizadas en rebanadas provenientes de ratones control y en rojo el promedio de las curvas realizadas en rebanadas de ratones tratados con 3-NP.

Al analizar los registros obtenidos en las rebanadas cerebrales provenientes de ratones tratados con el 3NP y a las cuales se les administró la NT-3, se observa que el efecto sobre la transmisión glutamatérgica que se había observado en el grupo control, ya no está presente o no es observado de manera significativa. En la gráfica 7 se observa que después de la administración del NT-3 existe un ligero incremento en la amplitud de la respuesta al S₁ que no va más allá de 10% hacia el final del tiempo del experimento, sin embargo, este incremento no fue significativo ($p=0.416$). Cabe destacar que después de la administración de la neurotrofina la variación de los valores de la amplitud de cada minuto aumentan, esto es claramente observado al comparar la magnitud de los errores estándar de cada minuto antes y después de la administración de la neurotrofina. Por otra parte el S₂ no sufre un cambio aparente en la amplitud (gráfica 8).

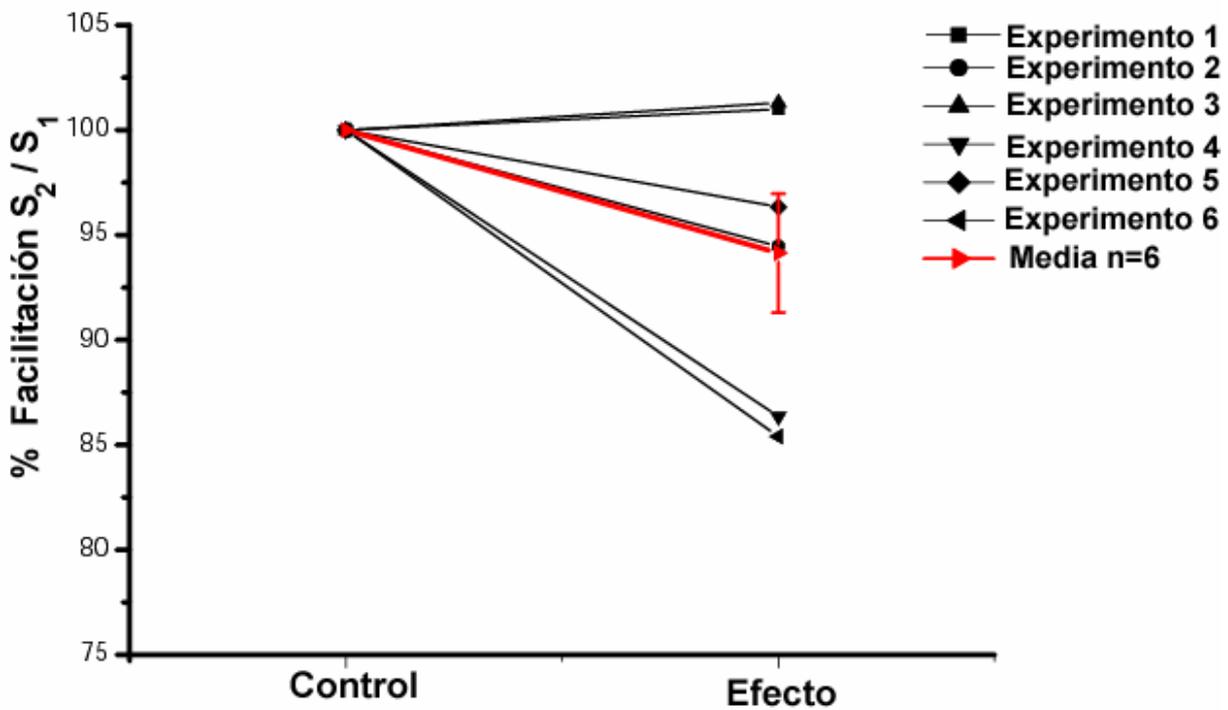


Gráfica 7.- Curso temporal de la amplitud de S₁ de rebanadas de ratones tratados con 3-NP, la amplitud del S₁ incrementa 10% después de la aplicación de la NT-3 con respecto al control. A la derecha trazos representativos antes de la administración de la NT-3 en negro y después de la aplicación de NT-3 (50 ng/ml) en rojo, abajo los dos trazos sobrepuestos.



Gráfica 8.- Curso temporal de la amplitud de S₂ de rebanadas de ratones tratados con 3-NP, la amplitud del s₂ no varía con respecto al control. A la derecha trazos representativos antes de la administración de la NT-3 en negro y después de la administración de la NT-3 (50ng/ml) en rojo, abajo los dos trazos sobrepuestos

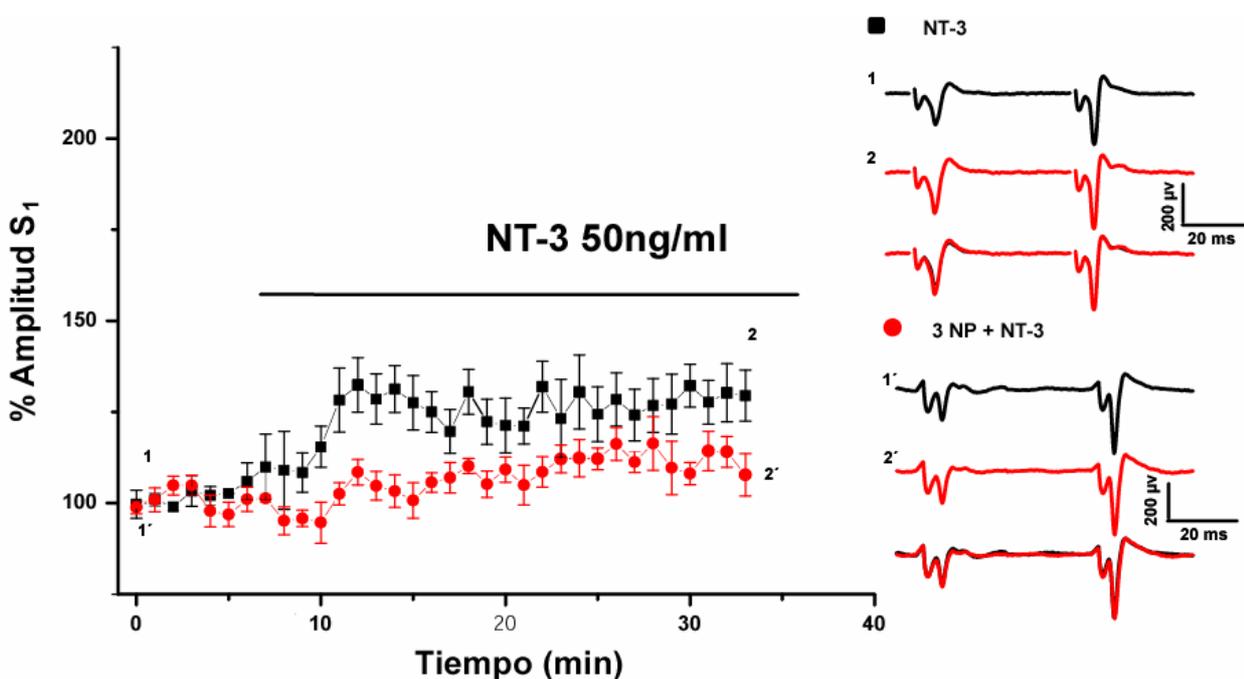
Cuando analizamos los cambios en la facilitación encontramos que 4 de los 6 experimentos muestran una disminución en el porcentaje de la facilitación mientras 2 de ellos no presentan cambio aparente en la facilitación, La disminución observada en el porcentaje de facilitación es menor a un 10% y estaría reflejando el ligero aumento observado en la amplitud del S_1 . Al igual que en el grupo control la presencia de un efecto presináptico está presente en el grupo tratado con 3-NP sin embargo el cambio en la facilitación no parece ser significativo.



Gráfica 9.- % de facilitación (S_2 / S_1) antes y después de la administración de NT-3, en rebanadas de ratones tratados con 3-NP. En negro se encuentran los valores de facilitación de cada uno de los experimentos, en rojo se muestra la media de los valores de facilitación, todos normalizados al control

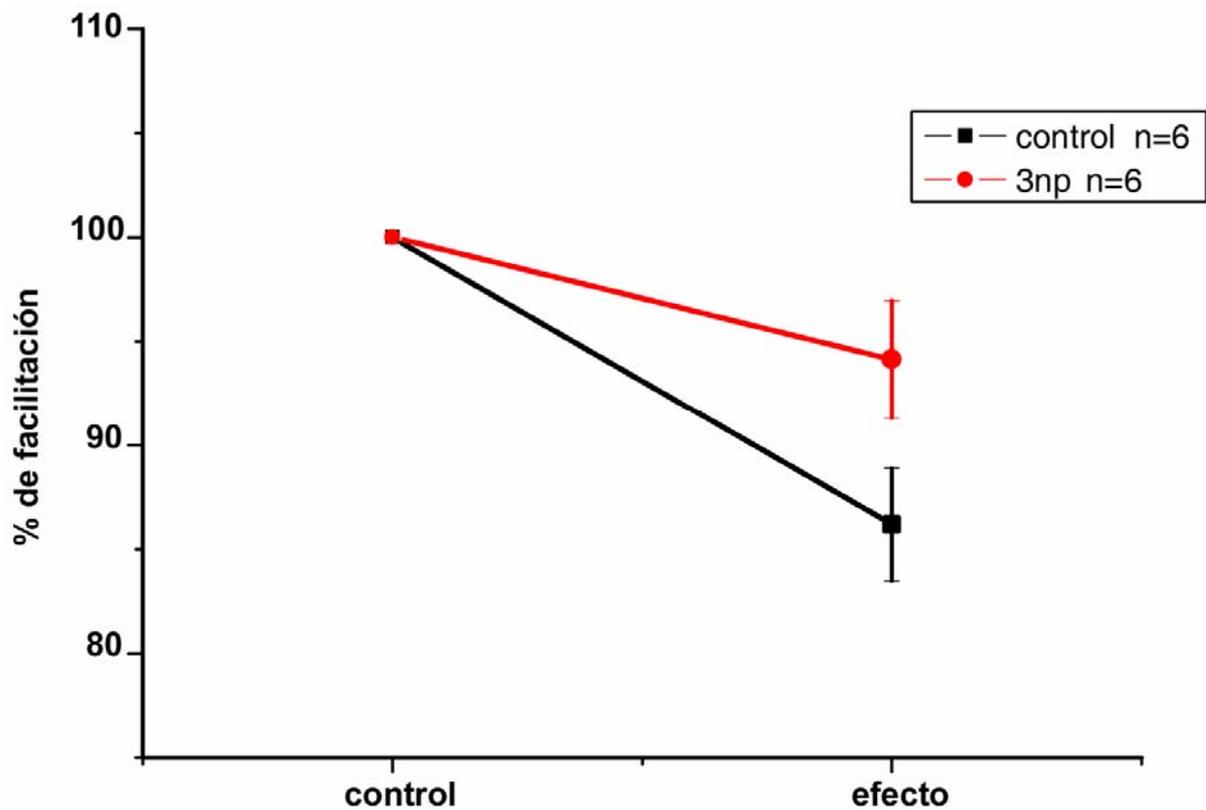
Comparación de la modulación en la transmisión glutamatérgica del NT-3 en condiciones control vs modelo del 3-NP

Hasta ahora se han descrito los resultados obtenidos al evaluar el papel de la NT-3 sobre la modulación glutamatérgica corticoestriatal tanto en el grupo control como en el grupo tratado con 3-NP, ahora se muestra la comparación de los resultados obtenidos en la evaluación de los dos grupos. Al comparar el efecto sobre la amplitud del S_1 en ambas condiciones se encontró una diferencia significativa entre el efecto producido sobre el grupo control y el tratado con 3-NP (26% grupo control y 10% grupo 3-NP); la diferencia significativa se observa al inicio del efecto de la NT-3, sin embargo al final del tiempo grabado esta diferencia se hace menor a la vez que el efecto en el grupo tratado con 3-NP incrementa su magnitud (gráfica 10).



Gráfica 10.- Curso temporal de % de la amplitud de S_1 , en negro datos obtenidos de registros hechos en rebanadas provenientes de ratones control, en rojo los datos obtenidos de registros hechos en rebanadas provenientes de ratones tratados con 3-NP. A la derecha arriba trazos representativos de un registro hecho en una rebanada proveniente de un ratón control y abajo trazos representativos hechos en una rebanada proveniente de un ratón tratado con 3-NP.

En cuanto a la facilitación observamos también diferencias significativas en los cambios en el % de facilitación entre el grupo control y el grupo tratado con 3-NP (gráfica 11), esto es coherente si observamos los cambios en la amplitud del S_1 observados en los dos grupos.



Gráfica 11.- % de facilitación (S_2 / S_1) antes y después de la administración de NT-3, en negro % de facilitación en registros realizados en rebanadas provenientes de ratones control, en rojo % de facilitación en registros realizados en rebanadas provenientes de ratones tratados con 3-NP.

Discusión

En este trabajo de tesis, se documentó la modulación que ejerce la NT-3 en las sinapsis glutamatérgicas en el núcleo estriado. Se sabe que la NT-3 modula la transmisión sináptica en diferentes regiones del SNC, sin embargo; no se ha descrito que en el núcleo estriado esta neurotrofina pueda modular la transmisión glutamatérgica. En trabajos realizados en el laboratorio se ha encontrado la presencia de la NT-3 en las células estriatales hacia a los 42 días postnatales, lo que sugiere que podría estar relacionada con el funcionamiento estriatal postnatal. Los experimentos realizados en esta tesis se enfocaron a evaluar si la NT-3 tiene un papel en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica corticoestriatal.

La NT-3 incrementa la transmisión glutamatérgica corticoestriatal

En condiciones control encontramos que la NT-3 incrementa la amplitud del S_1 en 6 de 12 experimentos. El hecho de que sólo el 50% de las rebanadas registradas mostrarán un incremento en la amplitud del S_1 pudiera deberse a una estimulación excesiva que no permitiera ver un efecto de la NT-3. También es posible que la liberación endógena de esta neurotrofina u otros neuromoduladores, no permitiera observar modulación en la transmisión sináptica inducida por NT-3, debido a que desde la situación control ya tuviéramos un efecto saturable. Otra alternativa es que haya expresión heterogénea de los receptores TrkC en el estriado. Si bien, los registros fueron realizados en la misma región del estriado (dorsolateral), el sitio del corte de la rebanada en la que se registro podría haber ocasionado que en algunos experimentos se registraran poblaciones en las cuales la expresión del receptor TrkC estuviera disminuida y por lo tanto no se puede ver un efecto. Por otra parte es posible que en los registros en los cuales no vimos efecto, la población registrada no tuviera la misma disponibilidad a la neurotrofina que las poblaciones en las que si se encontró un efecto debido a la baja penetración de las neurotrofinas en el tejido. Se ha reportado que el BDNF penetra solamente $25\mu\text{m}$ después de 1.5 hr después de haber sido administrado en el baño (Patterson et al., 1996) por lo cual si la población registrada se encuentra a un nivel mas profundo en la rebanada, es posible que la NT-3 no esté

llegando hasta la población registrada o no en la concentración suficiente para ver el efecto neuromodulador.

En los registros en los cuales se encontró un incremento en la amplitud de la primera espiga poblacional (S_1) este fue del 26%, mientras que la segunda espiga tan solo tuvo un incremento del 6%, esto generó que la relación S_2/S_1 que nos indica el índice de facilitación disminuyera $14 \pm 2.7\%$. La disminución en la facilitación nos estaría sugiriendo que el efecto de la NT-3 es a nivel presináptico y pudiera estar incrementando la liberación de glutamato, sin embargo, esto no necesariamente sería lo único que estaría ocurriendo, ya que el incremento en la amplitud de la segunda espiga poblacional podría estar hablando de la presencia de un posible efecto postsináptico que se este sumando al efecto presináptico.

Para dilucidar si la NT-3 tiene un efecto a nivel postsináptico, se evaluó la pendiente de regreso de la espiga poblacional antes y después de la administración de la NT-3. Los cambios en los valores de la pendiente pueden reflejar cambios en la apertura o cierre de canales en la postsinapsis. Si el incremento en la transmisión glutamatérgica mediado por la NT-3 es debido a cambios en la postsinapsis, la conductancia de los receptores glutamatérgicos en la postsinapsis incrementaría, reflejándose en un cambio en el valor de la pendiente de la espiga poblacional. Al realizar el análisis estadístico de los valores de la pendiente no se encontró una diferencia significativa, por lo cual no parece haber evidencia de un efecto a nivel postsináptico de la NT-3. Sin embargo, debido al no poder analizar otros parámetros electrofisiológicos como lo son el synaptic volley, o la frecuencia acumulada (esta última se usa en registros unicelulares), aun no se puede descartar por completo un efecto postsináptico de la NT-3.

Activación de las vías PLC γ y PI-3 cinasa e incremento de Ca⁺² por IP-3 relacionadas con el efecto de la NT-3

La activación del receptor TrkC por la NT-3 es el primer paso para explicar el incremento en la transmisión glutamatérgica. Se ha reportado que el bloqueo de este receptor por el antagonista K252a bloquea el efecto neuromodulador en la transmisión

sináptica en diferentes regiones del sistema nervioso como la corteza (Kim, et al 2007), el hipotálamo (Gao et al, 1999) y la medula espinal (Arvanov et al, 2000). Como se mencionó previamente la activación de los receptores de la familia Trk por las neurotrofinas incluyendo al TrkC puede activar por lo menos 3 vías de señalización interna (RAS/ERK, PI-3 cinasa, PLC γ) y se ha relacionado la activación tanto de la PLC γ como de la PI-3 cinasa con los efectos neuromoduladores de la NT-3 ya que al bloquear estas dos vías por antagonistas específicos como el U73122 y la wortamannin respectivamente se ha logrado bloquear el incremento en la transmisión sináptica producido por la NT-3 en la placa neuromuscular de *Xenopus* (Yang et al, 2001) y en el giro dentado (Kelly 1999). A pesar de que el neurotransmisor liberado en la placa neuromuscular es acetilcolina y los mecanismos que explican el incremento en la transmisión sináptica colinérgica por la NT-3 no necesariamente son los mismos para el glutamato, es posible pensar que la activación de estas dos vías pudieran estar relacionada con el incremento en la amplitud de la espiga poblacional mostrada en los experimentos y por lo cual se sugiere evaluar en trabajos posteriores la participación de estas dos vías en el incremento en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal.

Tanto la activación de la PLC γ como la PI3-K producen inositol 3 fosfato (IP-3) por hidrólisis de ácidos grasos como el de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5) P2). El IP-3 tiene receptores en organelos celulares que sirven como reservorios intracelulares de Ca^{2+} como el retículo endoplásmico, al unirse el IP-3 a sus receptores se promueve una liberación de Ca^{2+} de esos reservorios hacia el citosol, incrementando su concentración intracelular. Hay evidencia que relaciona el incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular por el IP-3 al incremento en la transmisión sináptica, ya que al bloquear los receptores de IP-3 se logra eliminar el efecto de la NT-3 en la placa neuromuscular (Yang et al, 2001).

El incremento en las concentraciones de Ca^{2+} puede ocasionar que se desencadenen diferentes eventos que pueden incrementar la liberación de neurotransmisor, se ha reportado que el incremento de Ca^{2+} activa a la Ca/calmodulina cinasa II (CaMK-II) la cual se ha visto que incrementa la liberación de neurotransmisor en las sinapsis del calamar

gigante y en sinaptosomas en cerebros de mamíferos (Llinás et al., 1985; Nichols et al., 1990). Se ha propuesto que la CaMK-II incrementa la liberación de neurotransmisor al fosforilar a la sinapsina I, lo que hace que las vesículas que se encuentren ancladas al citoesqueleto por esta proteína sean liberadas (Llinás et al., 1985). Se sabe que la activación continua de la CaMK-II es necesaria para tener el efecto sobre el incremento en la liberación de neurotransmisor por la NT-3 en la placa neuromuscular de *Xenopus* ya que al bloquear la CaMK-II con el inhibidor KN62 se logra bloquear el efecto producido por esta neurotrofina (He et al., 2000).

Activación de receptores NMDA y NOS en la postsinapsis relacionados con el efecto de la NT-3

El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la producción de DAG generado por la activación de la vía de la PLC γ debido a la NT-3, puede activar a la proteína cinasa C (PKC), la cual es una cinasa que fosforila diferentes proteínas en la membrana celular. La PKC puede fosforilar a los receptores NMDA en la postsinapsis produciendo que incrementen su conductancia, por lo cual la espiga poblacional se vería incrementada. Sin embargo, también al incrementar la conductancia de los receptores NMDA se produce un influjo de Ca^{2+} , el cual puede unirse a la calmodulina. Se conoce que la calmodulina es un cofactor para la sintetasa de óxido nítrico (NOS); que estimula la producción de óxido nítrico (NO). La activación de la NOS por medio de los receptores NMDA ha sido documentada desde principios de la década de los noventa (Garthwaite et al., 1989; Wood et al., 1990) y se ha especulado que el NO puede regular la transmisión sináptica y promover la plasticidad actuando como mensajero retrogrado (de la post a la presinapsis) (revisado en Prast y Philippu, 2000). Por otra parte se ha observado que al utilizar inhibidores de la NOS es posible bloquear la LTP en varias regiones del SNC como el hipocampo ((Bohme et al., 1991; O'Dell et al., 1991; Schuman y Madison, 1991; Bon et al., 1992; Doyle et al., 1996), la corteza (Wakatsuki et al., 1998) entre otras; así mismo, hay evidencia que muestra que el NO incrementa la liberación de glutamato en varias regiones del sistema nervioso como el hipocampo, la medula espinal, el estriado y el núcleo acumbens (Lawrence and Jarrott, 1993; Sorkin, 1993; Horn et al., 1994; Prast et al., 1994a;

Segovia et al., 1994; Segieth et al., 1995; Prast et al., 1996; Bogdanov and Wurtman, 1997; Sistiaga et al., 1997; Takita et al., 1997; Prast et al., 1998) por lo cual, es posible pensar que la activación de la NOS y la producción de NO como consecuencia de la activación de la vía de la PLC γ por la NT-3, pudiera estar participando en el efecto neuromodulador observado en nuestros experimentos, al incrementar la liberación de neurotransmisor. Esta es una hipótesis que se evaluará en el futuro.

Posible incremento en la transmisión y/o expresión de receptores AMPA pudiera explicar el efecto neuromodulador de la NT-3

Es posible que otro tipo de receptores de glutamato distintos a los NMDA como los receptores AMPA, también pudieran estar participando en el efecto neuromodulador de la NT-3. La activación de la PKC por el incremento de Ca²⁺ producido por la activación de receptores NMDA puede generar que esta proteína fosforile a los receptores AMPA e incremente la transmisión sináptica mediada por este tipo de receptores. Se ha reportado que en la espina dorsal de la rata, la NT-3 incrementa la transmisión sináptica mediada por los receptores AMPA, siendo necesaria la activación previa de los receptores NMDA (Arvanov et al., 2000), por lo que posiblemente un incremento en la transmisión sináptica mediada por este tipo de receptores en la vía corticoestriatal explique el efecto neuromodulador de la NT-3.

Por otra parte el incremento en la expresión de receptores de glutamato en la terminal postsináptica también podría explicar el efecto neuromodulador de la NT-3. Se ha reportado que el BDNF incrementa la expresión de receptores AMPA en la densidad postsináptica de cultivos corticales (Nakata y Nakamura, 2007). El incremento en la expresión de este tipo de receptores en la terminal produciría que con la liberación de neurotransmisor, se activen un mayor número de receptores debido al incremento en su expresión y por lo tanto, tener una mayor respuesta ante una misma cantidad de neurotransmisor liberado. Sin embargo, hasta el momento no hay reportes que indiquen cambios en la expresión de los receptores AMPA con la NT-3, por lo que es interesante

evaluar si la NT-3 incrementa la expresión de los receptores AMPA y que esto pudiera estar participando en el efecto neuromodulador de la NT-3.

Debido a lo descrito anteriormente y resumiendo, es posible pensar que la activación de vías de señalización diferentes, nos explican el incremento en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal por la NT-3 y que estas vías pueden estar ocurriendo simultáneamente tanto en la pre como en la postsinapsis, una de estas vías se relaciona con la activación de los receptores TrkC en la presinapsis, el incremento de Ca^{2+} intracelular por el IP-3 y la activación de la CaMK-II que incrementaría la liberación de neurotransmisor. Por otra parte si los receptores TrkC se encuentran en la postsinapsis después del incremento de Ca^{2+} por el IP-3, se produciría un incremento en la conductancia de los receptores NMDA y/o AMPA o bien un incremento en el tiempo en el cual permanezcan abiertos estos canales por la actividad de la PKC teniendo un componente postsináptico en el efecto de la NT-3; además de poder estar participando en el incremento en la liberación de neurotransmisor mediante la producción de NO que es liberado retrógradamente (figura 9). Sin embargo, para afirmar esto, es necesario realizar otros experimentos usando inhibidores de la $\text{PLC}\gamma$, PI-3 cinasa, CaMK-II, NOS y antagonistas de receptores NMDA, AMPA de IP-3 para observar si es posible bloquear el efecto de la NT-3 y dilucidar bien el o los mecanismos moleculares que explican el efecto de la NT-3 sobre la transmisión glutamatérgica corticoestriatal.

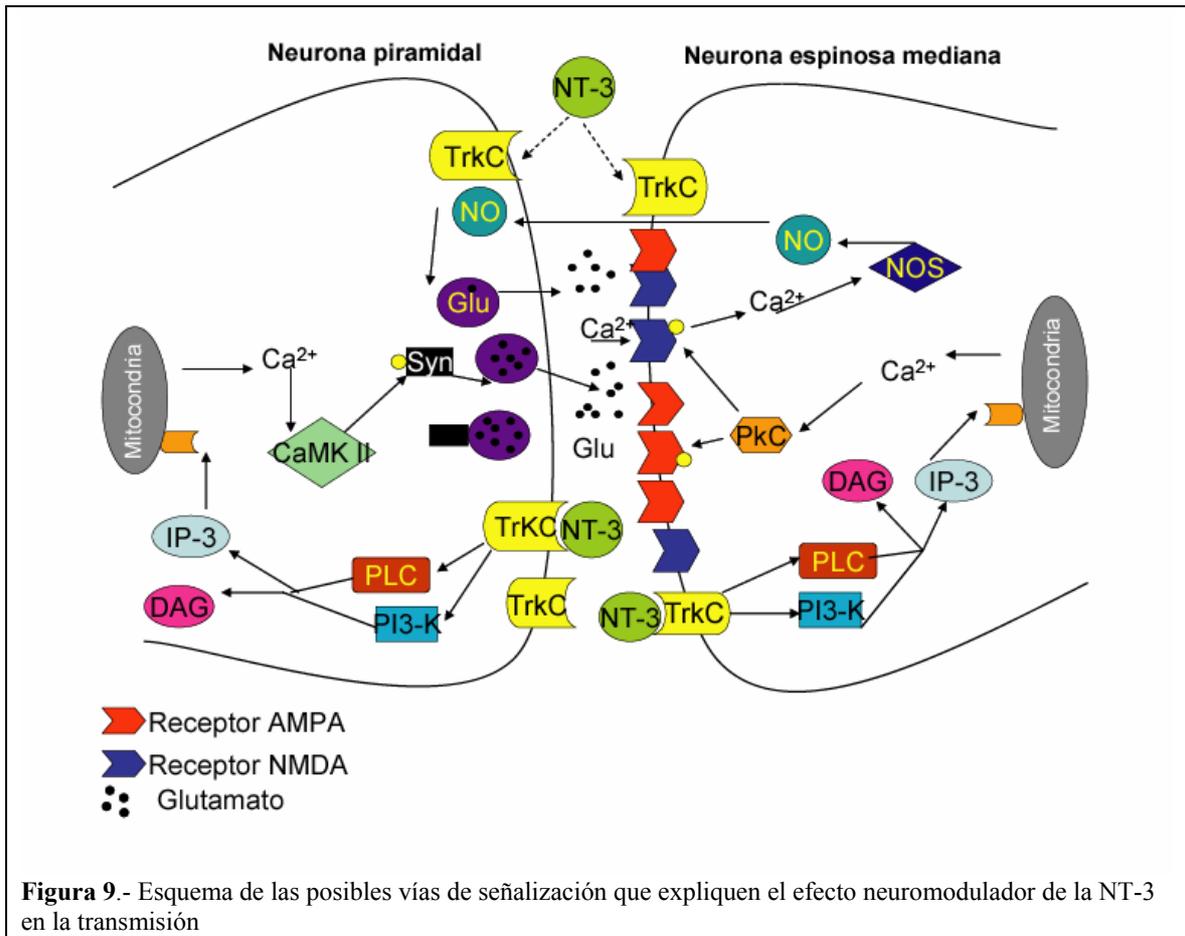


Figura 9. - Esquema de las posibles vías de señalización que expliquen el efecto neuromodulador de la NT-3 en la transmisión

Modulación en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en el modelo del 3-NP de la EH.

Después de establecer que la NT-3 incrementa la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en ratones control, la siguiente pregunta fue si esta modulación se alteraba en el modelo de 3-NP de la EH. Cabe destacar que con el tratamiento al cual fueron sometidos los ratones (15mg/Kg. por 5 días), estos no presentaban un fenotipo conductual de la enfermedad sin embargo, se encontraron diferencias importantes a la hora de realizar los registros que nos indican el daño producido por el 3-NP.

El más evidente de los cambios, es que las espigas poblacionales usando la misma intensidad de corriente fueron en general más pequeñas en amplitud y desincronizadas comparadas con las obtenidas en las rebanadas cerebrales provenientes de ratones control. El incremento en el voltaje necesario para evocar una respuesta poblacional concuerda con lo observado en modelos transgénicos de la EH (R6/2 y Tg 100) en donde es necesario incrementar el voltaje para poder evocar un potencial de acción (Klapstein et al, 2001; Laforet et al, 2001). Sin embargo, cabe destacar que la amplitud máxima de la espiga poblacional de ratones tratados con 3-NP era similar a la del grupo control si se incrementaba la intensidad de voltaje, lo cual también fue observado en el modelo transgénico R6/2 por Klapstein y colaboradores al realizar registros electrofisiológicos poblacionales.

Pérdida del efecto neuromodulador de la NT-3 en el modelo del 3-NP de la EH.

Al evaluar si la NT-3 puede modular la transmisión corticoestriatal en presencia del bloqueador mitocondrial 3NP, se observó que el incremento en la transmisión glutamatérgica mostrado en los registros controles, se reduce casi por completo observándose solo un incremento del 10% hacia el final del registro.

¿Porque la NT-3 no incrementa la transmisión glutamatérgica en el modelo del 3-NP? Es una pregunta interesante ya que si bien una de las posibles explicaciones al efecto

de la NT-3 en los ratones control se relaciona con la activación de los receptores TrkC en la neurona piramidal (en la presinapsis) las cuales no son tan susceptibles al 3-NP; se podría esperar que el efecto de la NT-3 se siguiera presentando de una manera similar, sin embargo esto no ocurre, lo que hace pensar que la desconexión corticoestriatal y alteraciones en la activación y/o expresión de receptores de glutamato y/o receptores TrkC en la postsinapsis (neuronas espinosas medianas) a causa del tratamiento con 3-NP pudieran estar teniendo un papel en el bloqueo del efecto de la NT-3 en los ratones tratados con 3-NP.

Posible relación en la activación y expresión de receptores NMDA con la pérdida del efecto de la NT-3.

Como ya se ha mencionado anteriormente la activación de los receptores NMDA podría tener un papel fundamental en la modulación sináptica por la NT-3, por otra parte se ha relacionado lesiones en el estriado causadas por el 3-NP administrado crónicamente a la activación de receptores NMDA, además de que la administración sistémica del 3-NP altera la plasticidad sináptica producida por actividad (Dalbem et al., 2005). Esto hace pensar que alteraciones en la activación de los receptores NMDA como consecuencia del desacople metabólico producido por el 3-NP pudiera tener relación con el bloqueo del efecto neuromodulador de la NT-3. Se ha reportado que se puede bloquear el establecimiento de LTP en el hipocampo mediante el uso de soluciones libres de Mg^{+2} (Coan et al., 1989), las cuales desbloquean al canal de NMDA y favorecen su activación independiente del voltaje. Por lo cual, es posible que la activación previa de los receptores NMDA por el glutamato (lo cual no ocurre en condiciones normales por el bloqueo de Mg^{2+} en el potencial de reposo de la célula) a causa del desbloqueo de estos receptores producido por el déficit de ATP generado por el 3-NP y que afecta a la bomba electroquímica Na^+/K^+ causando la despolarización de la membrana, tenga un papel en la pérdida del efecto neuromodulador de la NT-3.

Por otra parte se ha encontrado que el tratamiento con 3-NP entre otras cosas afecta las ramificaciones dendríticas de las neuronas espinosas medianas disminuyendo el grosor

de la dendrita y sus ramificaciones (Beal et al., 1993), estas alteraciones en la morfología de las dendritas podría alterar la expresión de receptores NMDA y AMPA, en apoyo a este supuesto se ha observado que en cerebros de pacientes con la EH hay una disminución en la expresión de receptores NMDA (Young et al., 1988), por lo cual una disminución en este tipo de receptores pudiera ser una posible explicación de porque en situaciones en donde se afecta el metabolismo energético se reduzca el árbol dendrítico y los receptores expresados en el como ocurre en los ratones tratados con 3-NP y que esto tenga relación con el bloqueo en el efecto de la NT-3 en los ratones tratados con esta toxina.

Además del papel de los receptores NMDA en la pérdida del efecto neuromodulador de la NT-3 en la transmisión corticoestriatal, cambios en la expresión de los receptores TrkC pudieran explicar la pérdida de dicho efecto. Hasta el momento no se sabe si la expresión y/o distribución del receptor TrkC se ve modificada con el 3-NP, se sabe que en modelos transgénicos de la EH si existe un regulación diferencial del receptor TrkB en donde su expresión se ve disminuida (Ginés et al, 2006), sin embargo esto podría estar relacionado mas como una consecuencia de la disminución en la expresión de BDNF que por un decremento independiente en la expresión del receptor. Sin embargo, resulta interesante analizar si la expresión del TrkC se ve disminuida en el modelo del 3-NP de la EH y que esto esté participando en la disminución en el efecto de la NT-3. Por lo que queda pendiente evaluar si la expresión del TrkC se ve disminuida en el modelo del 3-NP para trabajos posteriores.

Conclusiones:

La NT-3 modula positivamente la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en cerebros de ratones en condiciones fisiológicas normales incrementando la primera espiga poblacional en un 26%

La actividad neuromoduladora de la NT-3 en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en el modelo del 3-NP de la EH se ve disminuida al incrementar tan sólo 10% la amplitud de la primera espiga poblacional.

La disminución en la facilitación por pulso pareado y el que la pendiente de la espiga poblacional no cambie después de administrar la NT-3 permite atribuir el efecto observado en la actividad neuromoduladora de la NT-3 en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal a un nivel presináptico, aunque no se descarta por completo la participación de un efecto a nivel postsináptico.

Referencias

- Alston TA, Mela L, Bright HF (1977) 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indinofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:3767-3771.
- Ariano, M.A., Cepeda, C., Calvert, C.R., Flores-Hernandez, J., Hernandez-Echeagaray, E., Klapstein, G.J., Chandler, S.H., Aronin, N., DiFiglia, M., Levine, M.S. (2005) Striatal potassium channel dysfunction in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurophysiol.* 93: 2565–2574
- Arvanov V.L., Seebach B.S., Mendell L.M. (2000) NT-3 Evokes an LTP-Like Facilitation of AMPA/Kainate Receptor-Mediated Synaptic Transmission in the Neonatal Rat Spinal Cord. *J Neurophysiol.* 84(2):752-8
- Avila, M. A., Varela-Nieto, I., Romero, G., Mato, J. M., Giraldez, F., Van De Water, T. R. & Represa, J. (1993) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin_3 support the survival and neurogenesis response of developing cochleovestibular ganglion neurons. *Developmental Biology* 159: 266—275.
- Beal. M.F., Brouillet. E., Jenkins. B.J., Ferrante. R.J., Kowall. N.W., Miller. J.M., Storey. E., Srivastava. R., Rosen. B.F., Hyman. B.T. (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.
- Bear. M.F., Connors. B.W., Paradiso M.A., (2002) *Neuroscience, exploring the brain.* 2^oed. Lippincot Williams and Wilkins pp 100-150.

- Bogdanov, M.B., Wurtman, R.J. (1997) Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 221:197–201.
- Böhme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J.M., Doble, A., Blanchard, J.C. (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 199:379–381.
- Bon, C., Böhme, G.A., Doble, A., Stutzman, J.M., Blanchard, J.C. (1992) A role for nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.* 4:420–424.
- Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willing, A., Kowall, N.W., Beal, M.F. (1995) Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:7105–7109.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., Tartari, M. (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:919–930.
- Calabresi, P., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Greengard, P., Hipskind, R.A., Borrelli, E., Bernardi, G. (2001) Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J. Neurosci.* 21:5110–5120.
- Cepeda, C., Itri, J.N., Flores-Hernández, J., Hurst, R.S., Calvert, C.R., Levine, M.S. (2001) Differential sensitivity of medium- and large-sized striatal neurons to NMDA but not kainate receptor activation in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 14:1577–1589.

- Cepeda, C., Hurst, R.S., Calvert, C.R., Hernandez-Echeagaray, E., Nguyen, O.K., Jocoy, E., Christian, L.J., Ariano, M.A., Levine, M.S. (2003) Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23:961–969.
- Coan, E.J., Irving, A.J., Collingridge, G.L. (1989) Low-frequency activation of the NMDA receptor system can prevent the induction of LTP. *Neuroscience Letters.* 105: 205-210
- Coles, C.J., Edmondson, D.E., Singer, T.P. (1979) Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* 254:5 16 1-5 167.
- Collazo, D., Takahashi, H. & McKay, R. D. G. (1992) Cellular targets and trophic functions of neurotrophin_3 in the developing rat hippocampus. *Neuron* 9:643—656.
- Dalbem, A., Silveira, C.V., Pedroso, M.F., Vaz Breda, R., Von Werne-Baes, C., Bartmann, A.P., 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.
- DiFiglia, M. (1990) Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 13:286–289.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A., Boyce, F.M., Aronin, N. (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14:1075–1081.
- Doyle, C., Ho"lscher, C., Rowan, M.J., Anwyl, R. (1996) The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitroindazole blocks both longterm potentiation and

depotentialiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. *J. Neurosci.* 16:418–424.

- Ernfors, P., Ibanez, C. F., Ebendal, T., Olson, L. & Persson, H. (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87:5454—5458.
- Gao, X.B., and Van den Pol, N. (1999) Neurotrophin_3 potentiates excitatory GABAergic synaptic transmission in cultured developing hypothalamic neurones of the rat. *Journal of Physiology.* 518 (1):81—95
- García-Ramos, R., Val-Fernández J., Catalán-Alonso, M.J., Barcia-Albacar, J.A., Matías-Guiu, J. (2007) Modelos experimentales de la enfermedad de Huntington. *Rev Neurol.* 45 (7): 437-441.
- Ginés, S., Bosch, M., Marcoñ, S., Gavaldá, N., Díaz-Hernández, M., Lucas, J., Canals J., Alberch, J. (2006) Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *European Journal of Neuroscience* 23:649–658
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M.J., Moncada, S. (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172:413–416.
- Graveland ga, Williams rs, Difulgia., M. (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 15;227(4688):770-3.

- Hardingham , G.E., Fukunaga, Y., Banding, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* 5:405-414.
- He. X., Yang. F., Xie. Z., Lu. B. (2000) Intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Kinase II Mediate Acute Potentiation of Neurotransmitter Release by Neurotrophin-3. *The Journal of Cell Biology.* 149: 4; 783–791.
- Heinsen H, Rub U, Bauer M. (1999) Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 97: 613–22.
- Henderson, C. E., Camu, W., Mettling, C., Gouin, A., Poulson, K., Karihaloo, M., Rullamas, J., Evans, T., McMahon, S. B., Armanini, M. P., Berkemeier, L. R., Phillips, H. S. & Rosenthal, A. (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 363: 266—270.
- Horn, T., Smith, P.M., McLaughlin, B.E., Bauce, L., Marks, G.S., Pittman, Q.J., Ferguson, A.V. (1994) Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *Am. J. Physiol.* 26, R306–R313.
- Huang, E.J., Reichardt. L.F. (2001) NEUROTROPHINS: Roles in Neuronal Development and Function *Annu. Rev. Neurosci.* 24:677–736
- Huang. E.J., Reichardt. L.F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal Signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72:609–642
- Jeste DV, Barban L, Parisi J. (1984) Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol.* 85:78–86.
- Jhonston, D.-Miao-Sin, W.S. (1995) Foundations of cellular neurophysiology. MiTPMSS. USA.

- Kandel. E., Schwartz. J., Jessell. T. (1998) Neurociencia y conducta. Prentice Hall. Pp. 580-586.
- Kelly. A., Lynch. M.A. (1999) Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology*. 39: 643–651
- Kim. HG., Wang. T., Olafsson. P., Lu. B. (1994) Neurotrophin 3 Potentiates Neuronal Activity and Inhibits γ -Aminobutyrateergic Synaptic Transmission in Cortical Neurons. *PNAS*. 91;12341-12345
- Klapstein. G.J., Fisher. R.S., Zanjani. H., Cepeda. C., Jokel. E.S., Chesselet. Levine. M. (2001) Electrophysiological and Morphological Changes in Striatal Spiny Neurons in R6/2 Huntington's Disease Transgenic Mice *J Neurophysiol* 86:2667-2677.
- Kremer HP. (1992) The hypothalamic lateral tuberal nucleus: normal anatomy and changes in neurological diseases. *Prog Brain Res* 93:249–61.
- Laforet. G.A., Sapp. E., Chase. k., McIntyre. C., Boyce. F.M., Campbell. M., Cadigan. B.A., Warzecki. L., Tagle. D.A., Reddy. P.H., Cepeda. C., Calvert. C.R., Jokel. E.S., Klapstein. G.J., Ariano. M.A., Levine. M.S., DiFiglia. M., Aronin. A. (2001) Changes in Cortical and Striatal Neurons Predict Behavioral and Electrophysiological Abnormalities in a Transgenic Murine Model of Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 21(23):9112–9123.
- Lawrence, A.J., Jarrott, B. (1993) Nitric oxide increases interstitial excitatory amino acid release in the rat dorsomedial medulla oblongata. *Neurosci. Lett.* 151:126–129.

- Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154–62
- Levine. M.S., Cepeda. C., Hickey. M.A., Fleming S.M., Chesselet. M.F. (2004) Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect. *TRENDS in Neurosciences* 27:11 691-697
- Li, YX., Zhang, Y., Lester, H.A., Schuman, EM., Davidson, N. (1998) Enhancement of neurotransmitter release induced by brain derived neurotrófico factor in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18:10231-10240.
- Llinas R., Mcguinness T.L., Leonard C.S., Sugimori M., Greengardt P. (1985) Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulindependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Neurobiology.* 82: 3035-3039.
- Lu B (2004) Acute and long-term regulation of synapses by neurotrophins. *Prog Brain Res* 146:137–150
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N.L., Solano, S.M., Hollingsworth, Z.R., Menon, A.S., Frey, A.S., Spektor, B.S., Penney, E.B., Schilling, G., Ross, C.A., Borchelt, D.R., Tapscott, S.J., Young, A.B., Cha, J.H., Olson, J.M. (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9:1259–1271.
- Lujan. R. (2004) Bases moleculares de la señalización neuronal. *Ciencia al día.* 2:5:1-19
- Macdonald V, Halliday GM, Trent RJ, McCusker EA. (1997) Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 23:492–95.

- Macdonald V, Halliday G. (2002) Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 10: 378–86.
- Nakata. H., Nakamura. S. (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling. *FEBS Letters.* 581: 2047–2054
- Nichols. R.A., Sihra. T.S., Czernik. A.J., Nairn. A.C., Greengard. P. (1990) Calcium/calmodulin dependent kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. *Nature.* 343: 647-651
- O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Arancio, O. (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11285–11289.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron.* 16(6):1137–1145
- Prast. H., Philippu. A. (2000) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology.* 64:51–68.
- Prast, H., Tran, M.H., Fischer, H., Philippu, A. (1998) Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate and GABA. *J. Neurochem.* 71: 266–273.
- Prast, H., Lamberti, C., Fischer, H., Tran, M.H., Philippu, A. (1996) Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: 731–735

- Prast, H., Fischer, H., Grass, K., Philippu, A. (1994) Nitric oxide is a modulator of acetylcholine and glutamate release in the ventral striatum. In: Louilot, A., Durkin, T., Spaminato, U., Cador, M. (Eds.), *Monitoring Molecules in Neuroscience*. 261–262.
- Purves. D., Fitzpatrick. D., Augustine. J., Katz. L. (2001) *Neuroscience*
- Rossi, S., Prosperetti, C., Picconi, B., De Chiara, V., Mataluni, G., Bernardi, G., Calabresi, P., Centonze, D. (2006) Deficits of glutamate transmission in the striatum of toxic and genetic models of Huntington's disease. *Neuroscience Letters*. 410: 6-10
- Saulle. E., Gubellini. P., Picconi. B., Centonze. D., Tropepi. D., Pisan. 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 *Mol. Cell. Neurosci*. 25: 9-20
- Schuman, E.M., Madison, D.V. (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*. 254: 503–1506.
- Segieth, J., Getting, S.J., Biggs, C.S., Whitton, P.S. (1995) Nitric oxide regulates excitatory amino acid release in a biphasic manner in freely moving rats. *Neurosci. Lett*. 200: 101–104
- Segovia, G., Porrás, A., Mora, F. (1994) Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat. *NeuroReport*. 5:1937–1940.
- Sistiaga, A., Miras-Portugal, M.T., Sánchez-Prieto, J. (1997) Modulation of glutamate release by a nitric oxide:cyclic GMP-dependent pathway. *Eur. J. Pharmacol*. 321:47–257.

- Sorkin, L.S. (1993) NMDA evokes an L-NAME sensitive spinal release of glutamate and citrulline. *NeuroReport*. 4:479–482
- Spargo E, Everall IP, Lantos PL. (1993) Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 56:487–91.
- Stober T, Wussow W, Schimrigk K. (1984) Bicaudate diameter: the most specific and simple CT parameter in the diagnosis of Huntington's disease. *Neuroradiology*. 26: 25–28
- Strong Tv, Tagle Da, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Katz KW, Collins FS, Albin RL. (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet*. 5(3):259-65
- Takita, M., Kaneko, H., Suzuki, S.S., Akamatsu, M. (1997) Lasting effect of NO on glutamate release in rat striatum revealed by continuous brain dialysis. *NeuroReport*. 8:567–570.
- Therengui. G. (1999) Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 194:1-14
- Wakatsuki, H., Gomi, H., Kudoh, M., Kimura, S., Takahashi, K., Takeda, M., Shibuki, K. (1998) Layer-specific NO dependence of long-term potentiation and biased NO release in layer V in the rat auditory cortex. *J. Physiol. Lond*. 513:71–81.
- Walker, F.O. (2007) Huntington's disease. *Seminar*. 369:218-228.

- Wood, P.L., Emmett, M.R., Rao, T.S., Cler, J., Mick, S., Lyengar, S. (1990) Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate-, quisqualate and kainate-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in vivo. *J. Neurochem.* 55:346–348.
- Yang. F., He. X., Feng. L., Mizuno¹. K., Liu¹. X., Russell. J., Xiong. W., Lul. B. (2001) PI-3 kinase and IP3 are both necessary and sufficient to mediate NT3-induced synaptic potentiation. *4: (1) 19-28.*
- Young AB, Greenamyre JT, Holmgren Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. (1988) NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 24 1:981-983.
- Yuen. E.C. (2001) The role of neurotrophic factors in disorders of peripheral nerves and motor neurons. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 12:293-306
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti. D., Leavitt, BR., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friendles, R.M., Silami, V., Hayden, M.R., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E. (2001) Loss of Huntingtin mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493-498
- Zuccato, C., Liber, D., Ramos, C., Tarditi, A., Rigamonti, D., Tartari, M., Valenza, M., Cattaneo, E. (2005) Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol. Res.* 52:133-139