



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EXPRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LAS
NEUROTROFINAS EN EL DESARROLLO POSTNATAL
DEL NÚCLEO ESTRIADO DE RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

B I O L O G A

P R E S E N T A :

VALERIA ZERMEÑO LEÓN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEGARAY

México, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Zermeño
León
Valeria
56 10 16 82
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
400053431
2. Datos del tutor
Dra.
Alicia Elizabeth
Hernández
Echeagaray
3. Datos del sinodal 1
M. en IBB.
Alette
Ortega
Gómez
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Patricia
Rivas
Manzano
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Enrique
Moreno
Sáenz
7. Datos del trabajo escrito
Expresión espacio-temporal de las neurotrofinas en el desarrollo postnatal del núcleo
estriado
de ratón
60 p.
2009

El presente estudio se realizó gracias al apoyo proporcionado por la beca de tesis del proyecto DGAPA-PAPPIT No. IN209103, 2003 y el proyecto CONACYT 42598-3003, así como al apoyo institucional de la FES Iztacala.

El trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y en la Unidad de Biomedicina de la FES-Iztacala.

Dedicatorias y agradecimientos

Dedico este trabajo con especial cariño a mi familia, en primer lugar a mi mamá por ser una compañera incondicional en mi vida y porque con ella comparto todos mis logros, gracias por haberme dado la libertad de tomar mis propias decisiones, respetarlas y dejarme vivir mi propia vida, te quiero mucho, este logro para ti mamita;

A mi hermana por nunca juzgar mis decisiones y por apoyarme en todas, por ser mi mejor amiga y mi maestra en muchos sentidos. Todo mi cariño para ti, este logro es para tí.

A mi papá porque tu presencia y tu ausencia me han hecho valorar y comprender tu historia, que ha marcado la de mi vida y mi manera de afrontarla. Ahora te entiendo y te quiero más.

A mis abuelitos, mi Papi y mi Mami, por ese amor incondicional que solo ellos pueden dar. Gracias por la herencia que los cuatro han dejado en mí.

A la familia Cruz León, Tere, Oscar, Gaby y Erick por su amistad especialmente única, y por la mutua solidaridad que hemos construido, esto también es para ustedes.

A Enrique Pimentel, por nuestro reencuentro y pasión por las ciencias biológicas, y por toda la infancia compartida.

A todos aquellos miembros de mi familia que en mayor o menor grado, me acompañaron hasta aquí

También quiero dedicarlo a todos mis amigos:

A ti Enrique por ser el compañero de toda mi juventud y por compartir conmigo todos mis momentos de estudiante, por acompañarme en los momentos más difíciles y por tu apoyo incondicional que siempre salía al rescate. Todo esto es más de lo que puede esperarse de un hombre, te admiro y te quiero siempre mi Teposh. Muchas, muchas gracias.

A ti Christian por ser el mejor hermano que se puede ser, por el apoyo para la edición de las gráficas e imágenes de esta tesis y por tu fiel compañía tan amena y sincera. Muchas gracias.

A ti Lisbeth por tu discreta cercanía siempre muy importante por la transparencia que te caracteriza, gracias Lis, de verdad te aprecio mucho.

Ese gallazo, Juan, a ti por construir una gran amistad conmigo y por acercarme a tu familia y a tus amigos, y porque lo nuestro no es pasajero.

A Edgar Negrete, porque en ti puedo confiar ciegamente y por ser un cómplice en esto y en todo lo que nos espera, porque todo en nosotros es verdadero y transparente. Te quiero mucho mi amigo y te extraño demasiado.

A mi amigo Oscar por enseñarme el significado de la amistad, eso es mucho decir. Gracias por acompañarme desde el principio de este camino.

A Julio, mi compañero de formación, por tu apoyo en los últimos pasos de este proceso, pero mucho más por cuestionármelo todo y aceptarme como soy y por aterrizarme a la realidad y consolarme en mis tristezas. Mis lazos contigo son de los más fuertes que he sentido. Te quiero mucho Julio, muchas gracias.

A ti Pedro, porque solo nosotros sabemos que nuestra amistad se formó de las cosas más íntimas de nuestras vidas. Te quiero mucho porque soy mejor cada vez que estoy contigo. Mil gracias.

A Edgar Huerta Por ser un muy buen biólogo y un mejor amigo, gracias por compartir conmigo tus historias y por aceptar estar en la mía.

A Israel porque nunca sentí algo igual por nadie, porque a tu lado aprendí a vivir la biología y a entender la trascendencia de pasar por este mundo. Nunca logramos permanecer juntos, aún así, donde quiera que estés te agradezco tu influencia sobre mi formación y mi postura, marcaste mi vida para siempre. Muchísimas gracias.

A mis compañeros de la carrera, Alejandro Vite, Laura Reyes, Lizeth Abundis Iván Chirino e Iván Galván, por compartir conmigo las aulas y las experiencias universitarias, tienen un lugar importantísimo en mis mejores recuerdos, por eso los quiero.

A Nicolás, mi francesito, por enseñarme a confiar y por tus sensatos consejos. Logramos una amistad tan fuerte y tan estrecha, tengo mucho por qué quererte y por qué agradecerte.

A mis compañeros en Biomédicas e Iztacala, que colaboraron mucho para que esto llegara a buen término: Miguel, Cristhian y Ernesto, gracias por su apoyo en este trabajo, en este camino llegué a apreciarlos como verdaderos amigos.

A mis compañeros de trabajo Javier, David y Jorge, porque aprendí de ustedes el valor de la enseñanza y ahora son parte de mi formación como bióloga. Cada uno tiene un lugar muy especial en la historia de mi vida.

A René, mi gran amigo y maestro, por lo mucho que aprendí de biología junto a tí. Porque tu manera restringida de relacionarte conmigo ha logrado que nuestra amistad crezca y que siempre haya algo más

que esperar de ti, una pista para seguirte descubriendo. Te quiero mucho René y te agradezco mucho que permanezcas en mi vida.

A mi Tony, Dr. Zilli, usted conoce bien mis deficiencias, gracias por aceptarlas y aceptarme así y por quedarse un instante en mi vida, lo suficiente para que no pueda olvidarlo nunca. Lo quiero mucho y para siempre.

¡Gracias banda! de verdad me siento privilegiada de tenerlos, a todos gracias, esto también es de ustedes.

A mis muy queridos maestros David Benavides, Zenón Cano, René Cerritos (otra vez) y con especial aprecio al Dr. Dreyfus por su cariño paternal, su preocupación por mi bienestar y porque a pesar de la distancia en las jerarquías me dejó acercarme y me ofreció su amistad. Al Dr. Ángel Moreno, por transmitirme su pasión por los hongos y por permitirme acercarme a él como ser humano.

Agradezco de manera especial Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por introducirme al camino de las neurociencias, por enseñarme la teoría y las técnicas utilizadas en este trabajo, por todas sus aportaciones a este trabajo y por su tiempo y esmero en transmitirme sus conocimientos.

Agradezco de manera más especial a la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por haber dirigido tan esmeradamente este trabajo de tesis, por todo el conocimiento que siempre estuvo dispuesta a compartir conmigo, por su paciencia y por su amistad sincera. Eli, te aprecio mucho por ser mi amiga además de ser mi maestra. Me gustó mucho compartir contigo esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

1 RESUMEN	8
2 ANTECEDENTES	9
2.1 Ganglios basales.....	9
2.1.1 Aferencias y eferencias de los ganglios basales.....	9
2.2 El núcleo estriado.....	10
2.2.1 Neuronas del núcleo estriado.....	11
2.3 Factores neurotróficos.....	12
2.3.1 Las neurotrofinas.....	13
2.4 El citoesqueleto.....	19
3 JUSTIFICACIÓN	20
4 HIPÓTESIS	21
5 OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares.....	22
6 MÉTODO	23
6.1 Preparación.....	23
6.2 Protocolo experimental.....	23
6.2.1 Inmunohistoquímica.....	23
6.2.2 Análisis de la inmunotinción producido por las neurotrofinas.....	24
6.2.3 Análisis de la tinción por inmunorreactividad a marcadores de citoesqueleto y sinápsis.....	24
6.2.4 Análisis de la tinción producida por la inmunorreactividad a dos marcadores de tipos celulares.....	25
7 RESULTADOS	26
7.1 Detección de BDNF.....	26
7.2 Detección de NT-3.....	26
7.3 Detección de NT-4/5.....	28
7.4 El BDNF y la neurotrofina 4/5 muestran un patrón de relación inversa a lo largo de las edades estudiadas en la región dorsal-lateral del núcleo estriado.....	28
7.5 Detección de marcadores de tipo celular: GAD y Chat.....	32

7.5.1 GAD.....	32
7.5.2 ChAT.....	32
7.6 Solamente NT-3 y GAD muestran un patrón similar de tinción pero no presentan cambios significativos en las cuatro edades.....	32
7.7 Detección de marcadores de citoesqueleto dendrítico y axonal: neurofilamentos y MAP-2.....	36
7.7.1 Neurofilamentos.....	36
7.7.2 MAP-2.....	36
7.8 Detección de un marcador de sinápsis: sinaptofisina.....	36
8 DISCUSIÓN.....	42
8.1 El BDNF y la neurotrofina 4/5 muestran un patrón de tinción de relación inversa entre ellas mientras que la neurotrofina 3 muestra un patrón diferente.....	42
8.2 BDNF y NT-4/5 tienen un papel importante en los procesos celulares en la región dorsal-lateral del estriado pero no existe relación entre los patrones de expresión de las neurotrofinas y los marcadores de citoesqueleto a lo largo del tiempo.....	43
8.3 No existe correlación entre los patrones de expresión de las neurotrofinas y sinaptofisina.....	44
8.4 No existe relación entre el patrón de expresión de las neurotrofinas y el de GAD y ChAT a lo largo del tiempo.....	45
8.5 Implicaciones en patologías neurodegenerativas.....	45
9 CONCLUSIONES.....	47
10 BIBLIOGRAFÍA.....	48
11 ANEXO.....	59

1. RESUMEN

Los ganglios basales participan en el control de la conducta motora y su lesión conduce a trastornos como la enfermedad de Huntington y la de Parkinson. Están formados por tres estructuras: caudado, putamen y sustancia *nigra*. El caudado y el putamen, donde llegan casi todas las conexiones aferentes, forman el núcleo estriado. Este núcleo recibe entradas de corteza y tálamo. El estriado está constituido por dos grandes tipos de células. Aproximadamente el 95% son neuronas espinosas medianas de proyección y el 5% son interneuronas. En este núcleo se producen ciertos factores tróficos que tienen efectos protectores sobre las poblaciones neuronales. Entre estos factores se encuentra un grupo pequeño de proteínas, llamadas neurotrofinas, que representan a una familia de factores de diferenciación y sobrevivencia presentes durante el desarrollo del sistema nervioso. Su expresión es crucial para el establecimiento de conexiones funcionales en la red neuronal del núcleo estriado y las alteraciones en esta expresión podría ser parte de la causa de muerte celular en ciertas enfermedades neurodegenerativas. Con el fin de dilucidar los patrones de expresión diferencial de las neurotrofinas en el núcleo estriado se analizó la inmunotinción producida por anticuerpos contra las neurotrofinas, en cortes que incluían la región dorsal-lateral de este núcleo. Los resultados mostraron que las neurotrofinas se expresan de manera diferencial a lo largo de las cuatro edades postnatales estudiadas. BDNF y NT-4/5 mostraron un patrón de relación inversa y NT-3 un patrón diferente a las dos anteriores. No se encontró relación entre la expresión de las neurotrofinas y marcadores de citoesqueleto (Neurofilamentos y MAP-2). Tampoco hubo relación con la expresión de sinaptofisina. La inmunotinción de marcadores de tipo celular (GAD y ChAT) no mostró relación alguna con la expresión encontrada para las neurotrofinas. El patrón de distribución de las neurotrofinas en esta región del estriado, contribuye en el estudio de la comparación que pueda realizarse posteriormente con modelos animales que presenten enfermedades neurodegenerativas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Ganglios basales

El término ganglios basales se refiere a un grupo grande y funcionalmente diverso de núcleos subcorticales interconectados, el caudado, putamen, globo pálido, núcleo subtalámico y sustancia nigra. El núcleo caudado y el putamen se desarrollan a partir de la misma estructura prosencefálica; por ello están compuestos por los mismos tipos de células. Los dos núcleos forman los componentes aferentes de los ganglios basales, y juntos, se denominan el neoestriado o estriado. El globo pálido deriva del diencéfalo y está dividido en un segmento externo y uno interno. El núcleo subtalámico yace por debajo del tálamo en su punto de unión con el mesencéfalo. La *sustancia nigra* se encuentra en el mesencéfalo y tiene dos zonas; una zona pálida ventral, la *pars reticulata* (o zona reticular), que se parece citológicamente al globo pálido. Una zona pigmentada dorsal, la *pars compacta*, cuyas neuronas son de naturaleza dopaminérgica. El globo pálido y la zona reticular de la sustancia nigra son los núcleos que proporcionan la principal salida de los ganglios basales.

2.1.1 Aferencias y eferencias de los ganglios basales

Casi todas las conexiones aferentes de los ganglios basales llegan al neoestriado. Éste recibe entradas principalmente de dos fuentes: la corteza cerebral y los núcleos intralaminares del tálamo. Cada área de la corteza proyecta a una región distinta del neoestriado, y se ha sugerido que cada una participa en una función conductual específica. La vía eferente principal de los ganglios basales surge del segmento interno del globo pálido y de la zona reticulada de la sustancia nigra. Estas vías terminan en varios núcleos del tálamo, que a su vez proyectan sobre varias áreas corticales: la corteza prefrontal, la corteza premotora y el área suplementaria. Mediante estas proyecciones los ganglios basales influyen sobre otros sistemas descendentes, tales como el sistema corticoespinal; además intervienen en el control de los movimientos oculares. Los ganglios basales no tienen acceso directo a las motoneuronas de la médula espinal, sin embargo, se conoce su participación en estas estructuras en el control de diferentes aspectos de la conducta motora (Albin et al., 1989). Lesiones de los ganglios basales en humanos, conducen a varios tipos de trastornos que van desde la hipocinesia, como la

enfermedad de Parkinson, hasta la hiperkinesia como las coreas. Un gran número de trastornos degenerativos, incluyendo la enfermedad de Huntington y la de Parkinson, están asociadas con cambios químicos y estructurales en esta región (Cicchetti et al., 2000).

2.2 El núcleo estriado

El estriado no es una estructura homogénea con respecto a su organización interna o a sus conexiones aferentes y eferentes. Respecto a su organización interna, el núcleo estriado está conformado por dos compartimentos, los estriosomas o parches que forman “islas” de células y la matriz, que se compone de las regiones circundantes a estas islas (Ver esquema 1 en el anexo 1). Su heterogeneidad anatómica se refleja en la heterogeneidad funcional. Partes específicas del estriado muestran marcada vulnerabilidad diferencial a distintos tipos de lesiones (Mitchell et al., 1999)

El núcleo estriado es el componente más grande y la principal estructura receptora de los ganglios basales. Recibe entradas masivas de toda la corteza cerebral; varios núcleos talámicos, principalmente el complejo nuclear parafascicular; la sustancia *nigra pars compacta* y varios núcleos menores mesencefálicos (Parent y Hazrati, 1995) (Fig. 1). Por el contrario, el cuerpo estriado proyecta solamente al globo pálido interno y a la sustancia *nigra reticulata*. El segmento interno del Globo pálido y la sustancia reticular son las estructuras por medio de las cuales la información estriatal se proyecta a la corteza cerebral vía un relevo en el tálamo (Fig. 1), cerrando así el llamado circuito cortico-estriato-pálido-tálamo-cortical (Parent et al., 1995).

Las disfunciones del estriado están asociadas casi siempre con trastornos del movimiento (Mitchell et al., 1999) como la enfermedad de Parkinson, en donde de manera indirecta se ve afectado el estriado por la disfunción que se presenta en la sustancia nigra, y la llamada enfermedad de Huntington, asociadas a temblor de reposo y movimientos coreicos respectivamente. De manera similar, las lesiones estriatales también se asocian a padecimientos como la distonia y los tics motores que se presentan en pacientes con el síndrome de Tourette (Salloway y Cummings, 1996).

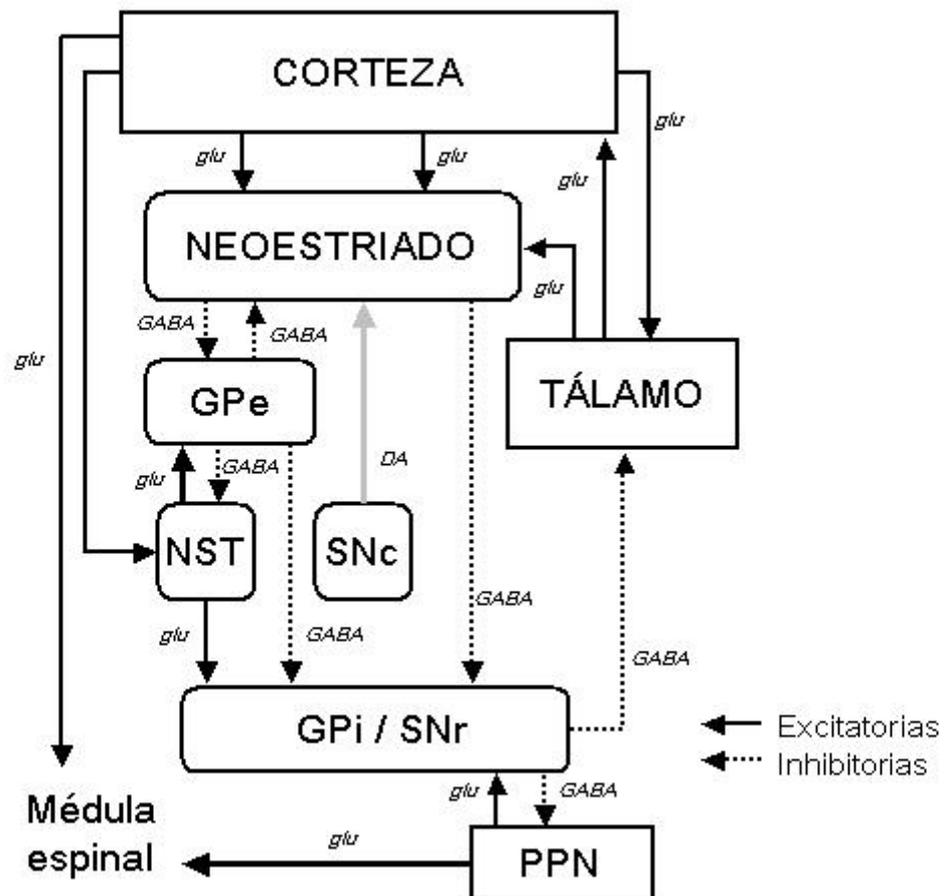


Fig. 1. Conexiones aferentes y eferentes principales de los ganglios basales (Modificado de Salgado,2006). El estriado o neoestriado es el principal núcleo a donde llegan las aferencias glutamatérgicas de la corteza y el tálamo. El neoestriado envía parte de sus proyecciones gabaérgicas al globo pálido interno (GPi) y la sustancia *nigra reticulata* (SNr), que son los núcleos de salida de los GB. De esta manera, el resultado de sus operaciones regresa a la corteza motora vía el tálamo, o se dirige a las vías descendentes del tallo cerebral como los núcleos pedúnculo pontinos (PPN) y el tectum. La otra parte de las eferencias GABAérgicas del neoestriado se dirigen al globo pálido externo (Gpe) que a su vez proyecta al núcleo subtalámico (NST). El núcleo subtalámico proyecta hacia los núcleos de salida (GPi y SNr). La sustancia *nigra compacta* (SNc) contiene a las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el neoestriado regulando su actividad.

2.2.1 Neuronas del núcleo estriado

En monos y humanos el 95% de las neuronas estriatales son neuronas de proyección y solo el 5% son interneuronas. Las neuronas estriatales de proyección son neuronas de tamaño mediano y con espinas abundantes (neuronas espinosas medianas), presentan envoltura nuclear lisa, cuerpo celular ovalado o redondo y utilizan al ácido γ -amino butírico (GABA) como

neurotransmisor principal. Estas neuronas tienen propiedades electrofisiológicas poco usuales, pues muestran niveles muy bajos de disparo espontáneo y mantienen un estado hiperpolarizado cuando se les registra *in vitro*. Registradas *in vivo* disparan fásicamente en respuesta a las entradas excitatorias de la neocorteza (Kawaguchi, 1997). Estos disparos fásicos suprimen la actividad de las neuronas en las estructuras salientes de los ganglios basales, que en contraste con las neuronas espinosas medianas de proyección, tienden a disparar continuamente. Las interneuronas estriatales han sido identificadas con base a sus características morfológicas y de su tinción histoquímica (Kawaguchi et al., 1995; Kawaguchi, 1997). Tienen dendritas lisas, una envoltura nuclear con un marcado borde sinuoso, cuerpo celular de tamaño mediano a grande y axón corto (DiFiglia y Aronin, 1976; Fox et al., 1971; Parent, 1996).

Neuronas de proyección

En monos, se han observado dos tipos de neuronas espinosas estriatales de proyección (DiFiglia y Aronin, 1976). Las neuronas espinosas tipo I de, presentes abundantemente, tienen un soma liso y dendritas proximales que se llenan de espinas en su región distal; las dendritas se distribuyen dentro de un espacio esférico de cerca de $200 \mu\text{m}^3$ (DiFiglia y Aronin, 1976).

Las células espinosas estriatales tipo II comúnmente son neuronas más grandes con dendritas espinosas que se extienden $600 \mu\text{m}$ desde el soma. Los axones de las neuronas espinosas II son largos y producen colaterales cerca del soma.

Como ya se mencionó, virtualmente todas las neuronas espinosas medianas utilizan GABA como su principal neurotransmisor (Oertel y Mugnaini, 1984), son inmunoreactivas a proteínas unidoras de calcio: calbindina y calretinina (CR) (Fig 2), y también expresan algunos péptidos neuroactivos, como la sustancia P (SP), encefalina (ENK), dinorfina (DYN) y neurotensina (NT) (Graybiel, 1990; Guevara-Guzmán et al., 1993). No todos estos péptidos se encuentran en cada una de las neuronas espinosas, sino que están contenidas en subgrupos particulares de neuronas estriatales de proyección.

Interneuronas

Las interneuronas del estriado se pueden agrupar en dos grandes categorías de acuerdo con el diámetro de sus células: las interneuronas medianas no espinosas y las interneuronas gigantes no espinosas (DiFiglia y Aronin, 1976).

Las interneuronas medianas a su vez se dividen en tres subcategorías con base en su contenido neuroquímico. El primer tipo muestra intensa inmunorreactividad para GABA y/o para la enzima que lo sintetiza, ácido glutámico-descarboxilasa (GAD) y también contienen la proteína unidora de calcio parvalbúmina (PV) (Cowan et al., 1990; Kubota y Kawaguchi, 1993; Kawaguchi, 1997). El segundo tipo muestra inmunorreactividad para somatostatina (SOM) (Desjardins y Parent 1992), neuropéptido Y (NPY) (Smith y Parent, 1986), y contiene la enzima nicotinamida adenina dinucleotido fosfato-diaforasa (NADPH-d) u óxido nítrico sintetasa neuronal (Nnos) (Kawaguchi et al., 1995), pero no expresa mRNA codificante para GAD (Chesselet y Robbins, 1989). Las interneuronas gigantes son colinérgicas y por tanto muestran inmunorreactividad para la Acetilcolina-transferasa (ChAT), la enzima que sintetiza la acetilcolina. Estas neuronas tienen un soma grande y árboles dendríticos extensamente distribuidos, reciben entradas dopaminérgicas directas y forman la mayoría de sus contactos sinápticos con las neuronas espinosas medianas (Kawaguchi et al., 1995) (Fig. 3). En los humanos, una proporción significativa de estas neuronas gigantes colinérgicas, expresan también calretinina (CR) (Kimura et al, 1980; Holt et al, 1997; Cicchetti et al, 1998).

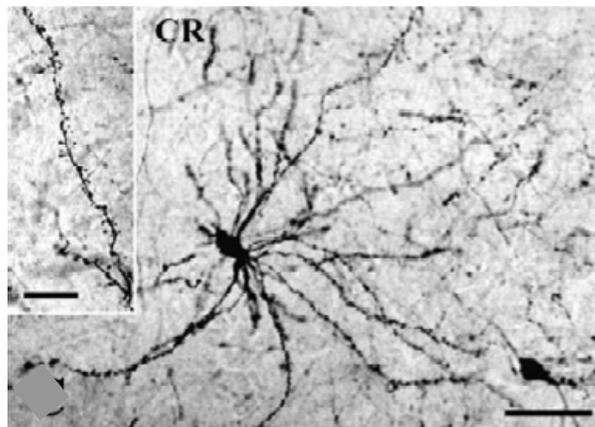


Fig. 2. Microfotografía de una neurona espinosa mediana CR+. Escala 50 μm , aumento en el recuadro 15 μm . (Tomado de Cicchetti et al., 2000)

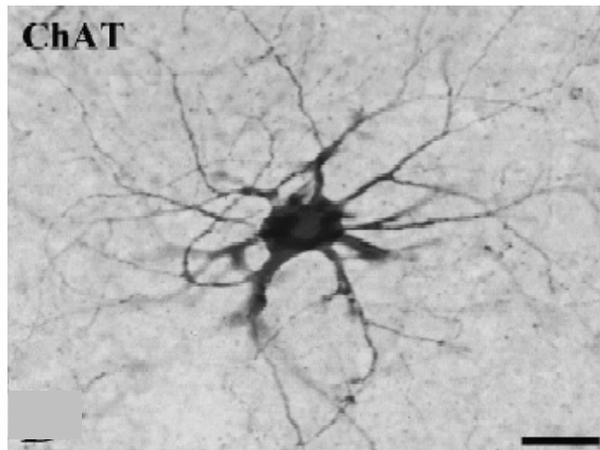


Fig 3. Típica interneurona gigante ChAT+. Escala: 30 μ m. (Tomado de Cicchetti et al., 2000)

La sobrevivencia neuronal de las células estriatales depende de la presencia de ciertos factores tróficos que tienen efectos protectores sobre las poblaciones neuronales (Alberch et al., 2004). A continuación se menciona el papel que desempeñan los factores neurotróficos, y en especial las neurotrofinas, en el núcleo estriado.

2.3 Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos son proteínas presentes, de manera natural, en el sistema nervioso, que promueven la supervivencia de poblaciones neuronales específicas, estimulan su diferenciación morfológica y regulan la expresión de los genes neuronales a través de la interacción con receptores celulares específicos (Huang y Reichardt, 2001). Las neurotrofinas han mostrado un potente efecto neuroprotector en diferentes poblaciones neuronales (Alberch et al., 2004).

Aunque los factores neurotróficos tienen una función clave durante el desarrollo, también se requiere de su presencia en el cerebro adulto para el mantenimiento de la función neuronal y su fenotipo (Cooper et al. 1996). Algunos estudios han mostrado que los factores neurotróficos (las neurotrofinas, los miembros de la familia del factor neurotrófico de células gliales y los factores neurotróficos ciliares) tienen la capacidad de proteger a las neuronas, enfermas o dañadas, de morir; inducen la aparición de diferentes poblaciones neuronales e incrementan su metabolismo y función (Alberch et al, 2004). Estos efectos neuroprotectores han sido

probados en varios modelos de animales con trastornos neurológicos como la neuropatía diabética (Apfel, 1999), la neuropatía tóxica (Apfel, 1996), la enfermedad de Alzheimer (Hefti, 1994), la enfermedad de Parkinson (Alexi et al., 2000) y la enfermedad de Huntington (Alexi et al., 2000 y Alberch et al., 2002).

2.3.1 Las neurotrofinas

El término neurotrofina se refiere a un grupo pequeño de proteínas diméricas que representan a una familia de factores de diferenciación y supervivencia presentes y activos de manera importante durante el desarrollo del sistema nervioso en los vertebrados (McAllister et al., 1995; McAllister y Katz, 1999). Estos factores tróficos son activos en diferentes grupos de neuronas durante el desarrollo embrionario y en algunos casos la duración de su actividad está restringida a un periodo específico. Los factores que pertenecen a la familia de las neurotrofinas son: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/neurotrofina 5 (NT-4/5). Estos factores ejercen sus efectos a través de dos clases de receptores, receptores de alta afinidad a tirosina cinasa (receptores Trk) y un receptor de menor afinidad, p75 (Chao, 1994). El receptor TrkA fue el primer miembro de la familia de los receptores Trk descrito (Martin-Zanca et al., 1986; Kaplan et al., 1991). A éste se une específicamente el NGF (Hempstead et al., 1991; Klein et al., 1991a). BDNF y NT-4/5 actúan sobre el receptor TrkB (Berkemeier et al., 1991; Klein et al., 1991b, 1992; Soppet et al., 1991; Squinto et al., 1991), y TrkC se une a NT-3 (Lamballe et al., 1991).

Distribución de las neurotrofinas y sus receptores en el núcleo estriado.

El NGF se ha localizado en el estriado, y se han detectado altos niveles de su mRNA entre el día postnatal 2 y el día postnatal 30 (Mobley et al., 1989). El incremento del NGF y el de su afinidad de unión, coincide con la diferenciación neuroquímica colinérgica (Mobley et al., 1989; Pérez-Navarro y Alberch, 1995).

La expresión de BDNF en el estriado se ha descrito utilizando *Northern blot* (Hofer et al., 1990) o con una prueba de protección de RNasa (Canals et al., 1998; Checa et al., 2000), pero no por

hibridación *in situ* (Hofer et al., 1990). Los niveles de mRNA^{BDNF} en el estriado incrementan en la tercera semana postnatal, cuando alcanza su máximo (Checa et al., 2000). La presencia de BDNF en el núcleo celular es controversial debido a la baja especificidad a los anticuerpos disponibles. Sin embargo el BDNF es detectado en el estriado por la técnica de ELISA a una concentración de 7ng por gramo de tejido (Yurek y Fletcher-Turner, 2001). Además, se ha mostrado que los niveles de BDNF en el estriado disminuyen a la mitad en ratas viejas (Kato-Semba et al., 1998).

La expresión de NT-3 está regulada diferencialmente en el estriado y en sus áreas de conexión durante el desarrollo. Los niveles de mRNA^{NT-3} permanecen constantes durante el desarrollo postnatal en el estriado, al mismo tiempo, una disminución o un aumento se observa en la corteza y la *sustancia nigra*, respectivamente (Checa et al., 2000). En el cerebro adulto, la expresión de NT-3 puede detectarse en estas tres estructuras cerebrales: estriado, corteza y sustancia nigra (Hohn et al., 1990; Canals et al., 1998; Checa et al., 2000). Los niveles de NT-3 en el estriado y en las otras dos estructuras son similares, mostrando alrededor de 3.5 y 4 ng por gramo de tejido, respectivamente (Yurek y Fletcher-Turner, 2001).

El mRNA de NT-4/5 en el cerebro se expresa en mucho menor grado que cualquier otra neurotrofina (Ibáñez, 1996). Los análisis con *Northern blot* muestran que NT-4/5 no se expresan en el cerebro humano adulto o fetal (Ip et al., 1992), sin embargo en el cerebro de rata adulto sí está reportado (Berkemeier et al., 1991). Utilizando la prueba de protección de RNAasa, se ha demostrado que NT-4/5 se expresa en el cerebro de la rata durante el desarrollo embrionario y aún más durante estadios postnatales (Timmusk et al., 1993). En la rata adulta, se han detectado niveles similares de mRNA^{NT-4/5} en el estriado y la corteza (Timmusk et al., 1993).

El gen de p75^{NTR} está ampliamente expresado en una gran variedad de poblaciones celulares durante las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso central. En los ganglios basales, el mRNA^{p75NRT} se ha detectado en el estriado en desarrollo (Mobley et al., 1989; Koh y Higgins, 1991), pero la expresión por hibridación *in situ* o por medio de inmunohistoquímica en el adulto es casi nula (Holtzman et al., 1992).

El gen de TrkA se expresa en algunas estructuras bien definidas del sistema nervioso central, mientras que los genes de TrkB (Klein et al., 1990) y TrkC (Lamballe et al., 1994) están ampliamente expresados en todo el sistema.

El inicio de la expresión del gen TrkA se lleva a cabo durante las etapas tempranas de la neurogénesis (entre los días 7.5 y 9.5 embrionarios) (Klein et al., 1990; Barbacid, 1994). En los ganglios basales mRNA^{TrkA} está confinado a las poblaciones neuronales colinérgicas del estriado (Hotzman et al., 1992; Fagan et al., 1997). En este núcleo, los niveles de TrkA incrementan durante el desarrollo postnatal, y son altos desde la segunda semana postnatal hasta la adultez (Ringstedt et al., 1993).

Los niveles de mRNA^{TrkB} aumentan durante las etapas embrionarias estriatales hasta el día embrionario 20, y después disminuyen gradualmente en el desarrollo postnatal (Jung y Bennett, 1996). La inmunohistoquímica para TrkB revela que las células y las fibras positivas para Trk empiezan a aparecer en parches en el día embrionario 19, donde el receptor a TrkB se localiza en la superficie de las neuronas estriatales de proyección (Costantini et al., 1999). Esta distribución persiste hasta el día postnatal 14, cuando se hace progresivamente más homogénea (Costantini et al., 1999). Ambas, la isoforma completa y la truncada del receptor a TrkB están uniformemente distribuidos en las neuronas espinosas medianas, mientras que las interneuronas gigantes sólo expresan la isoforma completa de TrkB (Yan et al., 1997; Costantini et al., 1999).

La expresión de TrkC se detecta en el primordio estriatal el día embrionario 16, alcanzando los niveles máximos dos días después (Jung y Bennett, 1996). Los niveles altos de mRNA de TrkC observados en el día embrionario 18 permanecen constantes hasta la primera semana postnatal, cuando empiezan a disminuir los niveles (Jung y Bennett, 1996; Checa et al., 2001). En el estriado adulto, la distribución celular de mRNA^{TrkC} es similar al de mRNA^{TrkB} (Merlio et al., 1992).

Implicaciones funcionales de las neurotrofinas en el estriado

Los patrones de regulación en el desarrollo del mRNA^{NGF} y de la proteína NGF sugieren que el NGF regula el desarrollo de las neuronas colinérgicas del estriado (Mobley et al., 1989). De hecho la administración intracerebroventricular del NGF incrementa el tamaño celular y promueve la diferenciación neuroquímica de las neuronas colinérgicas del estriado (Hagg et al., 1989; Vahlsing et al., 1991). La inyección de NGF durante el desarrollo prenatal incrementa específicamente el número de neuronas colinérgicas en el compartimiento matricial del estriado pero no en los estriosomas, lo que sugiere que el NGF está involucrado en la

maduración diferencial de estos compartimientos (Van Vulpén y Van der Kooy, 1999). Experimentos *in vitro* muestran que el NGF específicamente induce la actividad de ChAT y promueve la supervivencia de las neuronas colinérgicas estriatales (Mobley et al., 1985; Abiru et al., 1996).

El BDNF está presente en el estriado, pero los bajos niveles de mRNA^{BDNF} han llevado a buscar otras fuentes de esta neurotrofina para el estriado (Altar et al., 1997). La hipótesis del transporte anterógrado en la vía corticoestriatal está basada en la ausencia de expresión de esta neurotrofina en el estriado y en otras evidencias indirectas (Sobreviela et al., 1996). Aunque debe considerarse el transporte anterógrado, la presencia y regulación diferencial de la expresión de BDNF en el estriado después de diferentes tipos de lesiones (Canals et al., 1998), sugieren una acción local de esta neurotrofina en las neuronas estriatales. De hecho, el BDNF es un potente factor de supervivencia para las neuronas del estriado (Ventimiglia et al., 1995). Además induce la diferenciación de neuronas positivas a GABA (Ventimiglia et al., 1995), a calbindina (Ventimiglia et al., 1995; Ivkovic and Ehrlich, 1999) y a DARP-32 (Nakao et al., 1995; Ehrlich, 1999).

NT-3 tiene también efectos neurotróficos en neuronas del estriado, de la corteza y de la sustancia *nigra*. NT-3 incrementa el número de neuronas positivas a GABA y calbindina en los tejidos estriatales (Ventimiglia et al., 1995). Esta neurotrofina también promueve la supervivencia y diferenciación de neuronas positivas a DARP-32, aumentando el tamaño de las neuritas y el área del soma (Nakao et al., 1996).

NT-4/5 comparte varios efectos neurotróficos con BDNF pues también actúa sobre TrkB. NT-4/5 incrementa la supervivencia y diferenciación de neuronas positivas a GABA, calbindina y calretinina en cultivos estriatales (Ventimiglia et al., 1995).

Las neurotrofinas como factores de diferenciación y supervivencia y por su participación en el desarrollo de las poblaciones neuronales están estrechamente relacionadas con los cambios en el citoesqueleto. Es por esto que las proteínas que conforman el citoesqueleto pueden utilizarse como marcadores que asocien el desarrollo neuronal con las neurotrofinas presentes en las diferentes etapas del desarrollo.

2.4. El citoesqueleto

El citoesqueleto consiste en una red de filamentos proteicos que se extiende a través de todo el citoplasma de las células eucariontes. El citoesqueleto provee de un marco estructural a la célula, actuando como guías que determinan la forma y organización general del citoplasma. Además, el citoesqueleto es responsable de los movimientos celulares, no solamente de los movimientos de toda la célula, también del transporte interno de organelos y otras estructuras a través del citoplasma.

Los neurofilamentos son proteínas del citoesqueleto neuronal que constituyen a los denominados filamentos intermedios. Estas proteínas filamentosas tienen un diámetro entre 8 y 10 nm y se anclan a una red submembranal de actina y a los microtúbulos. Los neurofilamentos representan una familia de heteropolímeros de proteínas conformados por una subunidad ligera, una mediana y una pesada y se ha propuesto que estos, y en general los filamentos intermedios proveen a las neuronas de estabilidad estructural, además de servir de rieles que guían el transporte de organelos a través del citoplasma somático, dendrítico y axonal (Thomas et al., 2001).

Los microtúbulos, polímeros de forma cilíndrica compuestos por α y β -tubulina, son uno de los componentes principales del citoesqueleto neuronal, y asociados a estos existen numerosas MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos), incluida MAP-2, que es la más abundante en el cerebro (Jonson y Jope, 1992). MAP-2 es una proteína estable al calor y se han identificado varios dominios funcionales en ella (Kindler et al., 1990; Lee et al., 1988). En el cerebro adulto, MAP-2 está altamente concentrada en dendritas y virtualmente ausente en los axones. (Bernhardt y Mathus, 1984; De Camilli et al., 1984; Kosik y Finch 1987). La expresión de MAP-2 coincide con el crecimiento y las ramificaciones neuríticas en diferentes líneas celulares (Ferreira et al., 1990) y en cultivos primarios (Chamak et al., 1991; Ferreira et al., 1989). Las neuronas estriatales o mesencefálicas de rata, crecidas en cultivos bajo distintas condiciones, exhiben ramificaciones dendríticas diferenciales (Chamak et al., 1987). Por lo tanto, existe evidencia abundante de que MAP-2 juega un papel importante en el desarrollo y la expresión de la morfología dendrítica que podría estar regulada por la expresión de los factores neurotróficos.

3. JUSTIFICACIÓN

La expresión de las neurotrofinas es crucial para el establecimiento de conexiones neuronales para el funcionamiento adecuado de la red neuronal presente en el núcleo estriado. Las alteraciones en la expresión de neurotrofinas durante el desarrollo, podrían ser parte de la causa de la muerte celular vista en ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, Parkinson u otras alteraciones que afecten el funcionamiento de los ganglios basales.

Si bien en estudios previos se ha mostrado la presencia del RNA mensajero de las neurotrofinas usando técnicas de hibridación o determinación de la presencia de sus receptores, este trabajo intenta visualizar la expresión in situ normal de las neurotrofinas (presencia de la proteína) a lo largo del desarrollo y será un marco de referencia para estudios posteriores en los que se evaluarán cambios en su expresión en condiciones patológicas.

4. HIPÓTESIS

- Existe una expresión espacio-temporal diferente de las distintas neurotrofinas en la región dorsal-lateral del estriado y ésta se relaciona con la maduración de las distintas poblaciones celulares de este núcleo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

► Dilucidar los patrones de la expresión diferencial de las neurotrofinas en la región dorsal-lateral del núcleo estriado en cerebros de ratones en edades postnatales (10, 14, 21, 42 y 80 días).

5.2 Objetivos particulares

I. Describir el patrón de expresión temporal de las neurotrofinas y su relación con la maduración morfológica de las neuronas en el estriado de ratón durante el desarrollo postnatal.

II. Describir el patrón de distribución de marcadores sinápticos de citoesqueleto axonal y dendrítico.

III. Establecer posibles relaciones del patrón de distribución de las neurotrofinas con los marcadores de sinapsis y de citoesqueleto dendrítico y axonal.

6. MÉTODO

6.1 Preparación

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57 BL6 de 10, 21, 42 y 80 días de nacidos. Los animales se perfundieron intracardialmente con una solución salina (NaCl 0.15 M) seguida de una solución de paraformaldehído (4%) en amortiguador de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M). Los cerebros se disecaron y postfijaron en la misma solución de paraformaldehído por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron crioprotegidos en una solución de sacarosa (30%) para ser congelados en metil butano, posteriormente se preservaron a -20 grados centígrados hasta su corte y procesamiento. El tejido congelado se colocó en un crióstato y se cortaron rebanadas cerebrales coronales de 30µm de espesor. Los cortes que incluían la región estriatal se colectaron en una solución amortiguadora de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1 M a pH 7.4).

6.2 Protocolo experimental

6.2.1 Inmunocitoquímica

Se incubaron los cortes en suero de bloqueo que contiene 3% de albúmina bovina y 0.3% de tritón x-100 en amortiguador de fosfatos durante veinticuatro horas a 4 °C.

Se incubaron los cortes con anticuerpos primarios dirigidos contra las neurotrofinas: BDNF, NT-3 y NT-4/5; contra algunos marcadores de sinapsis y de citoesqueleto dendrítico y axonal: sinaptofisina, neurofilamentos y MAP-2 y contra marcadores de tipos celulares: GAD y ChAT diluidos 1:1000 en suero de bloqueo (1 µl de anticuerpo en 999 del amortiguador diluyente). Se mantuvieron en agitación los cortes durante toda la noche a 4 °C.

Se realizaron tres lavados de quince minutos cada uno con solución amortiguadora de fosfatos con tritón (PB-tritón) al 0.3 % a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se incubaron los cortes con anticuerpos secundarios conjugados a biotina diluidos 1:500 en suero de bloqueo (1 µl de anticuerpo en 499 µl del amortiguador diluyente), durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación. Se realizaron tres lavados de quince minutos cada uno con solución PB-tritón a temperatura ambiente y en agitación.

Después de los lavados se incubaron durante una hora en una solución del complejo avidina-peroxidasa (ABC Kit de Vector) con PB-tritón (2.5 ml de A y 2.5 ml de B por cada 995 ml de amortiguador diluyente) a temperatura ambiente y en agitación. Se repitieron los tres lavados de quince minutos cada uno, con PB-tritón a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente se reveló la actividad de peroxidasa utilizando el kit de DAB (diaminobencidina, Vector) siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.2.2 Análisis de la inmunotinción producida por las neurotrofinas.

Para analizar los resultados se tomaron fotografías de la región dorsal-lateral del núcleo estriado con un microscopio de luz Nikon acoplado a una cámara digital. Los valores de iluminación y contraste se mantuvieron fijos durante la captura de todas las imágenes. Se capturaron áreas de la región dorsal-lateral de $252 \mu\text{m}^2$. El número de células inmunorreactivas a las distintas neurotrofinas se determinó por densitometría, mediante la detección de la marca con ayuda del programa Image J, definiendo el umbral de la intensidad de tinción y manteniéndolo fijo para todas las imágenes con inmunotinción para la misma neurotrofina y de la misma edad. Para la comparación estadística de la expresión de cada neurotrofina en las distintas edades, los datos obtenidos se promediaron por grupos de edades por cada neurotrofina y se compararon mediante un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia mínimo de $p < 0.05$.

Para contrastar la expresión de las tres neurotrofinas en la misma edad, se compararon los promedios con una prueba de análisis de varianza Post Hoc de Bonferroni con un nivel de significancia mínimo de $p < 0.05$

6.2.3 Análisis de la tinción por inmunorreactividad a marcadores de citoesqueleto y sinapsis.

Con el fin de hacer un correlato del desarrollo morfológico de las células y de la expresión de las neurotrofinas, se emplearon marcadores de dendritas (MAP-2), de axones (neurofilamentos, NF) y de las sinapsis (sinaptofisina, SIN). Se capturaron imágenes de la misma región como se describió anteriormente. Las diferencias en la expresión de los marcadores de dendritas, axones y sinapsis en las distintas edades se estimaron estableciendo un umbral de intensidad de la marca para eliminar el fondo y determinando el área total

marcada con el programa Image J. Para la comparación estadística de cada marcador en las distintas edades, los datos obtenidos fueron promediados por grupo de edades por cada marcador y sometidos a una prueba de análisis de varianza con un nivel de significancia mínimo de $p < 0.05$.

6.2.4 Análisis de la tinción producida por inmunorreactividad a dos marcadores de tipos celulares.

Con el fin de identificar la presencia y maduración de los distintos grupos neuronales, se utilizaron marcadores para la Acetilcolina-transferasa (Chat), presente en las interneuronas colinérgicas; y para la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), presente en las interneuronas GABAérgicas y en las células GABAérgicas espinosas medianas. Se realizó el mismo procedimiento antes descrito para la captura de las imágenes. El número de células positivas a los diferentes marcadores celulares se determinó realizando el conteo de las mismas, igual al descrito para las neurotrofinas. El análisis estadístico se llevó a cabo igualmente, comparando los promedios de los grupos de edades con un análisis de varianza con nivel de significancia mínimo de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Detección de BDNF

Para evaluar si existe una expresión diferencial del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el desarrollo postnatal, se determinó el promedio de células marcadas por inmunorreactividad en ratones de 10, 21, 42 y 80 días postnatales. Se eligieron tales edades por ser éstas donde puede observarse el desarrollo de la enfermedad de Huntington en el modelo transgénico en ratones (presintomáticos y sintomáticos fisiológicos y conductuales) con los que pretende compararse en estudios posteriores. Nuestros resultados muestran que en los cerebros de ratones de 10 días de edad, se detecta el mayor número promedio de células marcadas en comparación con las demás edades (178 ± 20 células) como muestra la fig 4 a. La inmunotinción se presenta esencialmente en somas pequeños (fig 5 a). Hacia el día 21, la marca disminuye considerablemente, en un 80.3% (36 ± 14 células). La marca continúa presentándose principalmente en los somas aunque también en neuropilo (fig 5 b). En el día 42 vuelve a aumentar la marca, dando un promedio de células teñidas igual a 80 ± 23 células (fig 5 c). Hacia el día 80 postnatal, la marca disminuye considerablemente a solo el 12% de la inicial (23 ± 9 células)(fig 4 d).

7.2 Detección de NT-3

Los cerebros de ratones postnatales no mostraron diferencia significativa en la expresión de la neurotrofina 3 a lo largo de las cuatro edades. El número promedio de células positivas a NT-3 oscila entre 90 y 117 siendo su pico máximo de expresión hacia el día 21 con 155 ± 19 células marcadas (fig 4 b). La inmunotinción es esencialmente neuropilar en los primeros días postnatales (10 y 21) como se ve en los paneles a y b de la figura 6 y después se observa en somas de tamaño pequeño y grande hacia los 80 días de edad (Fig 6 c y d).

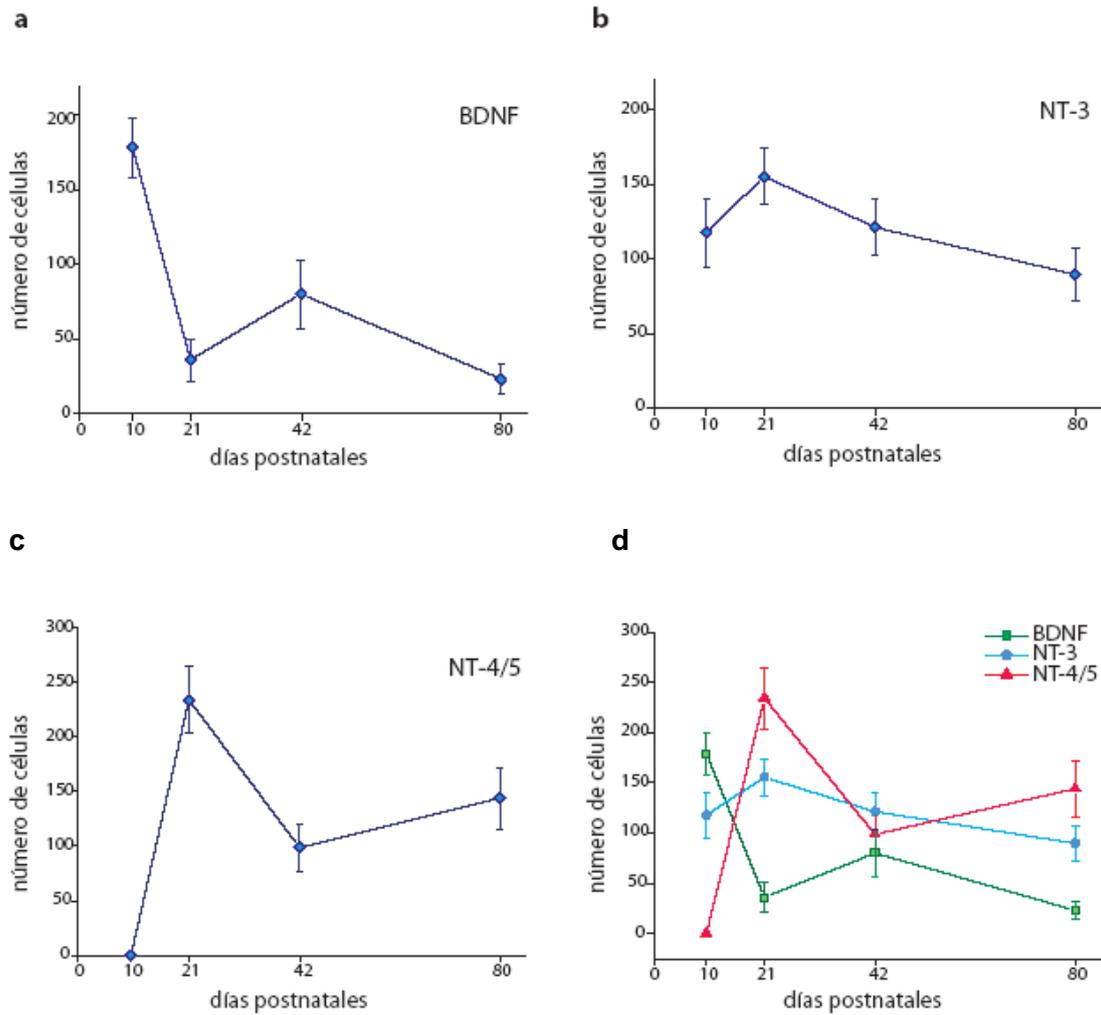


Fig. 4. Número promedio de células positivas a BDNF, NT-3 y NT-4/5 a lo largo del desarrollo postnatal. Las gráficas ilustran el número de células marcadas por inmunorreactividad a (a) BDNF, (b) NT-3 y (c) NT-4/5. Se encontraron diferencias significativas entre la expresión de BDNF y NT-4/5 en distintas edades. ANOVA $p < 0.000002$ y $p < 0.001$ respectivamente. Para NT-3 no se encontraron diferencias significativas entre las fluctuaciones ocurridas a lo largo de las 4 edades. En el panel (d) se muestra la relación de la expresión de las tres neurotrofinas en cada edad. Se observa una relación inversa entre el BDNF y la neurotrofina 4/5 mientras que NT-3 presenta un patrón de tinción diferente. Nótese que en el día 42 postnatal, las tres neurotrofinas se presentan expresadas en un número de células muy similar.

7.3 Detección de NT-4/5

No se detectó inmunorreactividad para la neurotrofina 4/5 en el día postnatal 10, sin embargo hacia el día 21 se observó el pico máximo de células teñidas (234 ± 30 células). En los cerebros de ratones de 42 días postnatales, la marca disminuye en un 58% (98 ± 21 células) para después volver a incrementarse pero no significativamente (144 ± 28 células) (Fig 4 c). La marca se encuentra en neurópilo y somas predominantemente pequeños (fig 7).

7.4 El BDNF y la neurotrofina 4/5 muestran un patrón de relación inversa a lo largo de las edades estudiadas en la región dorsal-lateral del núcleo estriado.

Los resultados mostraron una clara relación inversa entre la expresión de BDNF y la de NT-4/5. Es decir, en el día postnatal 10, el BDNF tiene su mayor expresión, mientras que la NT-4/5 presenta la menor (no expresada). Del mismo modo, a lo largo de las cuatro edades, cuando una aumenta su expresión, la otra la disminuye (fig 4 d). Cabe mencionar que en el día postnatal 42, ambas tienen un número promedio de células positivas no significativamente diferentes. Incluso la neurotrofina-3 tiene una expresión muy parecida en esta misma edad.

La expresión de la NT-3 tiene un comportamiento en su expresión muy similar a NT-4/5, sin embargo no se observa la misma relación con BDNF (fig. 4 b y d).

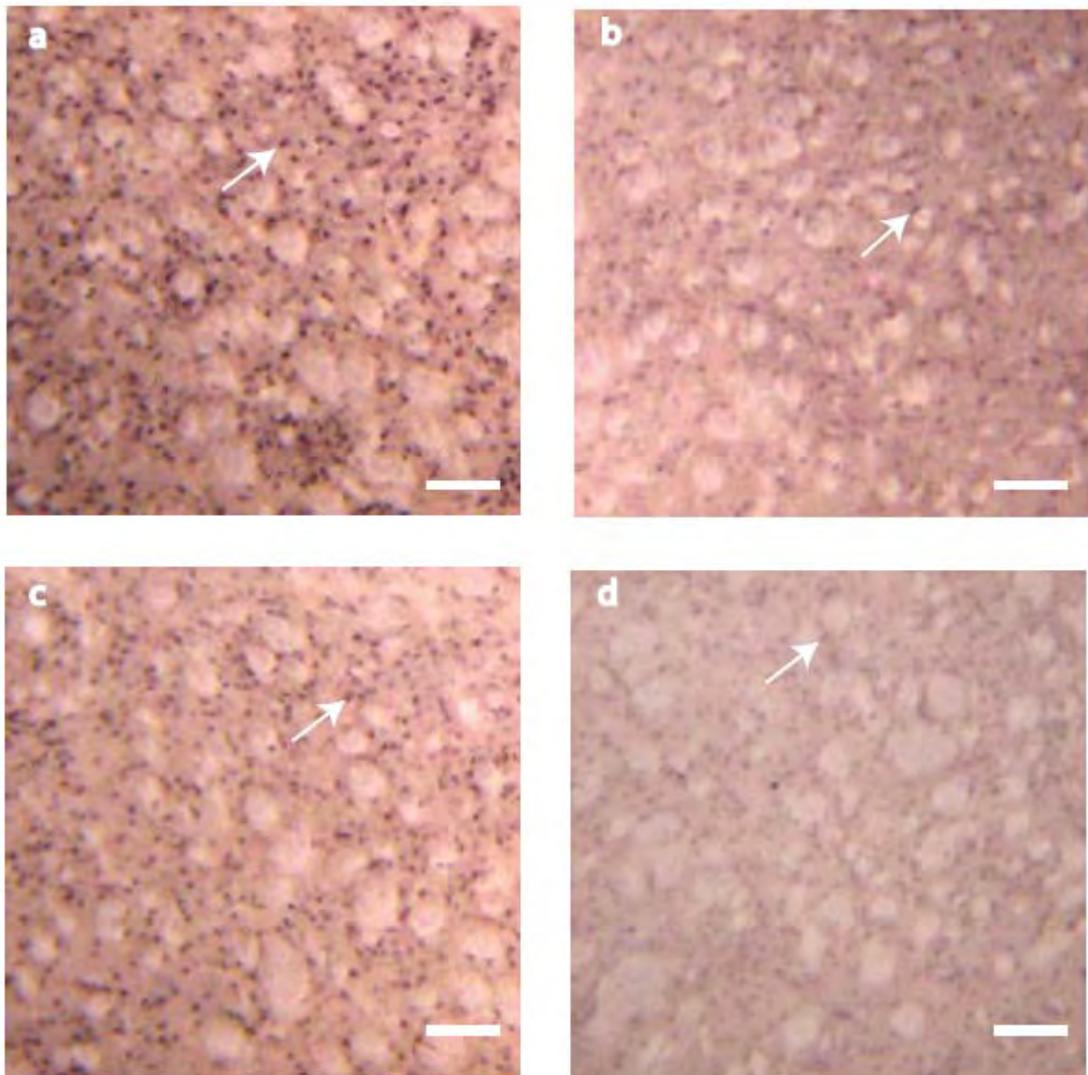


Fig. 5. BDNF. Detección de la marca por inmunorreactividad de la neurotrofina BDNF. En la edad 10 postnatal (*a*) se detecta el mayor número de células promedio marcadas. La tinción se presenta esencialmente en somas pequeños. En la edad 21 (*b*) la marca disminuye considerablemente y continúa presentándose principalmente en somas pequeños (flecha). A los 42 días (*c*), la marca aumenta de nuevo y hacia el día 80 (*d*) disminuye considerablemente presentando la menor marca de todas las edades. Barra de escala 160 μm

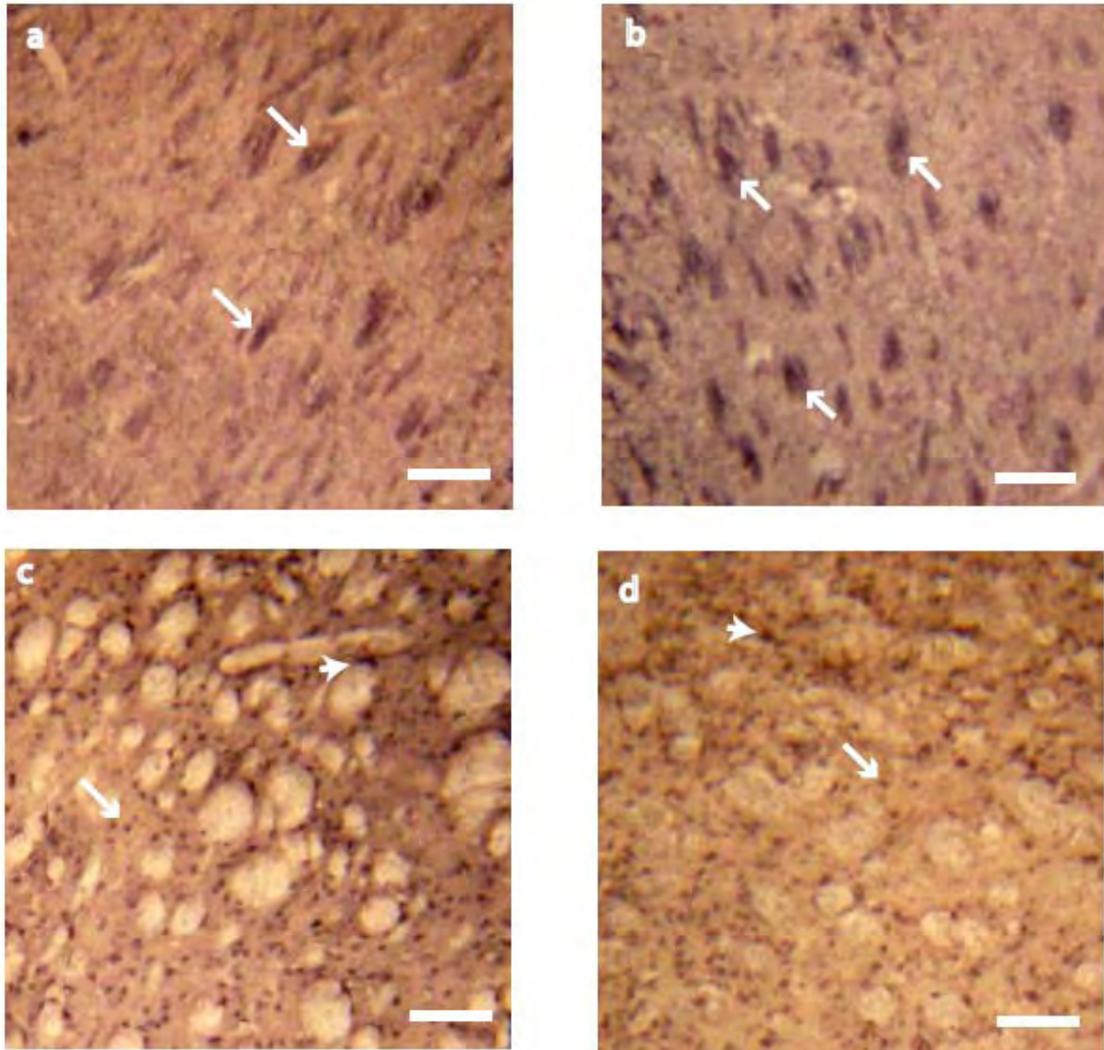


Fig. 6. Detección de la marca por inmunorreactividad de la neurotrofina-3. (*a y b*) Región dorsal lateral del estriado de ratón de 10 y 21 días postnatales respectivamente, la marca se muestra en neurópilo; (*c y d*) marca para los días postnatales 42 y 80, la marca se presenta en somas grandes (punta de flecha) y pequeños (flecha). Barra de escala 160 μm

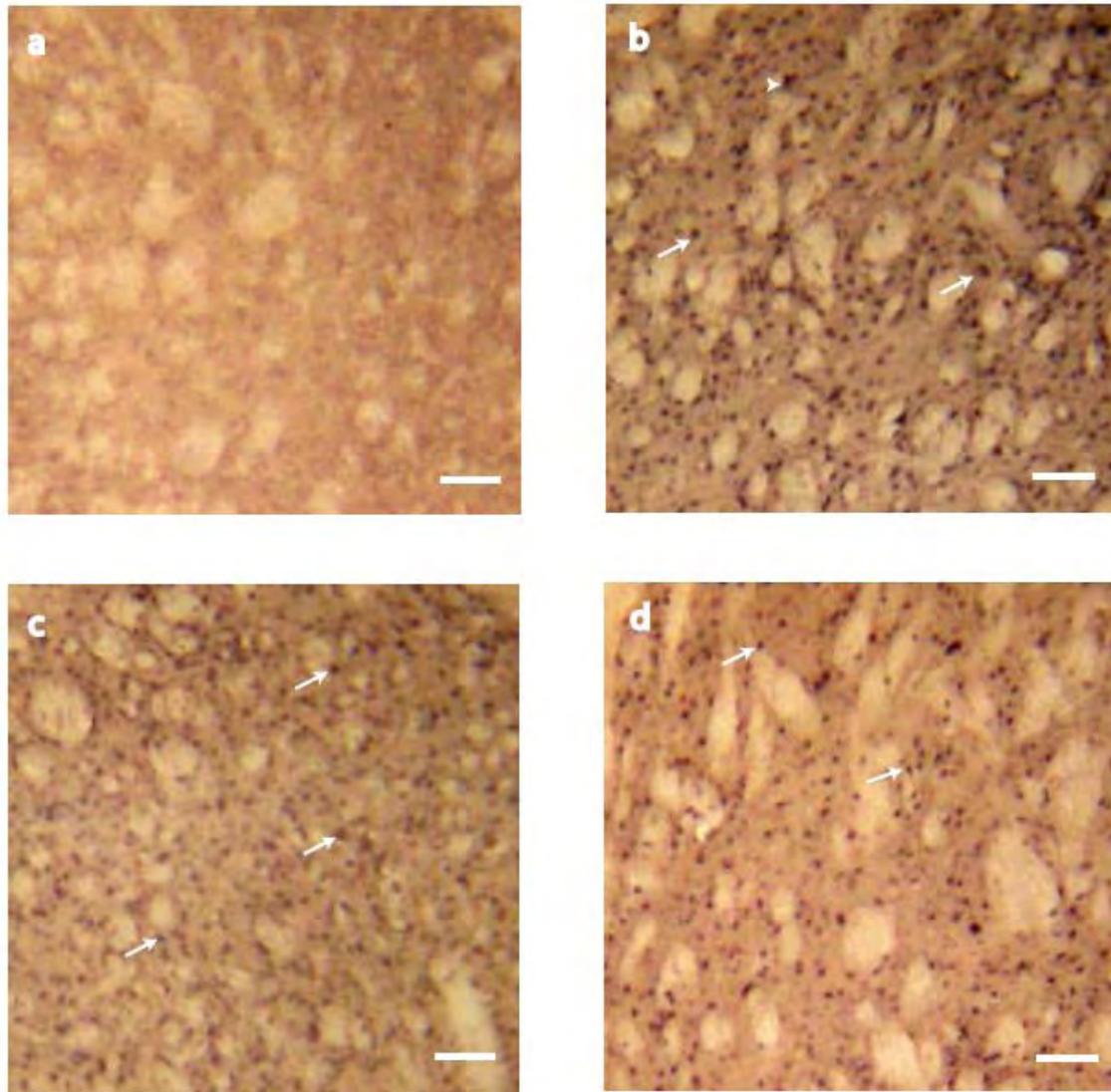


Fig. 7. Detección de la marca por inmunorreactividad de la neurotrofina 4/5. La marca en las cuatro edades se presenta en somas pequeños. (a) Los cerebros de 10 días postnatales no mostraron marca para NT-4/5. (b) Hacia el día 21 se observa el pico máximo de la marca en somas predominantemente pequeños (flechas) aunque también se observó en algunos somas más grandes (punta de flecha). (c) En los cerebros de 42 días postnatales se observa disminución significativa de la marca que después aumenta hacia el día 80 (d), pero no significativamente. Barra de escala 160 μ m

7.5 Detección de marcadores de tipo celular: GAD y ChAT.

7.5.1 GAD

Con el fin de dilucidar algún posible patrón de tinción de ambas enzimas, relacionado con los encontrados para las neurotrofinas, se determinó el número promedio de células marcadas por inmunorreactividad a la deshidrogenasa del ácido glutámico (GAD). El número promedio de células marcadas en las cuatro edades oscila entre 205 y 283 pero los cambios no son significativos, pues los errores estándar son altos (fig. 8a). La marca se observa en los somas de células pequeñas (fig. 9).

7.5.2 ChAT

La marca observada por inmunotinción a la acetilcolina-transferasa (ChAT) es ligeramente mayor a los 10 días postnatales hacia el día 21 la marca disminuye y permanece constante hasta el día 80 postnatal. Sin embargo, la diferencia mostrada en el día 10, con respecto a las demás edades, no resultó significativa cuando se aplicó la prueba estadística (fig. 8a). La marca se observa en los somas grandes de las neuronas colinérgicas, también se observa en dendritas (fig. 10).

7.6 Solamente NT-3 y GAD muestran un patrón similar de tinción pero no presentan cambios significativos en las cuatro edades.

La neurotrofina 3 y la enzima GAD coinciden en la dirección de los cambios en la inmunotinción a lo largo de las cuatro edades. NT-3 y GAD muestran un aumento del día 10 al día 21 (donde en ambos casos se presenta la expresión más alta), para disminuir ligeramente en las siguientes edades evaluadas. Sin embargo, aunque el patrón de tinción es muy similar, no se encontraron diferencias significativas en los cambios durante las cuatro edades (Fig 8b).

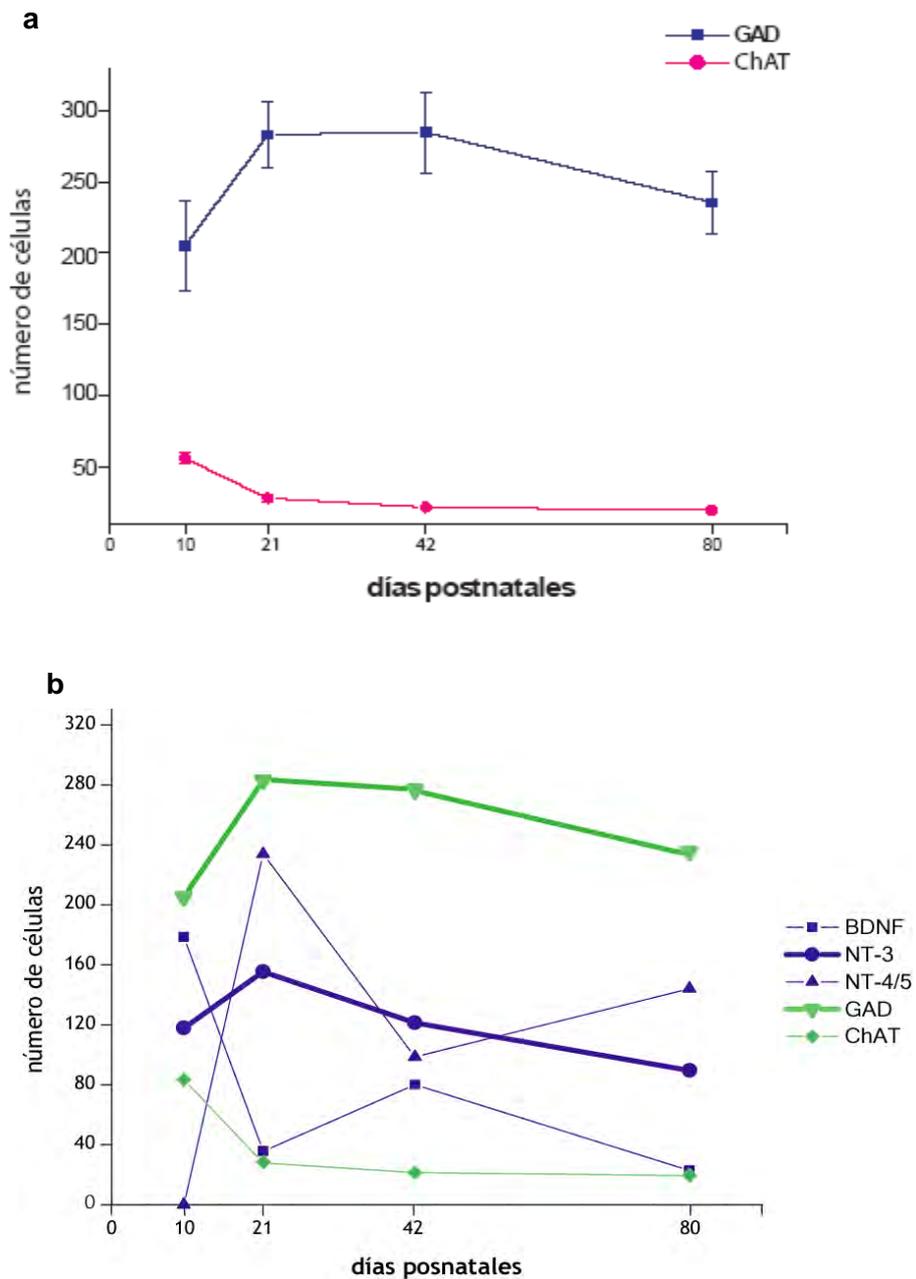


Fig. 8. Expresión de marcadores de tipo celular en el núcleo estriado de ratón en edades postnatales y su correlación con la expresión de las neurotrofinas. (a) Gráfica que ilustra el número promedio de células positivas a marcadores de tipo celular, GAD y ChAT en las que se muestra que el número de células positivas para GAD ($n=12$) es mucho mayor que el encontrado para ChAT ($n=13$). Sin embargo la expresión de ambos marcadores a lo largo de las cuatro edades es casi constante, ANOVA $p<0.001$; $n=9$ (b) Gráfica que muestra la correlación entre la expresión de los marcadores de tipo celular (líneas verdes) y las neurotrofinas (líneas azules) donde se puede ver que NT-3 y GAD (líneas gruesas) presentan un patrón similar pero los cambios en las edades no tienen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos. ANOVA $p<0.001$ (Los errores estándar no se muestran en b para mayor claridad).

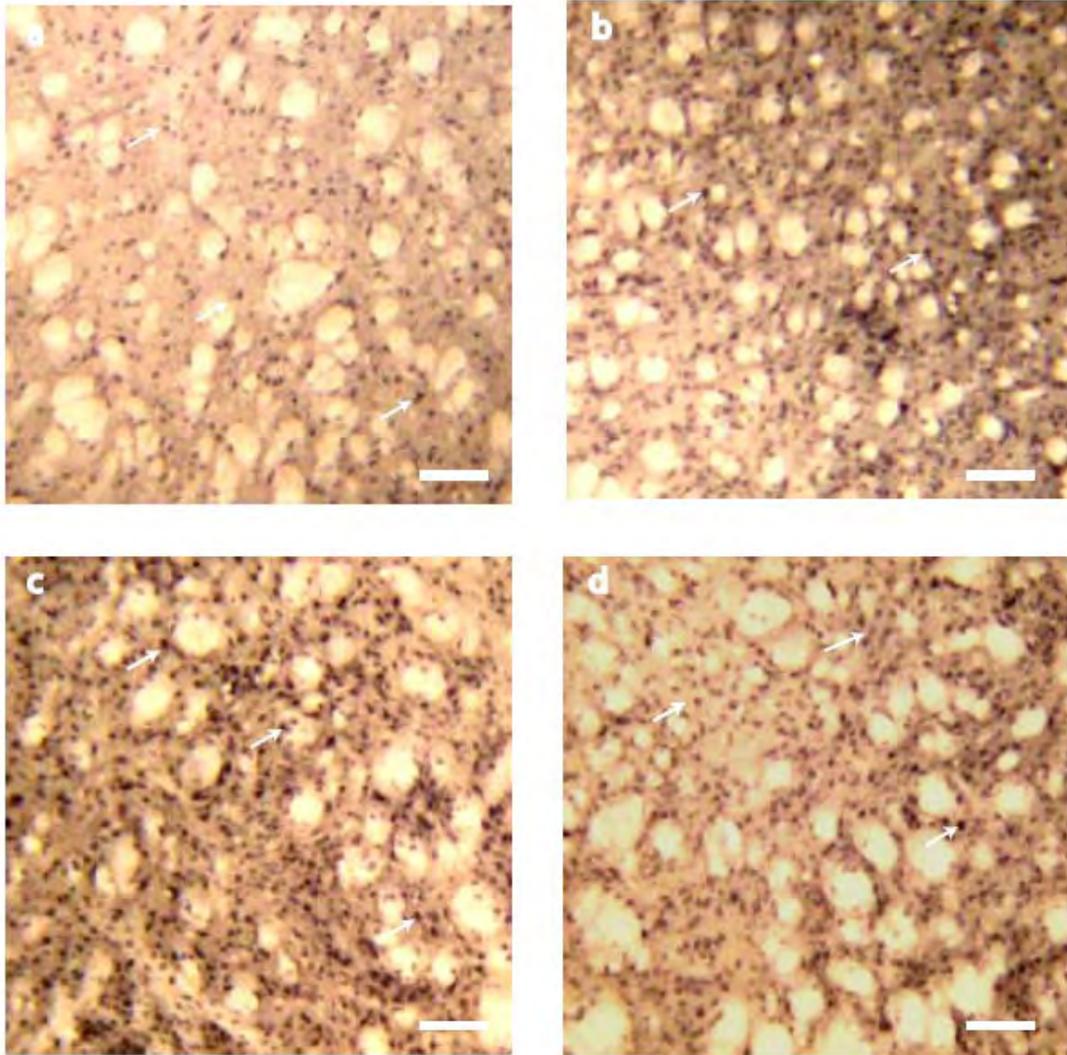


Fig. 9. Detección de la marca por inmunorreactividad a la enzima deshidrogenasa del ácido glutámico (GAD). Aunque en *a* se muestra menor marca para esta enzima, los promedios en las cuatro edades, 10, 21, 42 y 80 días (*a*, *b*, *c* y *d* respectivamente) no revelaron diferencias significativas. En las cuatro edades la marca se presentó en somas pequeños. Barra de escala 160 μm

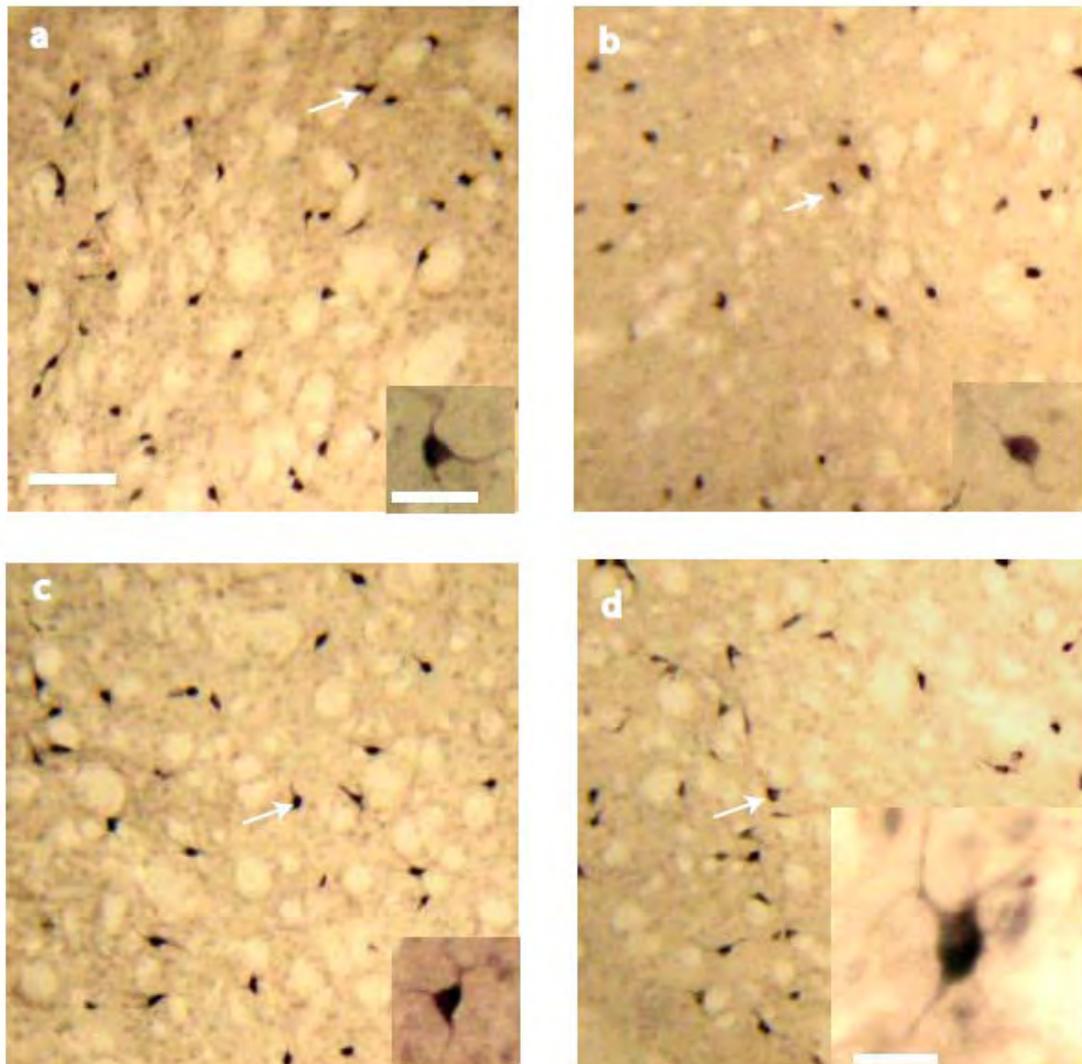


Fig. 10. Detección de la marca por inmunorreactividad a la enzima Acetilcolina-transferasa (ChAT). Los promedios en las cuatro edades postnatales estudiadas, 10, 21, 42 y 80 días (*a*, *b*, *c*, *d* respectivamente) no revelaron diferencia significativa. En las cuatro edades la marca se presentó en somas grandes. Barra de escala, 160 μm ; aumento a, b y c, 50 μm ; aumento en d, 20 μm .

7.7 Detección de marcadores de citoesqueleto dendrítico y axonal: neurofilamentos y MAP-2.

7.7.1 Neurofilamentos

Los cerebros de 10 días postnatales mostraron un área marcada por inmunorreactividad de 8773.3 pix² para neurofilamentos, hacia el día 21 mostraron el área marcada mayor (14228.07 pix²), disminuyendo otra vez hacia el día 42 donde se registró un área de 13577.4 pix² y aumentando ligeramente en el día 80 (10989.7 pix²). Los cambios observados y no mostraron diferencia significativa con la prueba estadística (fig.11a). La inmunotinción se encuentra en los axones neuronales (fig.12)

7.7.2 MAP-2

La inmunotinción de MAP-2 fue la mayor, mostrando un área total marcada que oscila entre los 39936.5 y 43681 pix² (fig 11a). Sin embargo, los cambios ocurridos en las cuatro edades no son significativos pues los valores permanecen casi constantes (fig.13).

7.8 Detección de un marcador de sinapsis: sinaptofisina

Con el fin de dilucidar alguna relación de los patrones de expresión de las neurotrofinas con los eventos involucrados con la liberación de neurotransmisores, se observó el patrón de inmunotinción que un anticuerpo contra una proteína de vesículas sinápticas: sinaptofisina.

Esta proteína se encontró fuertemente expresada en el neurópilo, específicamente alrededor de la neurona (Fig. 14). Los valores de la superficie marcada (pix²) oscilan entre los 30130.5 y los 33433.5 pix² pero no mostraron cambios significativos a lo largo de las 4 edades postnatales estudiadas (Fig 11a)

7.8 Solamente NT-3 y Neurofilamentos muestran un patrón similar de tinción pero no presentan cambios significativos en las cuatro edades.

La neurotrofina 3 y los neurofilamentos coinciden en la dirección de los cambios a lo largo de las cuatro edades pues mantienen un patrón de relación directa. Sin embargo el patrón de tinción y la dirección de los cambios no presentan diferencias significativas en ninguno de los dos casos (Fig. 11b).

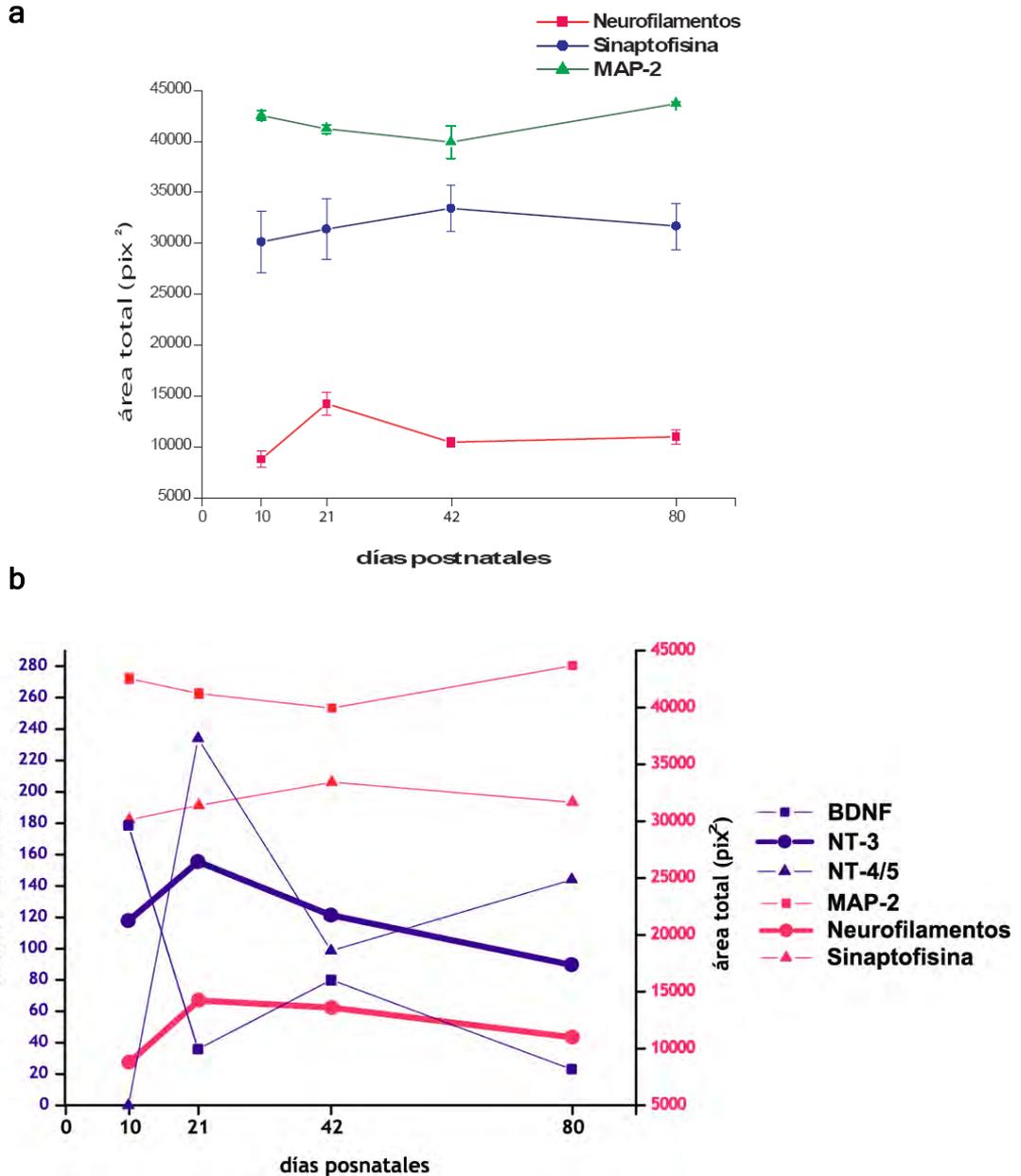


Fig. 11. Expresión de proteínas de citoesqueleto y de sinapsis en el núcleo estriado de ratón en edades postnatales y su comparación con la expresión de las neurotrofinas. (a) Gráfica que ilustra el área total promedio (pix^2) teñida por inmunorreactividad a marcadores de citoesqueleto dendrítico y axonal, MAP-2 y neurofilamentos respectivamente; y un marcador de sinapsis, sinaptofisina. Se muestra que el área marcada por inmunorreactividad a MAP-2 es la mayor de las tres, mientras que neurofilamentos se expresa en mucho menor grado en estas edades. También se ilustra que la expresión de los tres marcadores a lo largo del tiempo no tiene diferencia significativa entre las edades estudiadas, ANOVA $p < 0.001$; $n = 16$. (b) Gráfica que compara la expresión de los marcadores de citoesqueleto y sinapsis (líneas y escalas rojas) con la expresión de las neurotrofinas (líneas y escala azules). Nótese que los únicos patrones similares se encuentran en NT-3 y neurofilamentos (líneas gruesas), pero los cambios en las edades no son significativos en ninguno de los dos casos. ANOVA $p < 0.001$. (En esta gráfica no se muestran los errores estándar para mayor claridad).

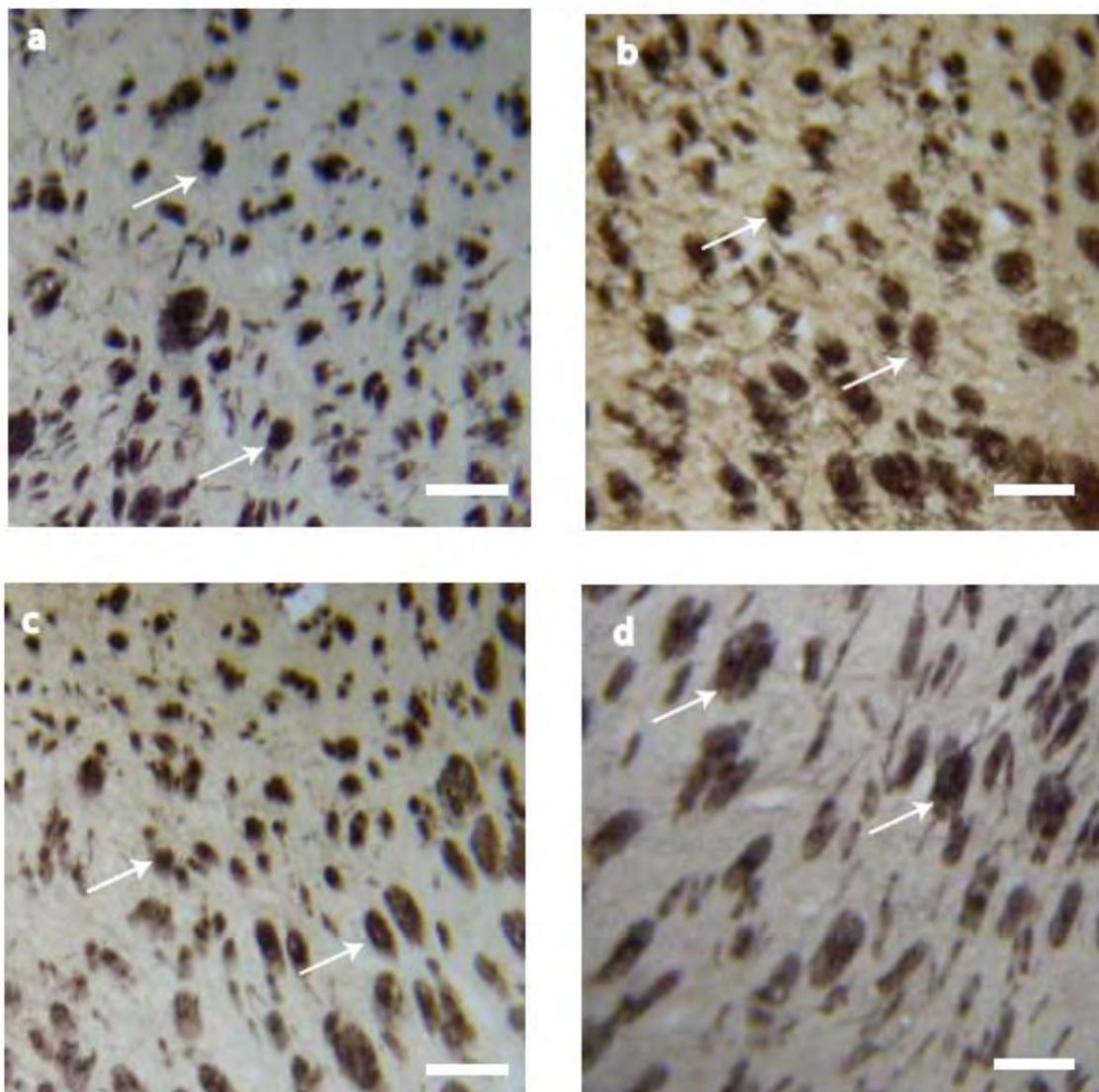


Fig. 12. Detección de la marca por inmunorreactividad a neurofilamentos. Los promedios en las cuatro edades postnatales estudiadas, 10, 21, 42 y 80 días (*a, b, c, d* respectivamente) no revelaron diferencia significativa. En las cuatro edades la marca se presentó en axones (flechas). Barra de escala, 160 μ m.

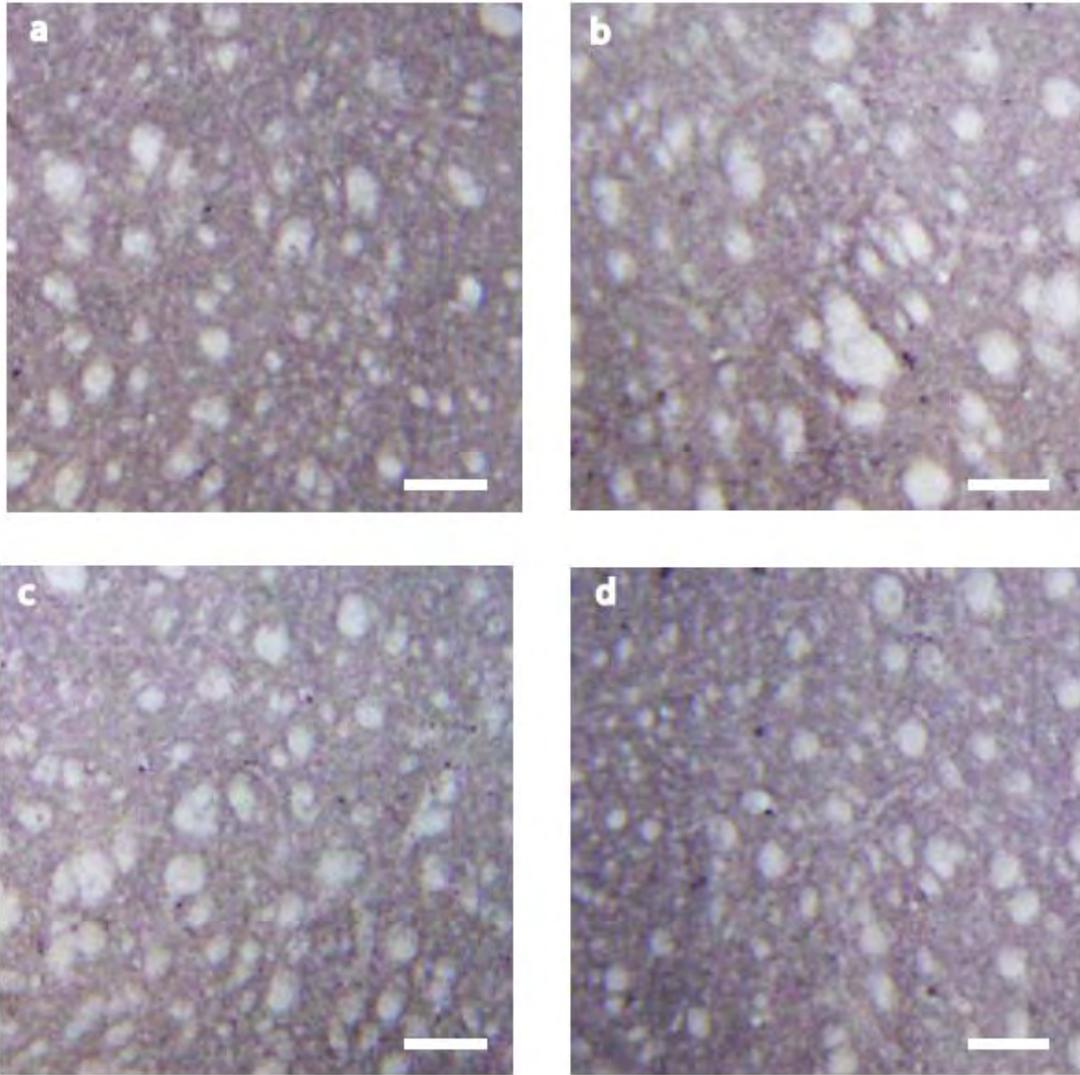


Fig. 13. Detección de la marca por inmunorreactividad a la proteína asociada a microtúbulos MAP-2. Los promedios en las cuatro edades postnatales estudiadas, 10, 21, 42 y 80 días (*a*, *b*, *c* y *d* respectivamente) no revelaron diferencia significativa. En las cuatro edades la marca se presentó en dendritas, alrededor de los somas. Barra de escala, 160 μ m.

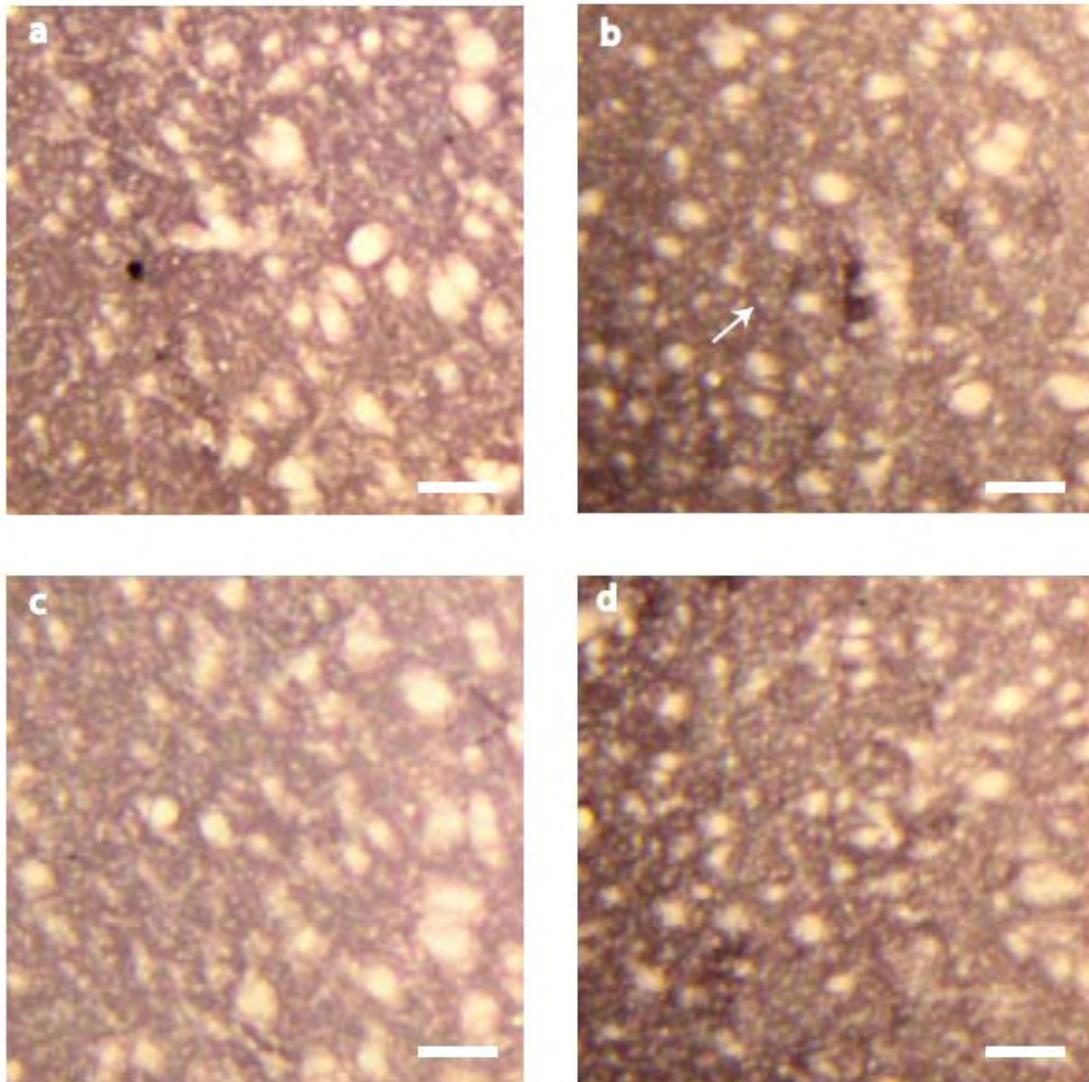


Fig. 14. Detección de la marca por inmunorreactividad a la proteína de vesículas sinápticas: sinaptofisina. Los promedios en las cuatro edades postnatales estudiadas, 10, 21, 42 y 80 días (*a*, *b*, *c* y *d* respectivamente) no revelaron diferencia significativa. En las cuatro edades la marca se presentó alrededor de los somas (flecha). Barra de escala, 160 μ m.

8. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que las neurotrofinas se expresan de manera diferencial a lo largo de las cuatro edades (10, 21, 42 y 80 días postnatales). BDNF, NT-3 y NT-4/5 están expresadas en la región dorsal-lateral del núcleo estriado.

8.1 El BDNF y la neurotrofina 4/5 muestran un patrón de tinción de relación inversa entre ellas mientras que la neurotrofina-3 muestra un patrón diferente.

BDNF fue la única neurotrofina expresada por inmunotinción en la edad posnatal de 10 días y después disminuye conforme aumenta la edad. Según los resultados Katoh-Semba et al. 1989, BDNF está ampliamente expresada durante el periodo embrionario y su expresión cambia durante el desarrollo cerebral. Nuestros resultados sobre la expresión de la proteína BDNF correlacionan bien con la presencia de mRNA^{TrkB} de su receptor a proteína en el neostriado, que está altamente expresado durante el desarrollo embrionario y disminuye en edades postnatales (Jung A.B and Bennett J.P.J., 1996). Por otro lado, estudios recientes demuestran que la expresión de mRNA^{BDNF} exhibió una reducción significativa en las edades postnatales de 21 y 42 días en comparación con la edad postnatal de 10 días (Zermeño et al., 2009).

El patrón de tinción obtenido para la neurotrofina 4/5 mostró una relación inversa a la encontrada para el BDNF como se describió en los resultados. Pérez-Navarro reporta en 1999 que BDNF y NT-3, pero no NT-4/5 regulan la morfología del soma de las neuronas de proyección en el estriado pero no detectaron ningún efecto en la expresión de GAD o mRNA de neuropéptidos, cuando se trata de dosis bajas. Mientras que altas dosis de estas neurotrofinas regulan los niveles de mRNA de neuropéptidos. También mostraron que BDNF y NT-4/5 regulan diferentes funciones en el mismo tipo celular, por ejemplo BDNF pero no NT-4/5, incrementa el área del soma en el estriado. Otra comparación entre ambas neurotrofinas (Ardelt et al., 1994; Arenas et al., 1996; Hyman et al., 1994) demuestra que las neuronas GABAérgicas estriatales responden diferencialmente a BDNF y a NT-4/5. De acuerdo con los resultados obtenidos (Fig 4) podemos suponer que el efecto que producen BDNF y NT-4/5 sobre las poblaciones neuronales es diferente y específico. Aunque ambos se unen al mismo receptor *trkB*, su expresión es contrastante. Esto puede explicarse por una activación diferencial del receptor, es decir, cada neurotrofina desempeña funciones diferentes y específicas pero activando al mismo receptor, o quizá las acciones de NT-4/5 se sustituyan por

las acciones de BDNF en las células estriatales (Zermeño, et al., 2009). Esto lo harían manteniendo patrones de expresión que permitan llevar a cabo cada función en tiempos diferentes. Alternativamente, cada neurotrofina podría estar afectando distintas poblaciones neuronales en diferentes etapas del desarrollo.

La neurotrofina 3 presenta un patrón distinto y no correlacionado con las otras neurotrofinas probadas, cabe recalcar que la NT-3 activa al receptor *trkC* aunque se ha propuesto que también puede activar al receptor *trkB* pero en una proporción mucho menor (Barbacid, 1994). NT-3 presentó expresión en los fibras del estriado en las edades 10 y 21 días postnatales y en las células estriatales a los 42 días postnatales y sostenidamente hasta los 80 días postnatales. Este es el primer reporte acerca del tejido estriatal de ratón que documenta diferencia espacial en la expresión de NT-3 a las 10 y 21 días postnatales, donde ésta neurotrofina se localiza en los fibras neuronales (Zermeño, et al., 2009). La expresión de NT-3 en los “bundles” del estriado en las edades 10 y 21 días postnatales podrían representar transporte anterógrado de NT-3 desde la corteza como ya se ha sugerido que ocurre (Altar and DiStefano, 1998)

8.2 BDNF, NT-3 Y NT-4/5 tienen un papel importante en los procesos celulares en la región dorsal-lateral del estriado pero no existe relación entre los patrones de expresión de las neurotrofinas y los marcadores de citoesqueleto a lo largo del tiempo.

Se ha descrito un transporte anterógrado del BDNF desde la corteza hacia el estriado, sugiriendo que esta neurotrofina juega un papel importante en este núcleo in vivo (Altar et al., 1997). En los ratones mutantes que no expresan BDNF, las neuronas de proyección estriatales muestran una reducción de calbindina (Jones et al., 1994) de dopamina y de la fosfoproteína regulada por cAMP con peso molecular 32,000 (DARP-32) (Ivkovic et al., 1997). Además se ha observado un aumento en la muerte celular apoptótica estriatal durante el desarrollo en los ratones mutantes que no expresan el receptor *trkB*. De acuerdo con nuestros resultados, el BDNF tiene un patrón de expresión específico y diferente a las demás neurotrofinas, lo que refuerza el argumento de que desempeña un papel importante en el núcleo estriado, y específicamente en la región dorsal-lateral, y que además depende, al menos en parte, de la expresión aumentada o disminuida a lo largo de las diferentes edades.

Resultados similares se obtuvieron para la neurotrofina 3 y la 4/5, presentan patrones específicos a lo largo de las cuatro edades, lo que supone funciones diferentes e importantes en la región dorsal-lateral del estriado.

No se encontraron diferencias de la presencia de neurofilamentos a lo largo de las edades. No existe en la literatura algún estudio relacionado y puede suponerse que las diferencias no se dan en estas etapas del desarrollo.

Resultados muy similares se obtuvieron con la expresión de la proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2) que históricamente se había percibido como una proteína estática y estructural necesaria, junto con otras proteínas de citoesqueleto, para el mantenimiento de la neuroarquitectura (Shafit y Kalcheva, 1998). Más recientemente se ha descubierto que MAP-2 es sensible a muchos estímulos e investigaciones recientes han revelado funciones dinámicas para la MAP-2 en el crecimiento, diferenciación y plasticidad de las neuronas; con un papel importante en la respuesta neuronal a los factores de crecimiento, neurotransmisores, actividad sináptica y neurotrofinas (Jonson y Jope, 1992). En la corteza cerebral de la rata, la concentración de MAP-2 aumenta del nacimiento al día 21 aunque el mRNA fue constante en este periodo (Charrière-Bertrand et al 1991). Neuronas estriatales cultivadas muestran, bajo diferentes condiciones, diferencia en las ramificaciones dendríticas. El aumento observado por Charrière-Bertrand desde el nacimiento hasta el día 21 concuerda con los resultados de éste trabajo (Fig 13). Sin embargo no se estudiaron cerebros de ratones anteriores a los 10 días de edad. Se observó un aumento que, no aparece como significativo, del día 10 al día 21, muy probablemente se encontraría diferencia si se tuvieran datos desde el primer día postnatal. Después del día 21, como reportó Charrière-Bertrand, tampoco se encontraron cambios (Fig 13)

Los resultados no muestran diferencia en el patrón de inmunotinción de la MAP-2 asociado a la expresión de las neurotrofinas. No está informado que sean los factores neurotróficos los que establecen los patrones de expresión de MAP-2. Kosik y colaboradores sugirieron en 1998 que la degradación aberrante de MAP-2 en enfermedades degenerativas como el Alzheimer, provoca la formación de fragmentos proteolíticos que se autoasocian, impidiendo que se degrade y acumulándose en agregados insolubles que contribuyen en la formación de marañas neurofibrilares.

8.3 No existe correlación entre los patrones de expresión de las neurotrofinas y sinaptofisina

Las vesículas sinápticas son organelos clave en la regulación de la liberación de neurotransmisores y otras moléculas de las sinapsis químicas. La membrana de estas vesículas sinápticas se caracterizan por tener proteínas específicas involucradas en la entrada de transmisores, exocitosis y reciclamiento de la membrana (Südnof y Jahn, 1991). Éstas incluyen dos miembros de una super-familia de proteínas canales, sinaptofisina (Wiedenmann y Franke, 1985) y sinaptoporina (Jahn y De Camilli, 1991). Ovtcharoff y colaboradores en 1993 estudiaron la ontogenia de ambas proteínas en el estriado y encontraron que sinaptoporina tenía baja expresión en etapas embrionarias y que no mostraba cambios en el tiempo. Sin embargo sinaptofisina, mostraba muchos cambios en edades prenatales además de estar ampliamente distribuída alrededor del núcleo en forma de capucha; bien expresada en ciertas células y más débilmente en otras. En la primera semana postnatal, el neurópilo en células estriatales mostró una marca muy intensa de sinaptofisina y sinaptoporina estaba solo alrededor del núcleo. En el estriado adulto, permanece la fuerte inmunoreactividad en el neurópilo, lo que sugiere que ya no se presentan cambios en las edades postnatales tal y como se encontró en este trabajo. Tampoco se observó relación con el patrón de expresión de las neurotrofinas. Está bien documentado que los factores neurotróficos intervienen en los eventos sinápticos (Cepeda et al., 2004; Alonso et al., 2005; Pollak et al 2005), sería necesario detectar la expresión en animales que no tengan el soporte adecuado de factores neurotróficos para observar el efecto en los eventos sinápticos.

8.4 No existe relación entre el patrón de expresión de las neurotrofinas y el de GAD y ChAT a lo largo del tiempo.

Tampoco se encontró relación entre los niveles de expresión de ninguna de las neurotrofinas probadas con la presencia de estas dos enzimas, lo que sugiere que aunque las neurotrofinas influyen en el fenotipo de las distintas poblaciones celulares (Pérez-Navarro et al., 1999) y en muchas de sus funciones, no aumentan o disminuyen su número en las edades postnatales probadas. En etapas del desarrollo se sabe que las neurotrofinas influyen en la diferenciación neuronal (Birling y Price, 1995), además de regular la supervivencia (Diener y Bregman, 1994).

8.5 Implicaciones en patologías neurodegenerativas.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son pertinentes ya que se ha propuesto que en algunas patologías neurodegenerativas el aporte trófico puede estar alterado. En particular en la enfermedad de Huntington (HD), se ha sugerido que la disminución relativa de BDNF en el estriado conduce a la muerte selectiva de las células espinosas medianas (Zuccato et al., 2001). Esta disminución, sin embargo, no parece afectar la sobrevivencia de las interneuronas de manera significativa. Es posible que factores neurotróficos diferentes al BDNF, protejan a las interneuronas estriatales en cerebros de modelos animales y de pacientes con HD. Conocer el patrón de distribución de las neurotrofinas en la región dorsal lateral del estriado a lo largo del desarrollo, resulta útil para su posterior comparación con modelos animales que presenten la enfermedad. Para lograr una mejor comparación, es necesario detectar la expresión de los receptores a cada neurotrofina y de las proteínas unidoras de calcio (qué permiten la identificación de los distintos tipos neuronales) en animales sanos y enfermos, para lograr dilucidar el aporte trófico en el estriado tanto en el espacio como en el tiempo.

9. CONCLUSIONES

1. El BDNF y la neurotrofina 4/5 muestran un patrón de tinción de relación inversa entre ellas mientras que la neurotrofina-3 muestra un patrón diferente.
2. BDNF, NT-3 Y NT-4/5 tienen un papel importante en los procesos celulares en la región dorsal-lateral del estriado pero no existe relación entre los patrones de expresión de las neurotrofinas y los marcadores de citoesqueleto a lo largo del tiempo.
3. La influencia de NT-3 en la función del estriado podría estar relacionada a diferentes poblaciones neuronales de aquellas que se ven afectadas por BDNF. Su expresión temporal también sugiere que, NT-3 no es necesaria como factor de diferenciación o supervivencia para las células del estriado.
4. No existe correlación entre los patrones de expresión de las neurotrofinas y sinaptofisina
5. No existe relación entre el patrón de expresión de las neurotrofinas y el de GAD y ChAT a lo largo del tiempo.

10. BIBLIOGRAFÍA

Albin, R., Young, A. y Penney, J. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 18: 11-14

Abiru, Y., Nishio, C y Hatanaka, H. (1996) The survival of striatal cholinergic neurons cultured from postnatal 2-week-old rats is promoted by neurotrophins. *Dev. Brain Res.* 91: 260-267.

Alberch, J., Pérez-Navarro, E. y Canals, J. (2002) Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res. Bull.* 57: 817-822.

Alberch, J., Pérez-Navarro, E. y Canals, J.M. (2004) Neurotrophic factors in Huntington's disease *Prog. Brain Res.* 146: 195-229.

Alexi, T., Borlongan, C., Faull, R., Williams, C., Clark, R., Gluckman, P. y Hughes, P.E. (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 60: 409-470.

Alonso, M., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M., Izquierdo, I. y Medina, J. (2005) Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem.* 12: 504-510.

Altar, C., Cai, N., Blivien, T., Juhasz, M., Conner, J., Acheson, A., Lindsay, R. y Wiegand, S. (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 389: 856-860.

Altar C. and DiStefano P. (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci.*, 21:433-437.

Apfel, S. (1996) Neurotrophic factors in the treatment of neurotoxicity: an overview. *Neurotoxicology*, 17: 839-844.

Apfel, S. (1999) Neurotrophic factors and diabetic peripheral neuropathy. *Eur. Neurol.* 41 (Suppl. 1): 27-34.

Ardelt, A., Flaris, N. y Roth, K. (1994) Neurotrophin-4 selectively promotes survival of striatal neurons in organotypic culture. *Brain Res.* 647: 340-344.

Arenas, E., Akerud, P., Wong, V., Boylan, C., Persson, H., Lindsay, R. y Altar, C. (1996) Effects of BDNF and NT-4/5 on striatonigral neuropeptides or nigral GABA neurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1707-1717.

Barbacid, M. (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25: 1386-1403.

Berkemeier, L., Winslow, J., Kaplan, D., Nikolics, K., Goeddel, D. y Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trkA and trkB. *Neuron* 7: 857-866.

Bernhardt, R. y Mathus, A. (1984) Light and electronic microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: A difference between the dendritic and axonal cytosdeletons. *J. Comp. Neurol.* 226:203-221.

Birling, M. y Price, J. (1995) Influence of growth factors on neuronal differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 878-884.

Canals, J., Marco, S., Checa, N., Michels, A., Pérez-Navarro, E., Arenas, E. y Alberch, J. (1998) Differential regulation of the expresión of NGF, BDNF and NT-3 after excitotoxicity in a rat model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 5: 357-364.

Cepeda, C., Starling, A., Wu, N., Nguyen, O., Uzgli, B., Soda, T., André, V. Ariano, M. y Levine, M. (2004) Increased GABAergic Function in Mouse Model of Huntington's Disease: Reversal by BDNF. *J. Neurosci. Res.* 78: 855-867.

Chamak, B., Fellous, A., Glowinski, J. y Prochiantz, A. (1987) MAP2 expression and neuritic outgrowth and branching are coregulated through region-specific neuro-astroglial interactions. *J. Neurosci.* 10: 3163-3170.

Chao, M. (1994) The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 25: 1373-1385.

Charrière-Bertrand, C., Garner, C., Tardy, M. y Nunez, J. (1991) Expression of various microtubule-associated protein 2 forms in the developing mouse brain and in cultured neurons and astrocytes. *J. Neurochem.* 56: 385-391.

Checa, N., Canals, J. y Alberch, J. (2000) Developmental regulation of BDNF and NT-3 expression by quinolinic acid in the striatum and its main connections. *Exp. Neurol.* 165: 118-124.

Checa, N., Canals, J., Gratacos, E. y Alberch, J. (2001) TrkB and TRC are differentially regulated by excitotoxicity during development of the basal ganglia. *Exp. Neurol.* 172: 282-292.

Chesselet, M. y Robbins, E. (1989) Characterization of striatal neurons expressing high levels of glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Brain Res.* 492: 237-244.

Cicchetti, F., Beach, T.G. y Parent, A. (1998) Chemical phenotype of calretinin interneurons in the human striatum. *Synapse* 30: 284-297.

Cicchetti, F., Prensa, L., Wu, Y. y Parent, A. (2000) Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Res. Rev.* 34: 80-101.

Cooper, J., Skepper, J., Berzaghi, M., Lindholm, D. y Sofroniew, M. (1996) Delayed death of septal cholinergic neurons after excitotoxic ablation of hippocampal neurons during early postnatal development in the rat. *Exp Neurol.* 139: 143-155.

Costantini, L., Feinstein, S., Radeke, J. y Snyder-Keller, A. (1999) Compartmental expression of trkB receptor protein in the developing striatum. *Neuroscience* 89: 505-513.

Cowan, R., Wilson, C., Emson, P. y Heizmann, C. (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 302: 197-205

DeCamilli, P., Miller, P., Navone, F., Theurkauf, W. y Vallee, R. (1984) Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 4:819-846.

Desjardins, C. y Parent, A. (1992) Distribution of somatostatin immunoreactivity in the forebrain of the squirrel monkey. Basal Ganglia and amygdala. *Neuroscience* 47: 115-133.

Diener, P. y Bregman, B. (1994) Neurotrophic factors prevent the death of CNS neurons after spinal cord lesions in newborn rats. *Neuroreport* 15: 1913-7

DiFiglia, M. y Aronin, N. (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114: 245-256.

Fagan, .M., Garber, M., Barbacid, M., Silos-Santiago, I. y Holtzman, D.M. (1997) A role for TrkA during maturation of striatal and basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J. Neurosci.* 17: 7644-7654.

Ferreira, A., Busciglio, J. y Caceres, A. (1989) Microtubule formation and neurite growth in the cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 49: 215-228.

Ferreira, A., Busciglio, J., Landa, C. Y Caceres, A. (1990) Ganglioside-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of high-molecular weight MAP-2. *J. Neurosci.* 1:293-302.

Fox, C., Andrade, A., Hilman, D. y Schwyn, R. (1971) The spiny neurons in the primate striatum: a Golgi and electron microscopic study. *Brain Res.* 13: 181-201

Graybiel, A. (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13: 244-254.

Guevara-Guzmán, R., Kendrick, K. y Mesón, P.C. (1993) Effect of substance P on acetylcholine and dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study, *Brain Res.* 622: 147-154.

Hagg, T., Hagg, F., Vahlxing, H., Manthorpe, M. y Varon, S. (1989) Nerve growth factor effects on cholinergic neurons of neostriatum and nucleus accumbens in the adult rat. *Neuroscience*, 30:95-103.

Hefti, F. (1994) Development of effective therapy for Alzheimer's disease based on neurotrophic factors. *Neurobiol. Aging*, 15 (Suppl 2): S193-S194.

Hempstead, B., Martín-Zanda, D., Kaplan, D., Parada, L. y Chao, M. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350: 678-683.

Hoefler, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J. y Barde, Y.A. (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9:2459-2464.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K. y Barde, Y.A. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344: 339-341.

Holt, D., Graybiel, A. y Saper, C. (1997) Neurochemical architecture of the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 384: 1-25.

Holtzman, D., Li, Y., Prada, L., Kinsman, S., Chen, C., Valletta, J., Zhou, J., Long, J. y Mobley, W. (1992) p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: Evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* 9: 465-478.

Huang, E. y Reichardt, L. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 677-736.

Hyman, C., Juhasz, M., Jackson, C., Wright, P., Ip, N. y Lindsay, R. (1994) Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J. Neurosci.* 14:335-347.

Ibañez, C. (1996) Neurotrophin-4: the odd one out in the neurotrophin family. *Neurochem. Res.* 21:787-793.

Ip, N., Ibañez, C., Nye, S., McClain, J., Jones, P., Gies, D., Belluscio, L., Le Beau, M., Espinosa, R. y Squinto, S. (1992) Mammalian neurotrophin-4 structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3060-3064.

Ivkovic, S., Polonskaia, O., Fariñas, I. y Ehrlich, E. (1997) Brain-derived neurotrophic factor regulates maturation of the DARPP-32 phenotype in striatal medium spiny neurons: studies in vivo and in vitro. *Neuroscience* 79: 509-516.

Ivkovic, S. y Ehrlich, M. (1999) Expression of the striatal DARPP-32/ARP-21 phenotype in GABAergic neurons requires neurotrophins in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 19: 5409-5419.

Jahn, R. y De Camilli, P. (1991) Membrane proteins of synaptic vesicles: markers for neurons and neuroendocrine cells, tools for the study of neurosecretion. In M. Gratzl and K. Langley (Eds) *Markers for Neural and Endocrine Cells*, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim. pp 22-25.

Jones, K., Fariñas, I., Backus, C. y Reichardt, L. (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* 79: 989-999.

Johnson, G. y Jope, R. (1992) The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J. Neurosci. Res.* 33: 505-512.

Jung, A.B. y Bennett, J.P.J. (1996) Development of striatal dopaminergic function. III: Pre- and postnatal development of striatal and cortical mRNAs for the neurotrophin receptors *trkB* and *trkC* and their regulation by synaptic dopamine. *Dev. Brain Res.* 94: 133-143.

Kaplan, D., Hempstead, B., Martin-Zanca, D., Chao, M. y Parada, L. (1991) The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252: 554-558.

Katoh-Semba, R., Semba, R., Takeuchi, I.K. y Kato, K. (1998) Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci. Res.* 31: 227-234.

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J. y Emson, P.C. (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18: 527-535.

Kawaguchi, Y. (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles, *Neurosci. Res.* 27: 1-8.

Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. y McGeer, E.G. (1980) Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* 208: 1057-1059.

Kindler, S., Schulz, B. Goedert, M. y Garner, C. (1990) Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265:19679-19684.

Klein R., Martin-Zanca, D., Barbacid, M. y Parada, L.F. (1990) Expresión of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* 109: 845-850.

Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E. y Barbacid, M. (1991a) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65: 189-197.

Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K., Reichardt, L. y Barbacid, M. (1991b) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66: 395-403.

Koh, S. y Higgins, G.A. (1991) Differential regulation of the low-affinity nerve growth factor receptor during postnatal development of the rat brain. *J. Comp Neurol.* 313: 494-508.

Kosik, K. y Finch, E. (1987) MAP-2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: An immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J. Neurosci.* 7: 3142-3153.

Kosik, K., Orecchio, L., Bakalis, S., Duffy, L. y Neve, R. (1998) Partial sequence of MAP-2 in the region of a shared epitope with Alzheimer neurofibrillary tangles. *J. Neurochem.* 51: 587-598.

Kubota, Y. y Kawaguchi, Y. (1993). Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 332: 499-513.

Lamballe, F., Klein, R. y Barbacid, M. (1991) *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967-979

Lamballe, F., Smeyne, R.J. y Barbacid, M. (1994) Developmental expression of trkC, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 14: 14-28.

Lee G., Cowan, N. y Kirschner, M. (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239: 285-288.

Martín-Zanca, D., Hughes, S., y Barbacid, M. (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequence. *Nature* 319: 743-748.

McAllister, A., Lo, D. y Katz, L. (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15: 791-803.

McAllister, A. y Katz, L. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 295-318.

Merlio, J.P., Ernfors, P., Jaber, M. y Persson, H. (1992) Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNA for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51: 513-532.

Mitchell, I., Cooper, A. y Griffiths, M. (1999) The selective vulnerability of striatopallidal neurons. *Prog. Neurobiol.* 59: 691-719.

Mobley, W.C., Rutkowski, J.L., Tennekoon, G.I., Buchanan, K. y Johnston, M.V. (1985) Choline acetyl-transferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science* 229: 284-287.

Mobley, W.C., Woo, J.E., Edwards, R.H., Riopelle, R.J., Longo, F.M., Weskamp, G., Otten, U., Valletta, J.S. y Johnston, M.V. (1989) Development regulation of nerve growth factor in its receptor in the rat caudate-putamen. *Neuron* 3: 655-664.

Nakao, N., Kokaia, Z., Odin, P. y Lindvall, O. (1995) Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons. *Exp. Neurol.* 131: 1-10.

Nakao, N., Odin, P., Lindvall, O. y Brudin, P. (1996) Differential trophic effects of basic fibroblast growth factor, insuline-like growth factor-1, and neurotrophin-3 on striatal neurons in culture. *Exp. Neurol.* 138: 144-157.

Oertel, W. y Mugnaini, E. (1984) Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett.* 47: 233-238.

Ovtscharoff, W., Bergmann, M., Marquèze-Pouey, B., Knaus, P., Betz, H., Grabs, D., Reisert, I. y Gratzl, M. (1993) Ontogeny of synaptophysin and synaptoporin in the central nervous system: differential expression in striatal neurons and their afferents during development. *Dev. Brain Res.*, 72: 219-225.

Parent, A. y Hazrati, L. Functional anatomy of the basal ganglia. (1995). The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* 20: 91-127.

Parent, A., Fortin, M., Coté, P. y Cicchetti, F. (1996) Calcium-binding proteins in primate basal ganglia. *Neurosc. Res.* 25: 309-334.

Pérez-Navarro, E. y Alberch, J. (1995) Protective role of Nerve growth factor against excitatory amino acids injury during neostriatal cholinergic neurons postnatal development. *Exp. Neurol.* 135: 146-152.

Pérez-Navarro, E., Alberch, J., Neveu, I. y Arenas, E. (1999) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo. *Neuroscience* 91: 1257-1264.

Pollak, D., Scharl, T., Leisch, F., Herkener, K., Villar, S., Hoeger, H. y Lubec G. (2005) Strain-dependent regulation of plasticity-related proteins in the mouse hippocampus. *Behav. Brain Res.* 165: 240-246.

Ringstedt, T., Lagercrantz, H. y Persson, H. (1993) Expressions of members of the trk family in the developing postnatal rat brain. *Dev. Brain Res.* 72: 119-131.

Salgado, H. (1996) Modulación dopaminérgica de las corrientes de calcio en las neuronas neostriatales de proyección. Tesis, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Salloway, S. y Cummings, J. (1996) Subcortical structures and neuropsychiatric illness. *Neuroscientist* 2: 66-75.

Shafit-Zagardo, B. y Kalcheva, N. (1998) Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Mol. Neurobiol.* 2: 149-162.

Smith, Y. y Parent, A. (1986) Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in striatum of cats and monkeys: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res.* 372: 241-252.

Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D., Reid, S., Blair, J., Burton, L., Stanton, B., Kaplan, D. y Hunter, T. (1991) The neurotrophic factor brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trk B tyrosine kinase receptor. *Cell* 65: 895-903.

Squinto, S., Stitt, T., Aldrich, T., Davis, S., Bianco, S., Radziejewski, C., Glass, D., Masiakowski, P., Furth, M., y Valenzuela, D. (1991) trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65: 885-893.

Südnof, T. y Jahn, R. (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6: 665-677.

Thomas, B. Shea y Lisa A. Flanagan (2001) Kinesin, dynein and neurofilament transport. *Trends Neurosci.* 24: 644-648.

Timmusk, T., Bellaurdo, N., Metsis, M. y Persson, H. (1993) Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur. J. Neurosci.* 5: 605-613.

Vahlsing, H.L., Hagg, T., Spencer, R., Conner, J.M., Manthorpe, M. y Varon, S. (1991) Dose-dependent responses to nerve growth factor by adult rat cholinergic medial septum and neostriatum neurons. *Brain Res.* 552: 320-329.

Van Vulpen, E.H y Van D. Kooy, D. (1999) NGF facilitates the developmental maturation of the previously committed cholinergic interneurons in the striatal matrix. *J. Comp. Neurol.* 411: 87-96.

Ventimiglia, R., Mather, P.E., Jones, B.E. y Lindsay, R.M. (1995) The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons. *Eur. J. Neurosc.* 7: 213-222.

Wiedenman, B. y Franke, W. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic terminals. *Cell* 41: 1017-1028.

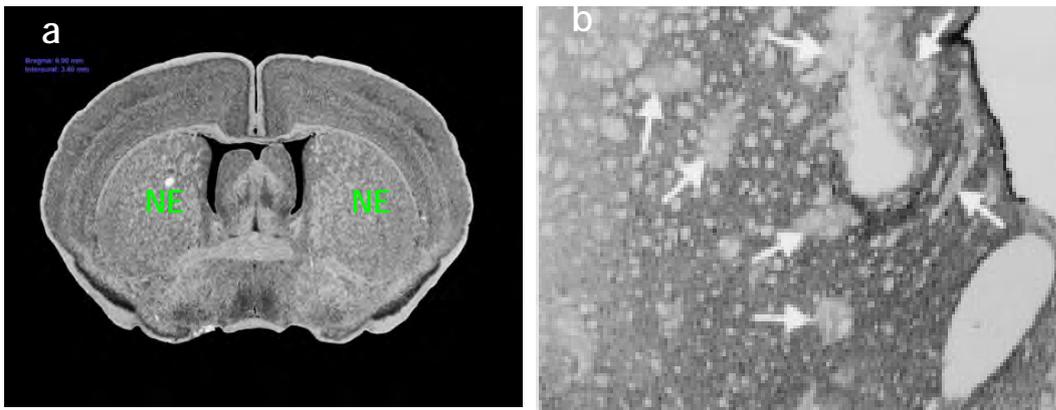
Yan, Q., Radeka, M.J., Matheson, C.R., Talvenheimo, J., Welcher, A. y Feinstein, S.C. (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 378: 135-157.

Yurek, D. y Fletcher-Turner, A. (2001) Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. *Brain Res.* 891: 228-235.

Zermeño, V., Espíndola, S., Mendoza, E. and Hernández-Echeagaray, E. (2009) Differential expresión of neurotrophins in postnatal C57BL/6 mice striatum. *Int J. Biol. Sci.* 5(2):118-127.

Zuccato, C., Ciammola A., Rigamonti, D., Leavitt, B., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M., Friedlander, R., Silani, V., Hayden, M., Timmusk, T., Sipione, S. y Cattaneo, E. (2001) Loss of Huntingtin-mediated BDNF transcription in Huntington's disease. *Science* 293(20): 493-498.

11. ANEXO 1



Esquema 1. a) Figura que muestra el núcleo estriado (NE) en un corte coronario de cerebro de ratón, en b, el fondo oscuro muestra la matriz y las islas con forma irregular y color más claro que señalan las flechas blancas forman los estriosomas. (Norman et al., 1998).

Tabla 1. Promedio del área marcada por inmunotinción de neurofilamentos.

Edad en días	% promedio de la fracción de área marcada
10	19.14707
21	31.05156
42	29.63156
80	23.9842

Tabla 2. Promedio del área marcada por inmunotinción de MAP-2.

Edad en días	% promedio de la fracción de área marcada
10	92.84941
21	89.96126
42	87.15828
80	95.33139

Tabla 3. Promedio del área marcada por inmunotinción de Sinaptofisina.

Edad en días	% promedio de la fracción de área marcada
10	30130.5
21	31378.5
42	33433.5
80	31668.7778