



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Expresión génica de neurotrofinas y sus receptores
en el estriado del modelo murino de la enfermedad
de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A

PRESENTA:

SAYRA ROSIO ESPINDOLA BARRIENTOS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY

*Laboratorio de Neurofisiología del desarrollo y la neurodegeneración,
Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED)*

Los Reyes Iztacala, Edo de México. Febrero, 2010.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología del Desarrollo y Neurodegeneración (L-6) UBIMED, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, y contó con el apoyo de una beca de tesis de Licenciatura del proyecto 81062 de CONACyT.

Sinodales:

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

Dra. Emma Berta Gutierrez Cirlos Madrid

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Agradecimientos

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida y porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy. Algunas aún están conmigo y otras permanecen en mis recuerdos y en mi corazón. A todos, sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas palabras quiero darles las gracias por estar en mi vida, por cada momento compartido, por todo lo que me han brindado, por todas sus bendiciones, por enseñarme a creer en mi y por motivarme a hacer las cosas de la mejor manera.

Agradezco a la UNAM, FES Iztacala y a la UBIMED por la formación y las oportunidades brindadas; a mis sinodales, por el tiempo que me han dedicado al leer este trabajo, enriqueciéndolo y mejorándolo con sus comentarios y sugerencias. Agradezco también, al Dr. Alonso Vilches, al M. en C. Ernesto Mendoza y a mis compañeros de laboratorio, quienes en cada momento me asesoraron, ayudaron y atendieron mis dudas.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca brindado durante la realización de este trabajo.

De manera muy especial agradezco a la Dra. Eli, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por ser una excelente guía, por su apoyo, por su tiempo, por todas las enseñanzas y sobre todo por su amistad y el cariño que me ha brindado.

A Baruch Loredó, por su compañía, por cada minuto que he pasado a su lado, por cada palabra y cada mirada, por su cariño, porque siempre está presente en mi mente y en mi corazón y porque junto a él todo puede llegar a tener un significado diferente.

Para mi más grande orgullo, mis padres, sólo tengo tres palabras, les AGRADEZCO por su apoyo siempre incondicional y por la familia que me han dado, los ADMIRO por su ejemplo y sus consejos y los AMO con toda mi alma.

Sayra.

Índice general

Abreviaturas.....	X
Resumen.....	1
Introducción.....	3
<u><i>El Sistema Nervioso y los ganglios basales</i></u>	4
<u><i>La enfermedad de Huntington</i></u>	7
<u><i>El ácido 3-nitropropiónico</i></u>	9
<u><i>Soporte trófico: las neurotrofinas</i></u>	11
<u><i>Factor de crecimiento nervioso (NGF)</i></u>	14
<u><i>Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)</i></u>	14
<u><i>Neurotrofina 3 (NT-3)</i></u>	15
<u><i>Neurotrofina 4/5 (NT-4/5)</i></u>	15
<u><i>Soporte trófico: los receptores</i></u>	18
<u><i>El receptor p75</i></u>	18
<u><i>Receptores Trk</i></u>	19
• Receptor Trk A.....	20
• Receptor Trk B.....	21
• Receptor Trk C.....	22
<u><i>Estudio de la expresión génica y la técnica de PCR</i></u>	23
Justificación.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	28
<u><i>Objetivo general</i></u>	28
<u><i>Objetivos específicos</i></u>	28
Método.....	29
<u><i>Tratamiento con 3-NP</i></u>	29
<u><i>Obtención del tejido y extracción de RNA</i></u>	29
<u><i>RT-PCR semicuantitativo y cuantificación de mRNA</i></u>	29
<u><i>RT-PCR en tiempo real</i></u>	30
<u><i>Análisis de resultados</i></u>	32
Resultados.....	33
<u><i>Los mRNAs de las neurotrofinas son expresados a lo largo del desarrollo</i></u>	33

<u>Una buena elección de genes de referencia: β-actina y 18S ribosomal</u>	34
<u>PCR semicuantitativo: las neurotrofinas tienden a aumentar ante un daño neurodegenerativo</u>	38
<u>PCR semicuantitativo: los mRNA de los receptores para las neurotrofinas no presentan cambios de expresión ante un daño neurodegenerativo</u>	42
<u>PCR en tiempo real: Cambios en la expresión de mRNA de neurotrofinas y de sus receptores</u>	45
<u>NGF y su receptor Trk A</u>	46
<u>BDNF, NT-4/5 y su receptor Trk B</u>	48
<u>NT-3 y su receptor Trk C</u>	52
<u>El receptor p75</u>	54
Discusión	56
<u>Las neurotrofinas presentes a lo largo del desarrollo</u>	56
<u>La expresión en tejido estriatal de mRNA de neurotrofinas y sus receptores después del daño por 3-NP</u>	59
<u>La respuesta neuronal inmediata</u>	60
<u>Efectos de la neurodegeneración a largo plazo sobre los niveles de mRNA de neurotrofinas y sus receptores</u>	61
• La neurotrofina NGF y su receptor Trk A.....	63
• Las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 y su receptor Trk B.....	65
• La neurotrofina NT-3 y su receptor Trk C.....	69
• El receptor p75: sobreexpresión de mRNA en el estriado.....	70
<u>El método utilizado para analizar el mRNA es importante</u>	74
<u>PCR semicuantitativo vs PCR en tiempo real</u>	74
<u>Una buena elección de genes de referencia</u>	76
Conclusiones	80
Apéndices	82
Referencias bibliográficas	97

Índice de figuras.

Figura 1. Modelo esquemático de la anatomía de los ganglios basales.....	6
Figura 2. Modelo esquemático del proceso de patogénesis celular responsable de la enfermedad de Huntington.....	9
Figura 3. Modelo de activación de los receptores Trk y p75.....	20
Figura 4. Modelo de vías de señalización activadas por neurotrofinas.....	23
Figura 5. mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal de ratones a los 10, 21 y 42 días postnatales.....	33
Figura 6. Expresión de mRNA de neurotrofinas durante el desarrollo.....	34
Figura 7. Expresión de genes de referencia determinados por densitometría.....	35
Figura 8. Expresión relativa de genes en ratones control respecto a los genes de referencia β -actina y 18s Ribosomal (1 hora).....	36
Figura 9. Expresión relativa de genes en ratones control respecto a los genes de referencia β -actina y 18s Ribosomal (48 horas).....	36
Figura 10. Expresión relativa de genes en ratones tratados con 3-NP respecto a los genes de referencia β -actina y 18s Ribosomal (1 hora).....	37
Figura 11. Expresión relativa de genes en ratones tratados con 3-NP respecto a los genes de referencia β -actina y 18s Ribosomal (48 horas).....	37
Figura 12. mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo, 1 hora después de la última dosis de 3-NP.....	39
Figura 13. mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo 48 horas después de la última dosis de 3-NP.....	39
Figura 14. Porcentajes de expresión de mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo.	41
Figura 15. mRNA de receptores en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo 1 hora después de la última dosis de 3-NP.....	42
Figura 16. mRNA de receptores en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo 48 horas después de la última dosis e 3-NP.....	43
Figura 17. Porcentajes de expresión de mRNA de receptores de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo.....	43

Figura 18. Box plot de la expresión relativa de mRNA de NGF obtenida por qPCR.....	46
Figura 19. Box plot de la expresión relativa de mRNA de TrkA obtenida por qPCR.....	47
Figura 20. Box plot de la expresión relativa de mRNA de BDNF obtenida por qPCR.....	48
Figura 21. Box plot de la expresión relativa de mRNA de NT-4/5 obtenida por qPCR.....	49
Figura 22. Box plot de la expresión relativa de mRNA de TrkB+ obtenida por qPCR.....	50
Figura 23. Box plot de la expresión relativa de mRNA de TrkB- obtenida por qPCR.....	51
Figura 24. Box plot de la expresión relativa de mRNA de NT-3 obtenida por qPCR.....	52
Figura 25. Box plot de la expresión relativa de mRNA de TrkC obtenida por qPCR.....	53
Figura 26. Box plot de la expresión relativa de mRNA de p75 obtenida por qPCR.....	54

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Neurotrofinas.....	17
Cuadro 2. “ <i>Primers</i> ” utilizados en reacción PCR para cada neurotrofina.....	31
Cuadro 3. “ <i>Primers</i> ” utilizados en reacción PCR para cada receptor.....	31
Cuadro 4. Resultados estadísticos de la comparación entre genes de referencia.....	38
Cuadro 5. Cambios en la expresión de mRNA de las neurotrofinas y sus receptores después del tratamiento con 3-NP, en comparación con el grupo control, obtenidos por qPCR.....	55

Abreviaturas

β -act:	β -actina
(GAP)-43:	Proteína asociada al crecimiento-43
18s:	18s Ribosomal
3-NP:	Ácido 3-nitropropiónico
Akt:	Proteína cinasa de serina/treonina
Apaf-1:	Proteasa activadora de apoptosis factor-1
ATP:	Adenosina trifosfato
Bcl-2:	Linfoma 2 de la célula B
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Ca ²⁺ :	Ión calcio
CAG:	citocina-adenina-guanina
cDNA:	DNA complementario
CT:	Ciclo umbral
DA:	Dopamina
DEPC:	Diethyl pirocarbonato
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's:	Desoxinucleótidos trifosfato
DRG:	Neuronas del ganglio de la raíz dorsal
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK:	Proteína del tipo MAPK
Fas:	Receptor apoptótico de la superfamilia TNF
FISH:	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FN:	Factores neurotróficos
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GRIK2:	Receptor ionotrópico de glutamato, kainato 2
H ₂ O:	Agua
HD:	Huntington Disease (Enfermedad de Huntington)
HPRT:	Hipoxantina fosforribosil-transferasa
htt:	Huntingtina
htm:	Huntingtina mutada
IgG:	Inmunoglobulina G
ip:	Intraperitoneal
JNK:	Cinasa c-Jun N-terminal
KA:	Ácido kaínico
kDa:	kilodaltones
LB:	Buffer de carga (marcador)
MAPK:	Proteína cinasa activada por mitógenos
MgCl ₂ :	Cloruro de magnesio
mRNA:	RNA mensajero
NADPHd:	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato-diaforasa
NGF:	Factor de crecimiento nervioso
NMDA:	N-metil D-aspartato
NT-3:	Neurotrofina 3
NT-4/5:	Neurotrofina 4/5
NT-6:	Neurotrofina 6
NT-7:	Neurotrofina 7

p75:	Receptor para neurotrofinas de baja afinidad
PB:	Buffer fosfatos
PBS:	Buffer de fosfatos salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PI-3K:	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PLC γ :	Fosfolipasa C γ
qPCR:	PCR en tiempo real
QUIN:	Ácido quinolínico
RNA:	Acido ribonucleico
RT:	Transcripción reversa
Smac/DIABLO:	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
SN:	Sistema Nervioso
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Sistema Nervioso Periférico
TAE:	Buffer Tris-Acetato-EDTA
Tm:	Temperatura de alineamiento
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TNFR1:	Receptor transmembranal tipo I del Factor de Necrosis Tumoral
Trk:	Receptor con actividad tirosina cinasa
TrkA:	Trk de alta afinidad para la neurotrofina NGF
TrkB:	Trk de alta afinidad para las neurotrofinas BDNF y NT-4/5
TrkB ₊ :	Trk de tipo B isoforma completa
TrkB ₋₁ :	Trk de tipo B isoforma truncada 1
TrkB ₋₂ :	Trk de tipo B isoforma truncada 2
TrkC:	Trk de alta afinidad para la neurotrofina NT-3
Ub:	Ubiquitinado
* <i>primer</i> :	desoxioligonucleótido, también llamado iniciador o cebador

Resumen.

Las neurotrofinas son un grupo de factores tróficos que regulan el crecimiento, la supervivencia, la muerte y la diferenciación de las neuronas y de muchos otros tejidos del neuroectodermo durante el desarrollo embrionario y postnatal, así como el mantenimiento neuronal a lo largo de la vida adulta; por lo que su deficiencia se relaciona con la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas. La respuesta fisiológica de las neurotrofinas está mediada por receptores específicos para cada una de ellas, pues para ejercer sus funciones biológicas deben unirse a receptores que se encuentran en las membranas de sus células blanco.

El interés por estudiar la posible relación que hay entre las neurotrofinas y sus receptores con los procesos neurodegenerativos, se debe a razones clínicas potencialmente terapéuticas, que permitan abordar los cambios en los mecanismos moleculares que presentan las neuronas y contrarrestar el daño causado por los procesos degenerativos, como los observados en la degeneración neuronal estriatal en la Enfermedad de Huntington; en donde se conoce que los factores neurotróficos promueven neuroprotección a poblaciones neuronales específicas, inhibiendo la inducción de mecanismos apoptóticos.

El objetivo de este estudio fue determinar los cambios en la expresión génica del mRNA de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 y de los receptores p75, Trk A, Trk B y Trk C en el núcleo estriado de ratones, a los cuales se les administró el ácido 3-nitropropiónico para inducir un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington, 1 y 48 horas después de la última dosis de tratamiento. La expresión génica se evaluó por PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real; además se obtuvo la expresión relativa de mRNA de cada gen evaluado normalizando con dos genes endógenos.

Se encontró que las neurotrofinas se expresan en cantidades limitadas en el estriado, a lo largo del desarrollo postnatal y en el adulto, en donde la expresión del BDNF se ve disminuida. La reducción en la producción del BDNF en el núcleo estriado no esta relacionada con su acción en las neuronas de esta región, de hecho, se sabe que en el adulto, esta neurotrofina participa de manera importante en el mantenimiento las células espinosas medianas y que la mayor parte del BDNF presente en el estriado proviene de las células piramidales de la corteza cerebral donde es sintetizado.

Usando RT-PCR semicuantitativo, se observó un aumento significativo en la expresión de mRNA de NGF 48 horas después del tratamiento con 3-NP, respecto a la expresión observada en condiciones control. Usando PCR en tiempo real observamos disminución en la expresión de mRNA del BDNF y aumento de la neurotrofina NT-3, así como aumento en la expresión de los receptores Trk A, Trk C y p75.

Los resultados obtenidos aportan algunas bases moleculares de cómo las neurotrofinas están involucradas en procesos que ocurren en el núcleo estriado de ratón, después de un daño neurodegenerativo causado por la administración de 3-NP. El incremento en la expresión génica puede ser una respuesta celular para compensar el daño causado por la toxina 3-NP, como parte de un mecanismo neuroprotector basado en un soporte trófico. La disminución puede deberse a la falta de aporte de otras regiones del cerebro, debido a la pérdida de conexiones nerviosas. Nuestros resultados constituyen un aporte al estudio de éstas moléculas como factores de tratamiento neuroprotector.

Por otro lado, observamos que el uso de PCR en tiempo real es más sensible a los cambios de expresión del mRNA y que la expresión del gen endógeno 18S Ribosomal resulta estable bajo nuestras condiciones. Estos resultados resultan útiles para estudios posteriores relacionados con la expresión de mRNA bajo nuestras condiciones experimentales.

Introducción.

Los factores neurotróficos han sido estudiados, principalmente, en relación con sus funciones en la regulación de los mecanismos moleculares que permiten la supervivencia y diferenciación de poblaciones neuronales específicas, durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, en los últimos años han aumentado las evidencias experimentales que demuestran las aportaciones fisiológicas de las neurotrofinas a la vida adulta de la neurona, entre las cuales destaca su papel en los mecanismos de protección neuronal ante un daño degenerativo, que incluye el restablecimiento de los axones y de las dendritas y el mantenimiento de la homeostasis celular (Asal, 1997).

Entre las enfermedades que causan un daño neurodegenerativo se encuentra la enfermedad de Huntington (HD), un desorden hereditario dominante que se presenta debido a la mutación del gen IT15 (formado por 67 exones dentro de una secuencia génica de 170 kpb) que codifica para una proteína citoplasmática larga llamada Huntingtina (htt), de 3136 aminoácidos y con un peso molecular de aproximadamente 360 kDa (Walling, 1998). Esta proteína, al presentar la mutación, genera deficiencias motoras, principalmente con movimientos involuntarios, así como deterioro en procesos cognoscitivos y demencia (Dawbarn y Allen, 2003).

Así, el estudio de los procesos que ocurren en la neurona (como la expresión de los factores neurotróficos, en este caso las neurotrofinas y sus receptores) ante un daño neurodegenerativo como estrés oxidativo o excitotoxicidad, resulta de relevancia al contribuir al conocimiento de los mecanismos que subyacen a la enfermedad y al generar bases para propuestas potenciales de tratamiento.

A continuación se hace una breve revisión acerca de qué es el sistema nervioso y los ganglios basales para definir, en particular, cómo funciona el núcleo estriado y cómo su lesión se ha asociado a alteraciones motoras, como las observadas en la enfermedad de Huntington.

El sistema nervioso y los ganglios basales.

El sistema nervioso está constituido de dos sistemas diferenciados: el sistema nervioso central (SNC), que incluye al cerebro y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), constituido por todos aquellos nervios localizados fuera del cerebro y de la médula espinal (Beers et al., 2008).

El SNC es una estructura bilateral y esencialmente simétrica con siete partes fundamentales: médula espinal, bulbo raquídeo, protuberancia, cerebelo, mesencéfalo, diencéfalo y los hemisferios cerebrales, dentro de los cuales se encuentran los ganglios basales, el hipocampo y los núcleos amigdalinos (Kandel, 2001).

Los ganglios basales constan de cuatro núcleos subcorticales interconectados entre sí, así como con la corteza cerebral, el tálamo y algunos núcleos del tronco encefálico, de los cuales algunas partes desempeñan una función importante en el movimiento voluntario normal. Sin embargo, al contrario de la mayoría de los demás componentes del sistema motor, no tienen conexiones directas de entrada o de salida con la médula espinal. Estos núcleos reciben su información primaria de la corteza cerebral y envían sus señales al tronco encefálico y, a través del tálamo, de nuevo a la corteza prefrontal, promotora y motora (Kandel, 2001).

Los cuatro núcleos principales de los ganglios basales son: el cuerpo estriado, el globo pálido, la sustancia negra (que consta de una parte reticulada y una parte compacta) y el núcleo subtalámico. El cuerpo estriado tiene tres subdivisiones: el núcleo caudado, el putamen y el estriado ventral (que incluye el núcleo accumbens), y es el principal receptor de aferencias para los ganglios basales procedentes de la corteza cerebral, el tálamo y el tronco encefálico. Recibe información glutamatérgica (es decir, usan como neurotransmisor al aminoácido excitador glutamato) de la corteza cerebral a través del haz corticoestriatal, así como dopaminérgica (es decir, usan como neurotransmisor al aminoácido excitador dopamina) de la sustancia negra compacta (Tang Shang-Tie et al., 2007) y sus neuronas envían prolongaciones al globo pálido y a la sustancia negra reticulada, núcleos que a su vez originan las principales

prolongaciones de salida de los ganglios basales (Kandel, 2001). Entre el cuerpo estriado y los núcleos de eferencias (salidas) existen dos vías de proyección que son las vías indirecta y directa. En la primera, la información pasa al segmento externo del globo pálido y de ahí al núcleo subtalámico y, finalmente, al globo pálido interno que, al igual que la vía directa, manda la información al tálamo. Después del tálamo ambas vías regresan a la corteza (Figura 1). Las dos vías de eferencia del cuerpo estriado se ven afectadas de manera diferente por la entrada de Dopamina (DA), proveniente de la sustancia negra compacta (Rajput et al., 2009)

El cuerpo estriado está constituido por varios tipos de células: del 90 al 95% son neuronas de naturaleza GABAérgica, de tamaño mediano y sus prolongaciones dendríticas poseen una gran cantidad de espinas, razón por la cual se les conoce como espinosas medianas. Estas células son los blancos principales de las células provenientes de la corteza cerebral y la única fuente de eferencias del núcleo estriado, por lo que se conocen como células de proyección. El resto de las neuronas son interneuronas que conforman los circuitos locales dentro del núcleo, las mejor descritas son: las neuronas colinérgicas gigantes (que usan acetilcolina como molécula de señalización), las interneuronas GABAérgicas que contienen parvalbúmina o calretinina; y células más pequeñas que contienen somatostatina, neuropéptido Y o sintetasa del óxido nítrico. Ambas clases de interneuronas tienen extensas colaterales axónicas, cuyo papel principal es modular la actividad de las neuronas de salida del cuerpo estriado (Kandel, 2001). De acuerdo a su morfología y electrofisiología, las interneuronas se clasifican como: interneuronas gigantes colinérgicas no espinosas, interneuronas medianas no espinosas, interneuronas medianas lisas con varicosidades e interneuronas inmunoreactivas a calretinina (Kawaguchi, 1993).

El SN es un sistema de comunicación de gran complejidad, que puede enviar y recibir simultáneamente un volumen considerable de información. Sin embargo, es bastante vulnerable a las enfermedades y las agresiones (Beers et al., 2008). Los trastornos de los ganglios basales pueden provocar reducción de los movimientos corporales (como en la enfermedad de Parkinson) o

movimientos excesivos (como en la enfermedad de Huntington). Por ello, además de proporcionar información importante sobre el control motor, el estudio de los ganglios basales provenientes de pacientes con lesiones en éstas estructuras cerebrales ha impulsado el desarrollo de métodos nuevos para el tratamiento de las enfermedades asociadas a un daño en esta región del cerebro (Kandel, 2001).

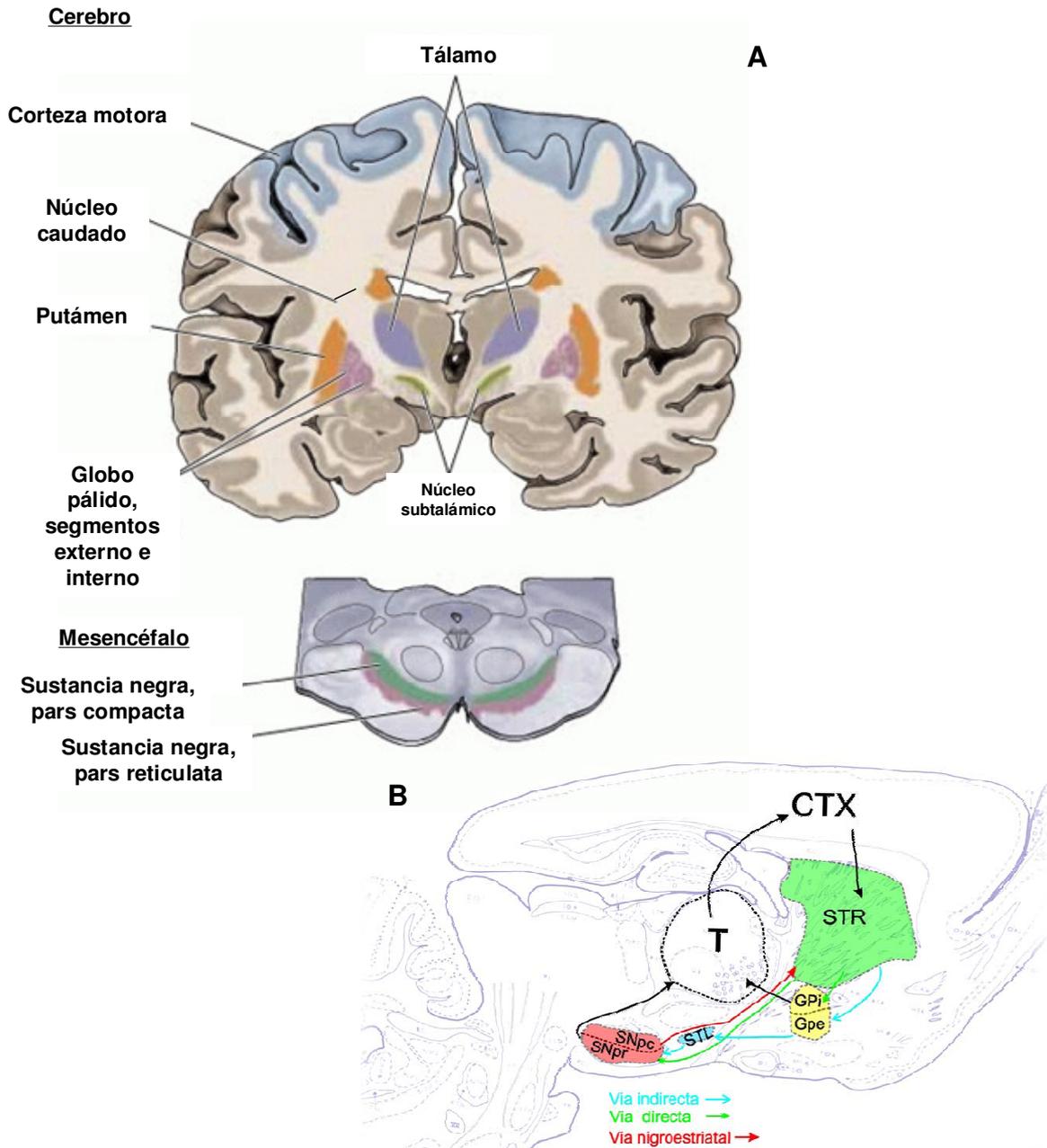


Figura 1. Anatomía de los ganglios basales. A) Corte coronal idealizado donde se muestra la localización anatómica de las estructuras implicadas en las vías de los ganglios basales en el cerebro humano. La mayoría de estas estructuras se encuentran en el telencéfalo, la sustancia negra se encuentra en el mesencéfalo y los núcleos del tálamo y subtalámico se encuentran en el diencefalo (tomado de Neuroscience, 2001). B) Principales vías de conexión entre los núcleos que comprenden los ganglios basales en el cerebro de rata (Abreviaturas: CTX, corteza, STR, núcleo estriado, GPI, globo pálido interno, GPe, globo pálido externo, STL, núcleo subtalámico, SNpc, sustancia negra pars compacta, SNpr, sustancia negra pars reticulata, T, tálamo; Tomado de Pineda, 2006)

La enfermedad de Huntington.

La enfermedad de Huntington (HD, por sus siglas en inglés) es un padecimiento neurodegenerativo, caracterizado clínicamente por alteraciones del movimiento, con la presencia de coreas (posturas estáticas que semejan las actitudes de los bailarines), así como con el síndrome de rigidez-acinesia, convulsiones y depresión (Pasantes, 1999; Dawbarn y Allen, 2003). En adición, se ve afectada la capacidad intelectual y la conducta, presentando anormalidades cognitivas y disturbios emocionales, síntomas que comienzan durante la vida adulta, en general hacia la cuarta década de vida (Pasantes, 1999; Dawbarn y Allen, 2003).

La HD es hereditaria, con un patrón autosómico dominante y penetración del 100%, por lo que cada uno de los hijos de un padre con HD tiene 50% de probabilidades de heredar la enfermedad. Tiene una prevalencia de 5-10 afectados por cada 100 000 personas (Harper, 1992), y se ha encontrado prácticamente en todos los países, afectando por igual a ambos sexos de todas las razas; sin embargo, se ha observado que ocurre con mayor frecuencia entre personas de origen blanco, variando su prevalencia entre grupos étnicos (Rubinsztein *et al.*, 1994; Hernández-Echeagaray, *en prensa*).

Como se mencionó, la posibilidad de heredar o transmitir el padecimiento se presenta por igual en los dos sexos, lo que indica que la alteración genética se encuentra en un alelo dominante que no es del cromosoma ligado al sexo (Pasantes, 1999). Dicha alteración se presenta en un solo gen: IT15, el cual codifica para la proteína htt. En individuos normales el gen presenta entre 9 y 35 repeticiones del triplete de nucleótidos citosina-adenina-guanina (CAG) y la mutación consiste en una elevación de entre 40 y 121 repeticiones de CAG hacia el extremo 3' del gen. Dicho incremento se traduce como un aumento en el número de residuos de glutamina, unidos al extremo amino-terminal de la htt, generando lo que se conoce como huntingtina mutada (htt^m) o poliglutaminada (Brouillet *et al.*, 1999), quien se cree es la causante principal de la patogénesis de esta enfermedad (Dawbarn y Allen, 2003). Se sabe que existe una correlación directa entre la longitud del segmento repetido y la severidad con

que se manifiesta el trastorno (Djousse et al., 2003), no obstante, dicha severidad también parece depender, aunque en menor medida, de otros factores, en particular, de la presencia de determinados polimorfismos en el gen *GRIK2*, que codifica el receptor 6 del glutamato (Rubinsztein et al., 1997).

En todos los vertebrados, el gen *htt* se expresa abundantemente en diversas regiones del cerebro, así como en otros tejidos corporales, y su producto, que se encuentra principalmente dentro del citoplasma de la célula, es necesario para que se completen con normalidad las primeras fases del desarrollo embrionario y para que las neuronas adultas funcionen correctamente. Cuando esta proteína es anormal se torna tóxica, causando la neurodegeneración progresiva característica de la enfermedad (Dawbarn y Allen, 2003; Benitez-Burraco, 2009).

Los mecanismos celulares y moleculares de esta enfermedad (Figura 2) se dan a través de la modificación de la transcripción y la estimulación de la excitotoxicidad y el estrés oxidativo (Zoghbi y Orr, 2000; Ross, 2002; Cooper et al., 1998; Kim et al., 1999; Sieradzan et al., 1999; Benitez-Burraco, 2009). La *htt*m induce la formación de agregados intracelulares e inclusiones intranucleares insolubles en el citoplasma y/o en el núcleo de las neuronas afectadas, que parecen inhibir la transmisión sináptica y la transcripción genética, respectivamente (Zoghbi y Orr, 2000; Ross, 2002). Asimismo, la *htt*m también parece desencadenar el desacople del metabolismo oxidativo que conlleva, predominantemente, a la muerte de las neuronas espinosas medianas (Sieradzan y Mann, 2001), y da lugar al incremento en la sensibilidad al Ca^{2+} de las mitocondrias de las neuronas del cuerpo estriado y a la modificación de algunas rutas de transducción de señales (Brustovetsky et al., 2005; Humbert, 2005).

Se ha propuesto que la HD es selectiva con respecto a la muerte neuronal, que es la causa primordial del padecimiento. Esta selectividad se da a nivel regional, es decir, en algunas zonas del cerebro, así como dentro de las neuronas de cada una de las regiones. El área cerebral más dañada es el estriado, donde sólo se destruyen las neuronas espinosas medianas

GABAérgicas; asimismo, se promueve la pérdida de neuronas piramidales (Pasantes, 1999; Zoghbi y Orr, 2000; Ross, 2002; Dawbarn y Allen, 2003; Benítez-Burraco, 2009).

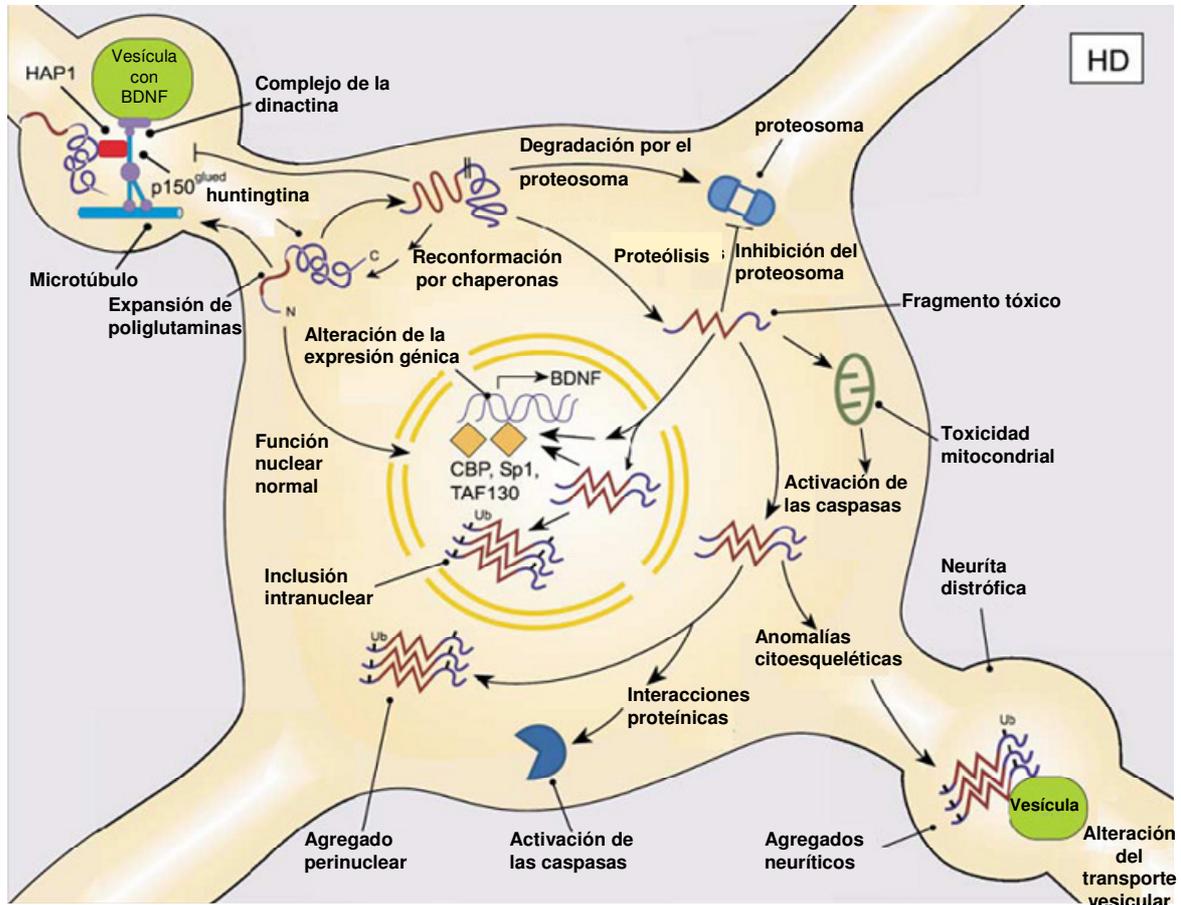


Figura 2. Modelo esquemático del proceso de patogénesis celular responsable de la enfermedad de Huntington. En condiciones normales, la huntingtina es una proteína que se localiza fundamentalmente en el citoplasma, si bien ejerce sus efectos tanto en el propio citoplasma como en el núcleo celular. Cuando existe mutación en esta proteína, el extremo amino terminal resultante, que contiene la expansión repetida del triplete CAG, adopta una conformación en lámina β , que da lugar a la formación de monómeros u oligómeros solubles o, incluso, de agregados insolubles, debido a que inhibe el proteosoma, activa caspasas o a efectos mitocondriales no determinados. Los agregados se acumulan en las regiones perinucleares o neuríticas, y resultan ubiquitinados (Ub). Se cree que el fragmento tóxico de la proteína mutada también se trasloca al núcleo, donde forma inclusiones, si bien la toxicidad nuclear parece deberse a que se produce una interferencia del patrón normal de transcripción de diversos genes, en particular, de los que codifican determinadas moléculas neuroprotectoras (reproducido de Ross, 2004).

El ácido 3-nitropropiónico.

La investigación sobre la HD dispone de modelos animales experimentales que simulan, en gran medida, los procesos que tienen lugar en la patología humana. Estos modelos han sido de gran ayuda para elucidar

mecanismos moleculares de la muerte neuronal en general y están siendo utilizados para la búsqueda de terapias efectivas para esta enfermedad (Bosch, 2005).

Por ejemplo, en pacientes con HD se han detectado alteraciones del metabolismo energético como resultado de la disfunción mitocondrial. En modelos celulares, el fragmento N-terminal de la huntingtina interfiere con el complejo II mitocondrial (en las subunidades Ip y Fp) a nivel post-transcripcional y esto acarrea una disfunción mitocondrial. Por ende, las sustancias tóxicas que afectan el complejo II mitocondrial producen un patrón de atrofia similar al observado en la HD, causando la muerte principalmente de las neuronas estriatales (Pineda, 2006).

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es una toxina mitocondrial específica que inhibe irreversiblemente al Complejo II de la cadena respiratoria, deteniendo la oxidación de succinato a fumarato realizada por la enzima succinato deshidrogenasa. Su inhibición desencadena la reducción en la síntesis de ATP que conlleva la muerte neuronal, en especial en el núcleo estriado. Adicionalmente, el 3-NP induce la activación de proteasas relacionadas con el daño apoptótico como la caspasa-9, que requiere la presencia conjunta de Apaf-1, citocromo c y ATP, datos que, en conjunto, sugieren que la muerte neuronal inducida por el 3-NP ocurre en presencia de una intensa disminución de ATP. Otros estudios han evidenciado en cultivos primarios que el 3-NP induce la presencia y redistribución de factores como citocromo c y proteína Smac/Diablo, asociados a muerte neuronal por apoptosis (Alston et al., 1977; Coles et al., 1979; Huang et al., 2006; Túnes y Santamaria, 2009). Se sabe, además, que la administración sistémica de 3-NP reduce el potencial de membrana, lo cual indirectamente activa los receptores tipo NMDA, resultando en una entrada celular excesiva de Ca^{2+} , que provoca daño y muerte neuronal por excitotoxicidad (Dalbem et al., 2005; Túnes y Santamaria, 2009).

Así, en modelos murinos, una lesión provocada con 3-NP proporciona un modelo neuroquímico para la HD que reproduce algunos aspectos de la enfermedad, en términos de patología y sintomatología, causando una

degeneración selectiva de las neuronas de proyección GABAérgica (Siegel et al., 1999), con una preservación relativa de las neuronas NADPHd (Pineda, 2006).

De hecho, existen evidencias que demuestran que la administración del 3-NP induce muerte celular selectiva de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado (Saulle, *et al.*, 2004), como ocurre en la HD. También se ha observado que en ratas y primates no humanos la administración crónica de 3-NP produce otras características, como el movimiento (corea y distonía), trastornos y anomalías morfológicas (Borlongan et al., 1995; Brouillet et al., 1999; Blum et al., 2002).

Soporte trófico: las neurotrofinas.

Para entender como puede estar involucrada la regulación de los factores tróficos en las enfermedades neurodegenerativas, debemos explicar qué son y cómo funcionan, ya que en sí, los cambios en su expresión no son la causa de las enfermedades pero sí pueden estar estrechamente relacionadas con la severidad de la patología (Pineda, 2006).

Los factores tróficos o de crecimiento son moléculas, generalmente proteínas, producidas por diferentes tipos celulares que regulan la biología celular, tanto en tejidos embrionarios como adultos. Los que actúan sobre el SN se denominan factores neurotróficos (FN). Estos factores están involucrados en la regulación del desarrollo, diferenciación, determinación y mantenimiento del fenotipo neuronal, así como sinaptogénesis, desarrollo axónico y dendrítico. Además, regulan algunas funciones menos conocidas en las células gliales y en algunos tejidos no neuronales. Los FN pueden proteger a las neuronas ante determinadas situaciones patológicas, como la muerte por apoptosis o el daño celular producido por diferentes agresiones. Sin embargo, los efectos de los FN no son específicos para un tipo neuronal, un mismo FN puede actuar sobre diferentes poblaciones neuronales y distintos FN actuar sobre una misma estirpe neuronal. Las funciones de los diversos FN, en condiciones normales y

patológicas, han servido de punto de partida para el análisis de su efecto neuroprotector y/o neuroreparador (Moris y Vega, 2003).

Entre los FN descritos se encuentran las neurotrofinas, una familia de moléculas peptídicas secretadas por las células blanco del tejido neuronal y que tienen acciones fundamentales para el desarrollo y mantenimiento del SN de los vertebrados (Cuadro 1). Estos factores tróficos regulan el crecimiento, la supervivencia, la muerte y la diferenciación de las neuronas y de muchos otros tejidos del neuroectodermo durante el desarrollo embrionario y postnatal, así como el mantenimiento neuronal a lo largo de la vida (Pattarawarapan y Burgess, 2003; Nockher y Renz, 2005). Además, pueden estabilizar los fenotipos específicos de las neuronas del SNC, regulando la expresión de genes, así como activar diferentes cinasas y segundos mensajeros para modular funciones celulares (Leßmann, 1998). En adición, actualmente cobra más fuerza la hipótesis de que los niveles de FN pueden estar implicados en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, como la HD (Alberch et al., 2004; Connor y Dragunow, 1998), ya que son neuroprotectores frente a las lesiones que afectan a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y a las neuronas GABAérgicas estriatales (Pérez-Navarro et al., 2005).

En la actualidad, se han descrito por lo menos 7 neurotrofinas diferentes. En los mamíferos se tienen bien caracterizados el factor del crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4,5 (NT-4/5). En otras especies de vertebrados se han encontrado la neurotrofina-6 (NT-6) y la neurotrofina-7 (NT-7) (Dawbarn y Allen, 2003; Nockher y Renz, 2005; Hong-Tian Zhang et al., 2007; Deogracias, 2007).

A pesar de su gran homología, se sabe que las neurotrofinas desempeñan funciones diferentes. Por ejemplo, *in vitro*, el BDNF mantiene la supervivencia de neuronas corticales embrionarias, así como de células ganglionares de la retina, células colinérgicas, dopaminérgicas y neuronas granulares del cerebelo, mientras que la NT-3 dirige funciones tróficas, tanto en el SNC como en el SNP, promoviendo la diferenciación de las células de Purkinje y

granulares del cerebelo. Además, mantiene la supervivencia y diferenciación de neuronas tanto GABAérgicas como dopaminérgicas (Deogracias, 2007).

Este amplio espectro fisiológico de las neurotrofinas se encuentra determinado por su extensa distribución en el SNC y SNP, y en las células no neuronales, así como por la presencia de receptores específicos para cada neurotrofina (Asal, 1997).

Las proteínas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 se han observado principalmente en cerebro, cerebelo, hipocampo y glía. En cuanto a la expresión génica, se ha observado que el hipocampo y la neocorteza presentan altos niveles de mRNA de NGF; en varias partes de la corteza cerebral y el hipocampo hay una abundante expresión de mRNA de BDNF; en las células de Purkinje y en la corteza cerebral se ha encontrado mRNA de NT-3. El mRNA de NT-4/5 ha sido encontrado en muy bajos niveles en el cerebro (Dawbarn y Allen, 2003; Hong-Tian Zhang et al., 2007).

En 1997, Asal indicó que la concentración de los factores tróficos, así como la de sus mRNA, aumenta considerablemente ante el daño neurodegenerativo, como respuesta para la restauración del árbol dendrítico y del axón (cuya morfología y fisiología se alteran en los procesos neurodegenerativos). Sin embargo, estudios más recientes arrojan resultados contrarios. En 1998, Canals y colaboradores, estudiaron los cambios en la expresión de mRNA de las neurotrofinas en un modelo de Huntington en rata; encontrando que la expresión de cada neurotrofina varía, incluso en tiempo; por ejemplo, el BDNF aumentó su expresión 6 horas después de la lesión excitotóxica, mientras que NT-3 disminuyó su expresión, pero hasta las 10 horas después de la lesión.

Para su aplicación clínica, se continúan realizando ensayos terapéuticos ya que aún no se han establecido concentraciones específicas potenciales de tratamiento en enfermedades neurodegenerativas. Así, por ejemplo, en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica se ha probado la administración durante 6 meses de BDNF en 6 dosis diferentes (desde 10 hasta 300 µg/kg)

logrando mejorías mínimas (Morís y Vega, 2003). En estudios con roedores se ha probado la terapia génica utilizando líneas celulares implantadas que producían más de 100 ng de cada neurotrofina/10⁶ células/día, observando neuroprotección de células espinosas medianas (Pérez- Navarro et al., 1999).

Factor de crecimiento nervioso (NGF).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue uno de los primeros factores neurotróficos que se descubrieron y se consiguieron aislar. Se ha descrito que ejerce una función protectora, al prevenir la muerte neuronal y porque se ha demostrado que incrementa su expresión en el núcleo estriado frente a lesiones excitotóxicas (Canals et al., 1998; Menei et al., 2000). Los niveles mas altos de expresión del mRNA de NGF se han observado tanto en hipocampo como en corteza (Connor y Dragunow, 1998; Saporito et al., 1993).

Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

La actividad neurotrófica del BDNF ha sido observada en diferentes neuronas del sistema nervioso central y se conoce que da soporte a la supervivencia de neuronas motoras, neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, neuronas colinérgicas, GABAérgicas, serotoninérgicas, neuronas del cerebelo y del hipocampo (Nawa et al., 1995; Connor y Dragunow, 1998; Zermeño et al., 2009).

Dentro de las acciones más características que ejerce el BDNF está la de protección sobre las neuronas espinosas medianas estriatales, ya que después de lesiones excitotóxicas se ha observado incremento en su expresión en la corteza cerebral y en el núcleo estriado en modelos excitotóxicos de la HD, tanto postnatales como adultos (Canals et al., 2001; Zermeño et al., 2009). No obstante, en el laboratorio hemos observado que la expresión de la proteína disminuye hacia los 20 días posnatales, manteniendo, de manera natural, su expresión baja en el ratón adulto (Zermeño et al., 2009).

En el 2003, Dawbarn y Allen reportaron que, tanto en animales transgénicos con el gen de la *httm* como en pacientes que presentan la enfermedad, hay una considerable disminución en los niveles de BDNF en el estriado. En este sentido, se ha indicado la posibilidad de que en la HD se provoque una reducción de BDNF en el estriado, conduciendo a la muerte selectiva de las células espinosas medianas (Zuccato, 2001), producto del decremento en la producción de esta neurotrofina en la corteza y su consecuente decremento en el transporte de ésta al estriado (Zuccato y Catanneo, 2007).

En relación a este amplio espectro de actividad, la expresión de la proteína y de su mRNA ha sido detectada en hipocampo, amígdala, tálamo, áreas de proyección del sistema olfatorio, neocorteza, células piramidales y granulares, así como en otras áreas, entre las que destaca el cerebelo (Connor y Dragunow, 1998).

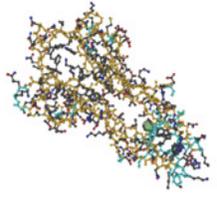
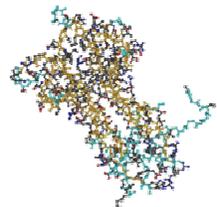
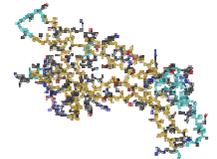
Neurotrofina 3 (NT-3).

En contraste con el BDNF y el NGF, la expresión de la NT-3 es alta durante el desarrollo embrionario y se reduce en el cerebro adulto. De hecho, su expresión, regulada en el estriado y en sus áreas de conexión, ha sido asociada con la supervivencia neuronal y su diferenciación durante el desarrollo. Los niveles de mRNA de la NT-3 permanecen constantes durante las primeras etapas del desarrollo postnatal y disminuyen en el cerebro adulto, aunque puede detectarse en estriado, corteza y sustancia negra (Canals et al., 1998). Datos del laboratorio indican que la proteína se expresa poco durante el desarrollo postnatal e incrementa después y que muy probablemente se transporta desde la corteza (Zermeño et al., 2009).

Neurotrofina 4,5 (NT-4/5).

Esta molécula, junto con la NT-3, también ejerce efectos neuroprotectores, ya que previene la muerte de neuronas estriatales en ratas con modelos excitotóxicos de la HD (Pérez-Navarro et al., 2000) y son muy eficientes frente a la atrofia y reducción de niveles de expresión de encefalinas y sustancia P,

provocadas en las neuronas de proyección estriatales cuando se lesionan con ácido quinolínico (Este efecto se observó utilizando líneas celulares que producían más de 100 ng de cada neurotrofina/10⁶ células por día; Pérez-Navarro et al., 1999). Aunque la NT-4/5 es la neurotrofina que se expresa en menor grado, se ha reportado que su mRNA está presente en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y aún más durante estadios postnatales, encontrándose durante la edad adulta en el estriado y la corteza (Timmusk et al., 1993; Zermeño et al., 2009).

Neurotrofina	Características generales		Reconstrucción tridimensional	Distribución en el cerebro	Acciones celulares		Principales células blanco	Receptor de unión	
NGF	Químicamente son heterodímeros de polipéptidos con residuos altamente básicos sintetizados como precursores (pre-pro-proteínas) y procesados proteolíticamente dentro del retículo endoplásmico (vía convertasas) o extracelular (vía metaloproteasas 3, 7 y plasmina) a neurotrofinas maduras, adquiriendo así actividad biológica.	Este dímero, consiste de 3 subunidades, α , β y γ , que interactúan para formar un complejo 7S de ~27 kDa. El complejo está formado por cadenas anti-paralelas, β plegadas unidas en uno de sus extremos, dándole un aspecto de hélice asimétrica.		Hipocampo, bulbo olfatorio, estriado y corteza.	Sobrevivencia neuronal, crecimiento axonal y dendrítico, estructura y plasticidad sináptica, migración y proliferación celular. Se ha descrito que todas las neurotrofinas tienen un efecto neuroprotector sobre neuronas espinosas medianas GABAérgicas.	- Promueve el crecimiento de neuritas. - En cultivos previene la muerte celular de neuronas simpáticas y sensoriales. - Activa vías intracelulares de señalización como MAPK/ERK, PI-3K/ Akt y C(PLC)-y1.	Neuronas colinérgicas	P75	Trk A
BDNF	Las proteínas maduras tienen un peso aproximado de 12 kDa (como monómeros) y, de manera estable, forman dímeros no covalentes.	Al igual que NGF forman proteínas dimericas de ~28 kDa de estructura muy similar.		Hipocampo, amígdala, tálamo, áreas de proyección del sistema olfativo, neocorteza, claustró, cerebelo, colículo superior y estriado.		- Estimulación de la diferenciación de las células de la cresta neural hacia un fenotipo sensorial. - Induce diferenciación hacia el fenotipo GABAérgico. - Potente acción neuroprotectora sobre las neuronas estriatales. - Rol importante en procesos de aprendizaje. - Induce supervivencia de motoneuronas.	Subpoblaciones de la sustancia negra, el cerebelo, el hipocampo, la corteza y el estriado. Motoneuronas. Neuronas dopaminérgicas, colinérgicas, GABAérgicas serotoninérgicas.		Trk B
NT- 4/5	Son secretadas por neuronas, microglia, astrocitos, células ependimarias, células inmunes.				La unión de las pro-neurotrofinas con el receptor p75 puede activar vías de muerte celular.	- Induce regeneración axonal. - Al igual BDNF activa vías de señalización relacionadas con PI-3K y MAPK.			
NT- 3	Su expresión es regulada por la actividad neuroeléctrica. Pueden ser transportadas retrograda y anterógradamente por sus receptores celulares.	Es un polipéptido de 199 aminoácidos (57% idénticos a NGF y 58% idénticos a BDNF) y con estructura homóloga al resto de las neurotrofinas.		Corteza, cuerpo calloso, sustancia negra, hipocampo, cerebelo y estriado.		- Previene la muerte de neuronas estriatales en ratas. - Protege neuronas del cordón espinal. - Sus principales acciones ocurren durante el desarrollo. - Activa vías como MAPK/ ERK y PI-3K/ Akt.	Células de Purkinje del cerebelo y cordón espinal, células piramidales Motoneuronas Neuronas sensoriales y simpáticas. Neuronas dopaminérgicas.		Trk C (Trk A y Trk B)

Cuadro 1. Neurotrofinas. Resumen de las principales características de las neurotrofinas (Textos de apoyo Connor y Dragunow, 1998; Chao, 2003; Dawbarn y Allen, 2003; Cui, 2006; Pineda, 2006; Fiol, 2007)

Soporte trófico: los receptores.

La respuesta fisiológica a las neurotrofinas está mediada por los receptores específicos para cada una de ellas, pues para ejercer sus funciones biológicas deben unirse a receptores que se encuentran en las membranas de sus células blanco.

Hay dos tipos de receptores para neurotrofinas ubicados en la membrana plasmática. El primer tipo es el receptor p75, que tiene baja afinidad por las neurotrofinas y se expresa, principalmente, en los fibroblastos. El segundo grupo de receptores pertenece a la familia de los protooncogenes Trk y son del tipo de las tirosina cinasas (Asal, 1997). Cada factor neurotrófico es capaz de interactuar con el receptor p75 y con un receptor Trk específico (Connor y Dragunow, 1998).

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

Receptor p75.

Este receptor pertenece a la familia del receptor de necrosis tumoral y es capaz de unirse, con afinidad similar, con todas las neurotrofinas (Deogracias, 2007). Este receptor es una proteína transmembranal de tipo I con un peso molecular aproximado de 75 kDa, posee una estructura extracelular rica en repetidos de cisteína, un dominio simple transmembranal, un dominio juxtamembranal y un dominio intracelular “de muerte” con forma globular (Dechant y Barde, 2002). Ejerce un doble papel: por un lado es capaz de asociarse a los receptores Trk (actuando como co-receptor e incrementando su afinidad por el ligando) y, por otro lado, puede promover la muerte neuronal en ausencia de estos receptores

(mediando respuestas celulares como la apoptosis) (Lee et al., 2001; Moris y Vega, 2003).

Cuando el receptor p75 se une a los receptores Trk altera la especificidad por sus ligandos. Por ejemplo, el BDNF, y las neurotrofinas NT-4/5 y en menor grado NT-3 son capaces de unirse a Trk B, pero sólo el BDNF es capaz de inducir la activación de Trk B en presencia de p75 (Deogracias, 2007).

La expresión del mRNA de p75 se ha detectado en el estriado en desarrollo, pero su expresión por hibridación *in situ* en el adulto es casi nula (Holtzman et al., 1992).

En el 2002, Greferath y colaboradores, estudiaron la expresión del receptor p75 en relación con la supervivencia de interneuronas colinérgicas del estriado de rata, encontrando que existe un retraso de degeneración neuronal con la expresión de p75. También en el 2002, Hanbury y colaboradores, estudiaron el papel del receptor p75 en un daño excitotóxico y metabólico en el estriado de ratón, encontrando que el aumento de expresión ocurre tempranamente después de la lesión y aparece precisamente por del daño ocasionado.

Receptores Trk.

Este tipo de receptores son glicoproteínas transmembranales con actividad de tirosina cinasa intracitoplasmática. La parte extracelular de la proteína esta conformada por un dominio rico en cisteína, varios repetidos de leucina y uno ó dos dominios IgG; en la parte intracelular el dominio tirosina cinasa esta unido a un dominio juxtamembranal (Dechant y Barde, 2002; Huang y Reichardt, 2003; Moris y Vega, 2003). Tienen interacciones de alta afinidad, específicas para cada neurotrofina, aunque dichas alteraciones pueden verse reguladas por asociaciones con el receptor p75 (Figura 3) (Chao, 2003). El mecanismo de acción de las neurotrofinas después de unirse a su receptor de alta afinidad Trk, es la activación de cascadas de señalización intracelular de las tirosina-cinasas, las cuales ejercen su acción por tres vías de señalización: la fosfolipasa C (PLC γ), la activación de la fosfatidilinositol cinasa (PI-3K) y las

MAP cinasas (MAPK), (Figura 4) las cuales entre otras cosas, activan factores de transcripción en el núcleo y tienen efectos sobre la diferenciación celular, inactivación de proteínas pro-apoptóticas, crecimiento axónico, arborización y supervivencia de las células (Huang y Reichardt , 2001).

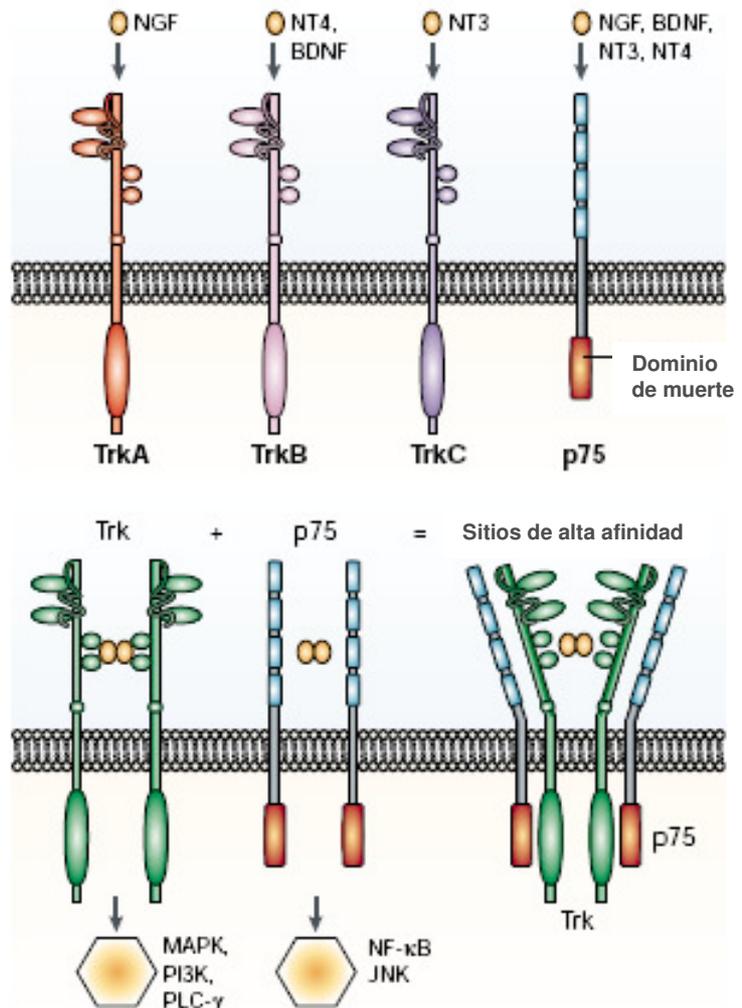


Figura 3. Modelo de activación de los receptores Trk y p75. La unión de cada neurotrofina (que es selectiva para un receptor específico) es el resultado de la dimerización de cada receptor. Los receptores Trk tienen un dominio extracelular de inmunoglobulina G (IgG) y una secuencia catalítica tirosina cinasa como dominio intracelular; mientras que p75 contiene un dominio extracelular de cuatro repeticiones de cisteína y un dominio intracelular que modula la muerte y supervivencia neuronal. La interacción entre Trk y p75 puede conducir a cambios en la afinidad de unión para las neurotrofinas. (Reproducido de Chao, 2003).

- Receptor Trk A.

La proteína Trk A es un receptor de alta afinidad para la neurotrofina NGF (Deogracias, 2007). La distribución del mRNA de Trk A en el sistema nervioso está restringida a estructuras muy definidas, precisamente aquellas que responden a NGF (Chao, 2003). Éstas incluyen la región basal del cerebro, las poblaciones neuronales colinérgicas del estriado y el tálamo en el SNC, y las neuronas DRG en el SNP (Barbacid, 1995). Su mRNA puede detectarse durante el desarrollo embrionario del ratón en torno al día 9 de gestación, y a

partir del día 13 en los ganglios sensoriales y simpáticos (Martín-Zanca et al., 1990). El fenotipo de los ratones a los que se les ha eliminado la expresión de Trk A es muy similar al de los ratones sin expresión de NGF, excluyendo así efectos compensatorios debidos a la unión de la NT-3 o la NT-4/5 (Smeyne et al., 1994). Además, se ha observado que la expresión del mRNA de Trk A aumenta en el estriado después de una lesión excitotóxica (Canals et al., 1999).

- Receptor Trk B.

El receptor Trk B está altamente expresado en el sistema nervioso, es el receptor específico para las neurotrofinas BDNF y NT 4/5, y es uno de los componentes de membrana mejor caracterizado (Kumanogoh et al., 2008). En el ratón, se han identificado tres variantes de Trk B: una forma intacta (Trk B₊) y dos isoformas truncadas (Trk B₋₁ y Trk B₋₂); la forma completa se localiza temprano en el desarrollo en neuronas tanto del SNC como SNP, mientras que las isoformas catalíticamente inactivas o truncadas se encuentran en edades adultas y se localizan preferentemente en las células gliales y otros tejidos no neuronales (Deogracias, 2007), presentando todas un dominio extracelular idéntico.

Los mRNA que codifican las distintas isoformas de Trk B se expresan, de manera abundante, en el cerebro de los roedores a partir del día embrionario 9.5 (Klein et al., 1990), y su expresión está regulada tanto espacial como temporalmente. Así, en cerebro adulto la expresión del mRNA de la isoforma completa de Trk B es evidente en las neuronas de las distintas capas de la corteza cerebral, el tálamo y el hipocampo (Beck et al., 1993; Armanini et al., 1995), mientras que las isoformas truncadas se encuentran en los plexos coroideos, el epéndimo y en células no neuronales (Beck et al., 1993; Biffo et al., 1995). Se sabe, además, que la isoforma completa se expresa en mayor cantidad durante etapas tempranas del desarrollo y las isoformas truncadas lo hacen en el organismo adulto (Deogracias, 2007; Zuccato et al., 2007).

En cuanto a los cambios en la expresión de mRNA de Trk B se ha reportado que aumenta en neuronas corticales y estriatales después de una lesión

excitotóxica (Salin et al., 1995; Canals et al., 1999; Checa et al., 2001), y se asocia el decremento de su expresión con neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer (Connor et al., 1996). Además, reportes recientes indican que la proteína del gen mutado que codifica para la htt, afecta la expresión de Trk B en HD (Zuccato y Cataneo, 2007). De hecho, la reducción en los niveles de Trk B tanto en modelos transgénicos de HD en ratones como en cerebros de pacientes con la enfermedad, han dado pauta para identificar a este receptor como un componente adicional que potencialmente podría contribuir en la alteración del soporte trófico en la HD (Ginés et al., 2006).

- Receptor Trk C.

La expresión de Trk C se detecta en el primordio estriatal el día embrionario 16, alcanzando los máximos niveles dos días después (Jung y Bennett, 1996). En el estriado adulto la distribución celular de mRNA de Trk C es similar al de mRNA de Trk B, pero Trk C posee afinidad para la neurotrofina NT-3 (Merlio et al., 1992).

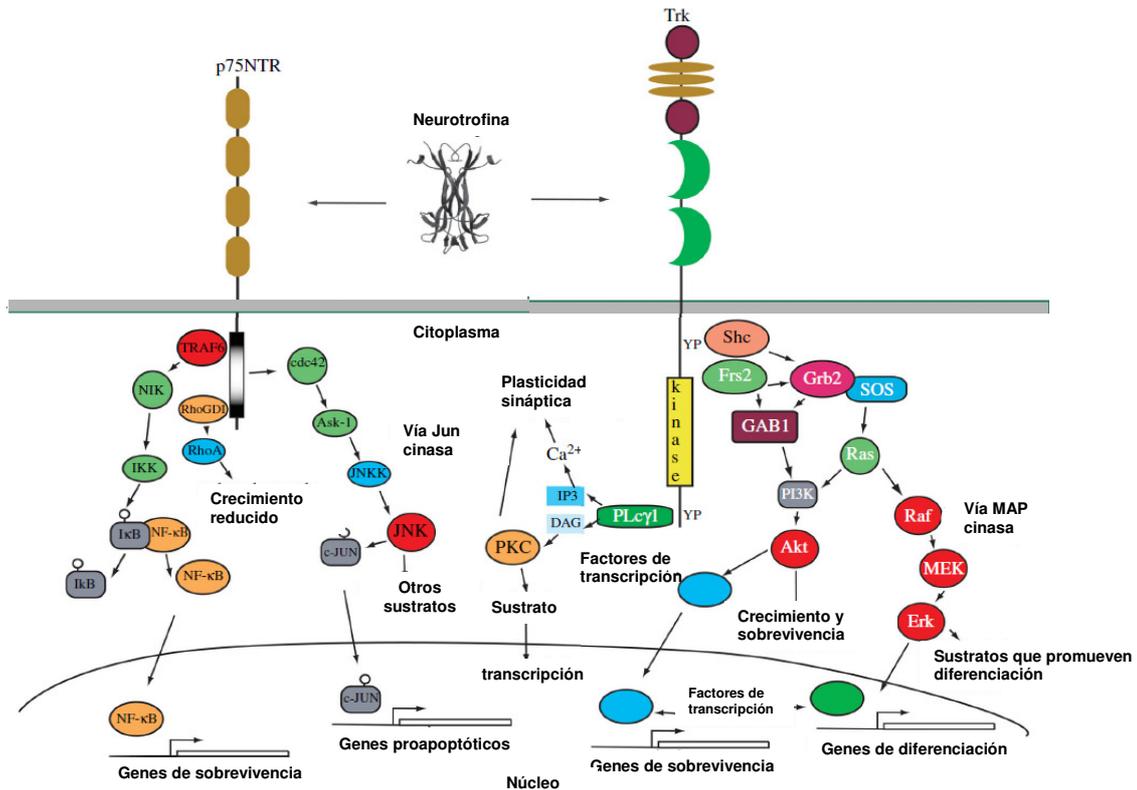


Figura 4. Algunas vías de señalización. El esquema representa la interacción de las neurotrofinas con los receptores Trk y p75 y las principales vías de señalización intracelular que se activan. El receptor p75 regula principalmente tres vías de señalización: 1) la activación de NF-κB resulta en la transcripción de múltiples genes incluyendo algunos que promueven la supervivencia neuronal, 2) la activación de la vía Jun cinasas controla la activación de varios genes, entre ellos algunos que promueven apoptosis, y 3) regula la actividad de Rho, que regula algunos procesos de crecimiento de conos. Las acciones proapoptóticas de p75 requieren aparentemente de la presencia de sortilina, que actúa como correceptor. Cada receptor Trk también controla tres principales vías de señalización: 1) la activación de Ras resulta en la activación de cascadas de señalización de MAP cinasas, la cual promueve diferenciación neuronal, 2) la activación de PI3 cinasa a través de Ras o Gab1 promueve la supervivencia y el crecimiento de neuronas y otras células, y 3) la activación de PCL-γ1 resulta en la activación de Ca²⁺ y proteína cinasa C que regulan vías que promueven la plasticidad sináptica. Cada una de estas vías de señalización también regula la transcripción de algunos genes. Es importante señalar que se han descrito otras vías de señalización que no se muestran en la figura (Tomado de Reichardt, 2006).

Estudio de la expresión génica y la técnica de PCR.

En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades mediante la activación o desactivación de la expresión de sus genes (Vinueza-Burgos, 2009). Estrictamente, el término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular (Hernández et al., 1994). Sin embargo, es un hecho

generalmente aceptado que la expresión génica es proporcional al número de copias de RNA mensajero (mRNA) de un gen determinado. Este es un hecho crucial cuando se tratan de identificar productos celulares específicos, ya que el mRNA es traducido en los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson et al., 2008).

Por esta razón, en la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante detección y/o cuantificación de los mRNAs funcionales del citoplasma; por lo que los métodos de estudio utilizados (Northern blot, protección de RNAsa, hibridación in situ, RT-PCR) se basan en su capacidad para detectar mRNAs específicos y no productos protéicos (Hernández et al., 1994).

Las técnicas en donde se detecta y cuantifica los niveles de transcripción de mRNA de genes específicos se basan en la ausencia o presencia del transcrito, ya que su presencia indica que el gen es activo y se puede expresar normalmente, y por lo tanto las variaciones en las cantidades indican variaciones en su expresión.

La amplificación, detección y cuantificación de ácidos nucleicos está entre las técnicas más valiosas usadas actualmente en investigaciones biológicas, sobre todo en aquellas donde se evalúan cambios en los niveles de expresión de uno o varios genes y éstos se relacionan con muy diversas patologías (Boda et al., 2009). Dependiendo del objetivo de la investigación, pueden obtenerse con variantes de esta técnica (PCR semicuantitativo y en tiempo real) datos cualitativos o cuantitativos (Bio-Rad, 2006) y cada una posee ciertas características distintivas que son importantes en el momento de su elección. Por ejemplo, la PCR en tiempo real es rápida y tiene una mayor sensibilidad que la PCR convencional; sin embargo, esta última permite diferenciar entre bandas de diferentes productos, pudiendo excluir bandas inespecíficas (Flori, 2004).

La PCR consiste, primero, en una extracción de RNA a partir del tejido en el que se quiere estudiar la expresión de un gen específico, seguido de la síntesis

de una cadena de cDNA mediante una Transcripción Reversa (RT) y finalmente una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la que se obtiene un producto amplificado del mRNA específico, que puede ser cuantificable, ya sea por densitometría de las bandas obtenidas por electroforesis en un gel (PCR semicuantitativo) o midiendo la cantidad de producto amplificado conforme progresa la reacción, es decir, en “tiempo real” (PCR tiempo real) (Hernández et al., 1994; Bio-Rad, 2006).

La detección de los productos de la reacción de PCR se hace posible al incluir, ya sea al final de la reacción (PCR semicuantitativo) o durante la reacción (PCR tiempo real) moléculas fluorescentes que se unen al DNA, lo que produce aumento de fluorescencia, proporcional a la cantidad de DNA amplificado. Durante la reacción de PCR en tiempo real la fluorescencia refleja la cantidad del producto amplificado después de cada ciclo (Bio-Rad, 2006).

Debido a su sensibilidad, rapidez, exactitud, reproducibilidad y un amplio rango dinámico de cuantificación el método de RT-PCR (ya sea semicuantitativo o en tiempo real), puede ser usado para estudiar la expresión génica, permitiendo medidas cuantitativas y cualitativas de la expresión en un número muy pequeño de células y en muestras pequeñas de tejido; brindando información sobre cambios en los niveles de expresión de mRNA específicos en estudio y diagnóstico de distintas enfermedades (Hernández et al., 1994; Flori et al., 2004; Bio-Rad, 2006).

Justificación.

Uno de los papeles más importantes de las neurotrofinas, es su actividad frente a procesos que involucran daños neurodegenerativos (como la enfermedad de Huntington), pues mantienen la homeostasis celular, ya sea estimulando la polimerización de microtúbulos y microfilamentos, regulando la liberación de hormonas y neurotransmisores o incrementando la actividad de diversas enzimas que son piezas clave en el control del metabolismo celular (Asal, 1997). Aunado a lo anterior, diversos estudios han mostrado que la supervivencia neuronal depende de la presencia y de la disponibilidad de varios factores neurotróficos, expresados simultánea o secuencialmente en patrones espacio-temporal específicos (McAllister et al., 1995; Poo, 2001); así como a la disponibilidad de receptores a los que puedan ligarse para llevar a cabo sus funciones.

Se ha observado que en enfermedades neurodegenerativas existen cambios en los niveles de neurotrofinas, que se relaciona con la muerte neuronal. Por esta razón, el interés por estudiar la posible relación que hay entre las neurotrofinas y sus receptores y los procesos neurodegenerativos se debe a razones clínicas y potencialmente terapéuticas, que permitan abordar los mecanismos moleculares que presentan las neuronas, con el fin de contrarrestar el daño causado por los procesos degenerativos, ya que los factores neurotróficos pueden proveer neuroprotección a poblaciones neuronales específicas, inhibiendo la inducción de mecanismos apoptóticos (Pérez-Navarro, 1999), de esta forma las neurotrofinas podrían emplearse como herramienta terapéutica en procesos neurodegenerativos (Hernández-Echeagaray, 2004; Zermeño et al., 2009).

En conjunto, se sabe ampliamente que el soporte trófico de las neuronas adultas no sólo depende de la cantidad de neurotrofinas expresadas, sino que está mediado por sus receptores, por lo que resulta también importante estudiar si la expresión de estos receptores se ve afectada ante daños neurodegenerativos.

De esta forma, los cambios en los niveles de neurotrofinas y sus receptores podría explicarse a nivel molecular, por una alteración en la expresión génica de los mRNA de las distintas neurotrofinas y sus receptores ante un daño neurodegenerativo, como en el modelo murino de la enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico, por lo que en este trabajo de investigación evaluaremos la siguiente hipótesis.

Hipótesis.

El daño neuronal inducido por la administración de ácido 3-nitropropiónico en el modelo murino de la Enfermedad de Huntington altera indirectamente la expresión génica del mRNA de las neurotrofinas y/o sus receptores presentes en el núcleo estriado.

Objetivos.

Objetivo general.

Determinar los cambios en la expresión génica de mRNA de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 y de los receptores p75, Trk A, Trk B y Trk C en el núcleo estriado de ratones a los cuales se les administró ácido 3-nitropropiónico para inducir un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington.

Objetivos específicos.

- Determinar mRNA de neurotrofinas y sus receptores en el estriado de ratones tratados con ácido 3-nitropropiónico y en condiciones normales por RT-PCR.
- Cuantificar la expresión de mRNA de las neurotrofinas y sus receptores en el modelo experimental inducido con ácido 3-nitropropiónico y en condiciones normales.
- Comparar los niveles de mRNA de neurotrofinas y sus receptores en el modelo experimental inducido con ácido 3-nitropropiónico con los niveles que se presentan en condiciones normales.
- Correlacionar los niveles de mRNA de neurotrofinas con los niveles de mRNA de sus receptores ante un daño neurodegenerativo.
- Estimar el efecto de la neurodegeneración sobre los niveles de mRNA de neurotrofinas y sus receptores a 1 hora y a las 48 horas después de la última dosis de ácido 3-nitropropiónico.
- Comparar las técnicas de PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real en la evaluación de la expresión génica de neurotrofinas y sus receptores.
- Evaluar las características de expresión de los genes de referencia β -actina y 18S Ribosomal y su influencia en la normalización de los resultados.

Método.

Tratamiento con 3-NP

Se utilizaron ratones de la cepa C57/BL6, alojando 5 ratones por jaula con libre acceso a comida y agua. Se formaron dos grupos de 10 animales al azar (n= 20, 10 controles y 10 tratamiento), aplicando al grupo control solución Buffer de fosfatos (PB, siglas en ingles) a una concentración 0.1 M y pH de 7.4, que se usa como vehículo del fármaco, mientras que el otro grupo recibió durante 5 días el tratamiento de 15 mg/kg de 3-NP, diluido en PB y ajustado a pH de 7.4. Los tratamientos se administraron intraperitonealmente (i.p.).

Obtención de tejido y extracción de RNA.

Los animales fueron sacrificados a 1 hora y a 48 horas después de la última dosis de 3-NP. La región que se analizó fue el núcleo estriado; para ello se extrajo el cerebro de cada ratón y se disectó el núcleo estriado. Para la extracción de mRNA, el tejido estriatal fue cortado y colocado en tubos de 1 ml.

La obtención de RNA se realizó por el método TRIzol Reagent, *Total RNA Isolation Reagent* (Life Technologies) con modificaciones para el tejido cerebral (Apéndice 1). Se cuantificó el RNA obtenido por espectrofotometría con luz UV a una absorbancia de 260 nm. Para evaluar su calidad se calculó una relación de absorbancias a 260 y 280 nm (Shen, et. al., 1999).

RT-PCR semicuantitativo y cuantificación de mRNA.

Para la reacción de transcriptasa reversa (RT), se utilizó el RNA total obtenido a una concentración de 1.5µg/µl, con 1 µl de la enzima *Reversa Transcriptasa del Modelo Murino del Virus de la Leucemia* (SIGMA) y 1 µl de Oligo dT como iniciador, colocando la mezcla de reacción a 37 °C por 1 hora en un termociclador (TECHNE, TC 3000) (Bonini, et. al., 2001). El cDNA obtenido fue amplificado por PCR con la enzima *REDTaq DNA Polimerase* (protocolo

SIGMA) en una mezcla de reacción total de 25 μ l, compuesta por: los “*primers*” de la neurotrofina o su receptor, el cDNA, los nucleótidos, el buffer de PCR, agua esteril tratada con DEPC (para inactivar RNasas) y la enzima. Los ciclos de amplificación y los “*primers*” fueron específicos para cada neurotrofina (ver Cuadro 2) y para cada receptor (ver Cuadro 3) (Ver Apéndice 1). Para el control de la eficiencia de las reacciones individuales de RT-PCR se utilizó el mRNA de β -actina y 18S Ribosomal (ver Cuadro 2; Bonini, et. al., 2001; Kawakami, et. al., 2002).

Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, diluido en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA), agregando 1 μ l de SYBR Green, para ser revelados por quimioluminiscencia usando un scanner *SCAN FUJIFILM FLA-5000* y determinar su densidad a partir de las imágenes reveladas, utilizando el programa *Image Reader FLA-5000 V2.1*.

Para estimar los niveles de expresión génica obtenidos de cada neurotrofina y sus receptores, se hizo un análisis semicuantitativo de la densidad obtenida de la PCR (medida en unidades LAU/mm², es decir, la cantidad de fluorescencia por unidad de área), calculando la expresión relativa en relación al gen constitutivo (β -actina o 18S Ribosomal) y comparando los niveles del grupo control con los niveles del grupo experimental.

RT-PCR tiempo real.

La reacción RT se realizó como se describió anteriormente. El cDNA obtenido fue amplificado por PCR en tiempo real en una mezcla de reacción total de 15 μ l, compuesta por: el “*primer*” de la neurotrofina (ver cuadro 2) o su receptor (ver cuadro 3), el cDNA, los nucleótidos, H₂O + DEPC y *SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix for Quantitative PCR (Sigma-Aldrich)*, utilizando un termociclador *Rotor-Gene 3000* (Corbett Research) y el programa *Rotor-Gene Analysis Software 6.1 para SYBR Green (R)1* para la obtención del ciclo umbral (CT, siglas en ingles) a 0.02 y su análisis. Los ciclos de amplificación fueron específicos y se utilizó al 18S Ribosomal como gen endógeno, para el control

de las reacciones y para obtener la expresión relativa. Finalmente se comparó los niveles del grupo control con los niveles del grupo experimental.

Cuadro 2. Primers utilizados en reacción PCR para cada neurotrofina

Neurotrofina	Secuencia		No. Ciclos	Producto (pb)	Tm (°C)
NGF	Sentido	5'-TAGCGTAATGTCCATGTTGT	35	434	58
	Antisentido	5'-CCCACACACTGACACTGTCA			
BDNF	Sentido	5'-GAAGAGCTGCTGGATGAGGAC	40	332	60
	Antisentido	5'-TTCAGTTGGCCTTTTGATACC			
NT-3	Sentido	5'-CTCATTATCAAGTTGATCCA	35	312	55
	Antisentido	5'-CCTCCGTGGTGATGTTCTATT			
NT-4/5	Sentido	5'-CCCTGCGTCAGTACTTCTTCGAGAC	40	249	65
	Antisentido	5'-CTGGACGTCAGGCACGGCCTGTTC			
β -actina	Sentido	5'-TGGTGGGTATGGGTGAGAAGGACTC	30	266	60
	Antisentido	5'-CATGGCTGGGGTGTGAAGGTCTCA			
18S	Sentido	5'-GGG AGC CTG AGA AAC GGC	20	93	60
	Antisentido	5'-GGG TCG GGA GTG GGT AAT TT			

Kawakami T., et. Al., 2002.

Las síntesis de los primers se obtuvieron de SIGMA-ALDRICH

Cuadro 3. Primers utilizados en reacción PCR para cada receptor

Receptor	Secuencia		No. Ciclos	Tm (°C)
Trk A	Sentido	5'-GTGCTCAATGAGACCAGC-TTC	40	60
	Antisentido	5'-CTTCAGTGCCCTTGACAGCCAC		
Trk B-	Sentido	5'-CATGGATCCTGACCCACTCCCCACCTTG	50	68
	Antisentido	5'-CATAAGCTTCGACTCCAGGCCGGCCCATG		
Trk B+	Sentido	5'-CGGGGATCCGGTATACCAACAGCCAGCTCAAGCCG	50	68
	Antisentido	5'-CCCAAGCTTCTCGGTGGGCGGGTTACCCTCTGCCATC		
Trk C	Sentido	5'-TGGACTGGATAGTCACTGG	45	60
	Antisentido	5'-TGGGTCACAGTGATAGGAG		
p75	Sentido	5'-GAGCCACCAGAGCGTGTG	35	60
	Antisentido	5'-GGGGATGTGGCAGTGGAC		

Bonini, et. al., 2001 y Kumanogoh, et al, 2008

Las síntesis de los primers se obtuvieron de SIGMA-ALDRICH

Análisis de resultados.

Los datos obtenidos se graficaron en *Box Plots* para observar la distribución de los datos (ver Apéndice 2) con la ayuda del programa Microcal Origin 7 (Microcal Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA); y fueron analizados estadísticamente con los programas Sigma Stat 3.1 (Softeck, SPSS, Inc.) y GraphPad Prim 5, utilizando las pruebas estadísticas de análisis de varianza y *t* de Bonferroni para las comparaciones a posteriori en donde hubo significancia o las pruebas, *t* de Student (distribución normal) o *u* de Mann Whitney (datos con varianzas no homogéneas o sin distribución normal) en las comparaciones de dos grupos no correlacionados.

Resultados.

Los mRNAs de las neurotrofinas son expresados a lo largo del desarrollo.

En condiciones normales, la expresión de las neurotrofinas es baja y varía a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal. Por esta razón, para asegurar y tener certeza de que las neurotrofinas evaluadas en este estudio (BDNF, NGF, NT-3 y NT-4/5) estaban presentes en el tejido estriatal, se realizó la detección del mRNA de las neurotrofinas por RT-PCR en ratones de 10, 21 y 42 días (P10, P21 y P42) de edad. Los niveles de mRNA de cada neurotrofina fueron normalizados con la expresión del gen endógeno β -actina.

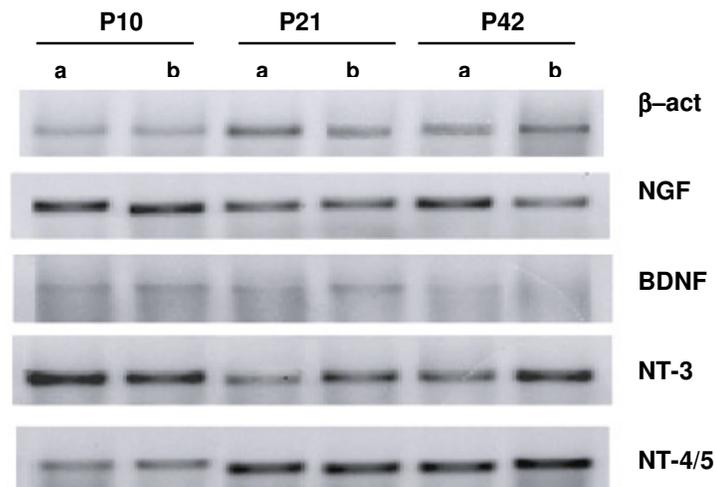


Figura 5. mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal de ratones a 10, 21 y 42 días postnatales. Se observan los productos de la reacción PCR semicuantitativo (en geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr Green) de las neurotrofinas de dos diferentes ratones (a y b) durante las edades postnatales 10, 21 y 42 días.

En todas las edades postnatales evaluadas se encontró la presencia de mRNA de las neurotrofinas (Figura 5). Los niveles de $mRNA_{NGF}$ no mostraron cambios estadísticamente significativos entre las edades evaluadas ($F_2=5.119$, $P=0.060$). Los niveles de $mRNA_{BDNF}$ mostraron reducción significativa ($F_2=29.712$, $P<0.001$) a los 21 y 42 días en comparación con 10 días postnatales (P10 vs. P21, $t=5.135$, $P<0.006$; P10 vs. P42, $t=7.547$, $P<0.001$; prueba de t de Bonferroni). Los niveles de $mRNA_{NT-3}$ y $mRNA_{NT-4/5}$ no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($F_2= 3.213$, $P=0.113$; $F_2=2.289$, $P=0.183$, respectivamente), a los días postnatales evaluados (Figura

6). Además, estos resultados son importantes ya que nos permitieron confirmar que las técnicas utilizadas para obtener el RNA y realizar la amplificación del material fueron hechas correctamente.

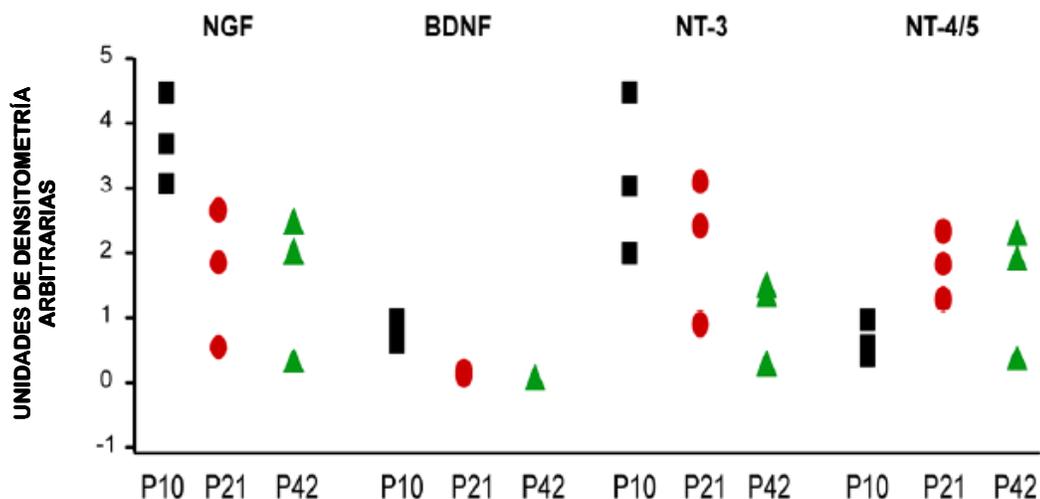


Figura 6. Expresión de mRNA de neurotrofinas durante el desarrollo. Datos de los niveles de expresión de mRNA de las neurotrofinas a los 10 (Cuadros, n=3), 21 (círculos, n=3) y 42 (triángulos, n=3) días postnatales en el estriado de ratón. Los datos fueron analizados midiendo el área y la densidad de las bandas obtenidas por electroforesis y son expresados en Unidades arbitrarias de densitometría.

Una buena elección de genes de referencia: β -actina y 18S Ribosomal.

El gen endógeno β -actina que utilizamos para estimar la expresión relativa no presentó diferencias significativas a ningún tiempo ni entre el grupo control y el tratamiento con 3-NP ($t_{17} = 0.108$, $P = 0.915$, prueba de t); sin embargo, en algunas ocasiones su expresión fue baja (ver expresión en condiciones control y después del tratamiento con 3-NP), por lo que decidimos probar otro gen endógeno de referencia, el gen 18S Ribosomal. Éste fue mucho más estable entre todas las muestras tanto aquellas evaluadas 1 hora como las de 48 horas después de la última dosis de 3-NP ($t_{17} = 0.001$, $P = 0.999$, prueba de t), mostrando además en la densitometría niveles de expresión más elevados que los observados para β -actina ($F = 92.26$, $P = <0.0001^*$, prueba de ANOVA, Figura 7, 12, 13, 14, 15). Esta diferencia en la expresión de ambos genes de

referencia puede generar un cambio en el cálculo de la expresión relativa de mRNA tanto de las neurotrofinas como de sus receptores.

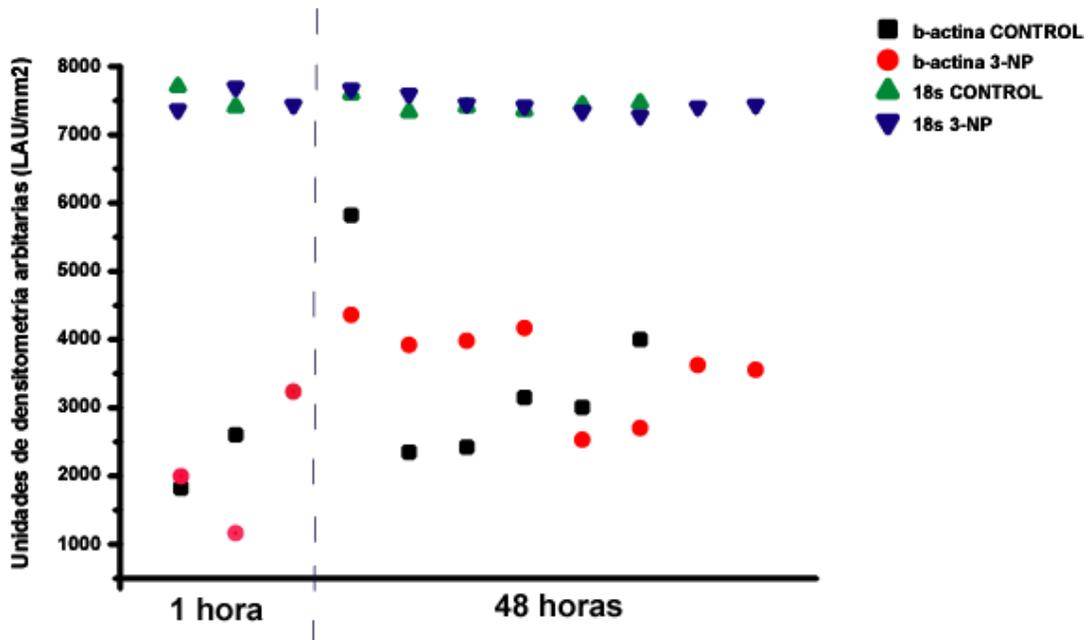


Figura 7. Expresión de genes de referencia determinados por densitometría. Se observan los datos obtenidos por densitometría de la expresión absoluta de los genes 18S Ribosomal y β -actina tanto para el control como después del tratamiento con 3-NP en dos tiempos diferentes después de la última dosis (1 y 48 horas). Los datos fueron analizados midiendo densidad de las bandas obtenidas por electroforesis y son expresados en Unidades arbitrarias de densitometría.

Debido a los resultados anteriores, calculamos la expresión relativa para cada neurotrofina y para cada receptor normalizando tanto con la expresión de β -actina como con la de 18S Ribosomal. Aún cuando el patrón de expresión es similar normalizando con ambos genes, existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los mismos grupos (Control vs Control o 3-NP vs 3-NP), normalizados con uno u otro gen de referencia, principalmente a las 48 horas después de la última dosis de tratamiento (Cuadro 4, prueba de t), resultando sobreestimada la expresión relativa al normalizar con β -actina en comparación con los niveles obtenidos al normalizar con 18S, el gen de referencia que observamos más estable bajo nuestras condiciones experimentales (Figuras 8, 9, 10 y 11). De estos resultados se deriva la importancia de realizar una buena elección del gen de referencia basada en sus niveles de expresión y su participación celular. El análisis realizado con los dos genes de referencia constituye, en nuestro laboratorio, la base para el estudio de la expresión de otros genes de interés.

Controles 1 hora después de la última dosis de tratamiento

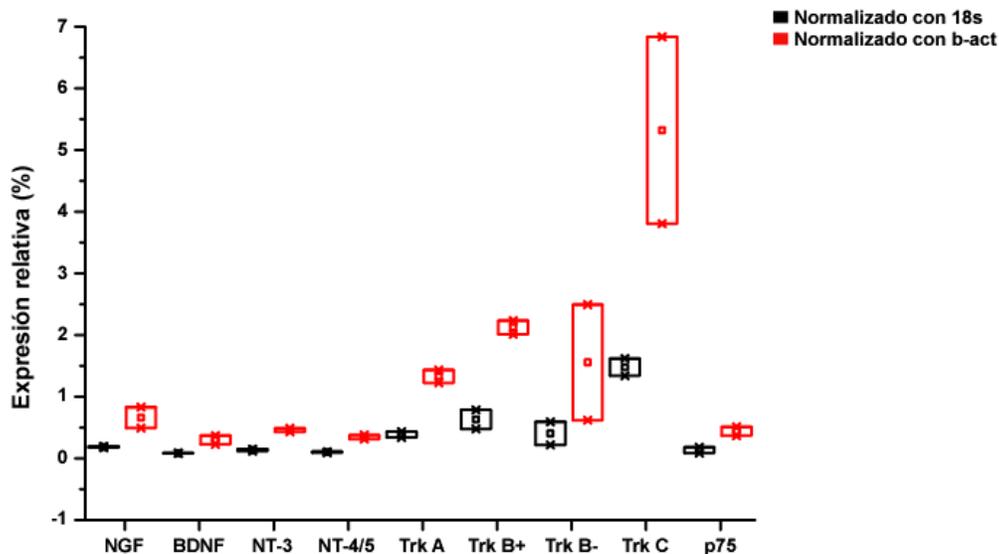


Figura 8. Expresión relativa de genes en ratones control respecto a los genes de referencia β -actina y 18S ribosomal. Box plots en los que se muestra la expresión relativa de mRNA de cada neurotrofina y de cada receptor comparando los niveles obtenidos entre el mismo grupo Control pero normalizado en relación a la expresión de 18s (negro) o a la expresión de β -actina (rojo) a la hora después de la última dosis de tratamiento.

Controles 48 horas después de la última dosis de tratamiento

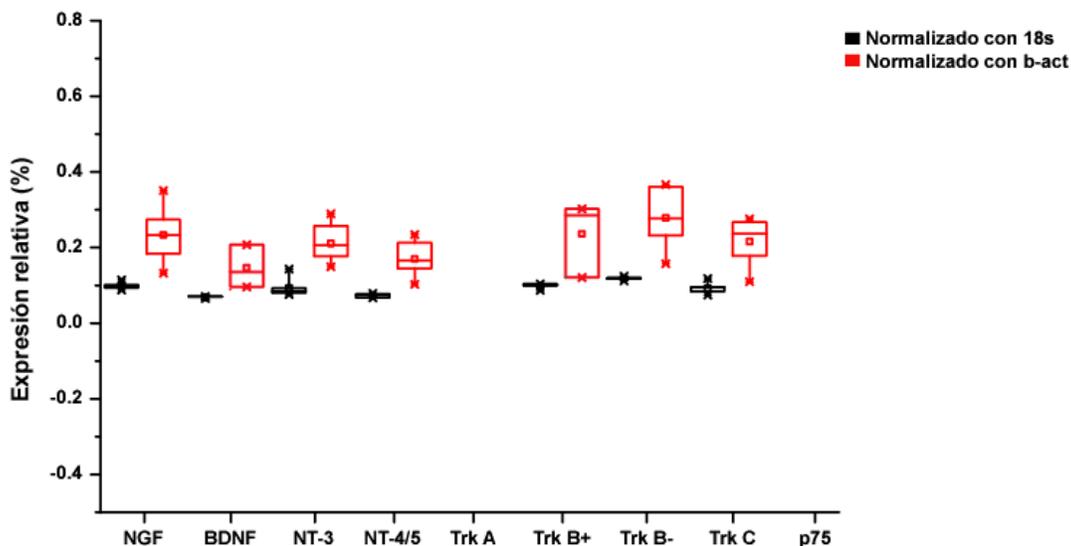


Figura 9. Expresión relativa de genes en ratones control respecto a los genes de referencia β -actina y 18S ribosomal. Box plots en los que se muestra la expresión relativa de mRNA de cada neurotrofina y de cada receptor comparando los niveles obtenidos entre el mismo grupo Control pero normalizado en relación a la expresión de 18s (negro) o a la expresión de β -actina (rojo) a las 48 horas después de la última dosis de tratamiento.

3-NP 1 hora después de la última dosis de tratamiento

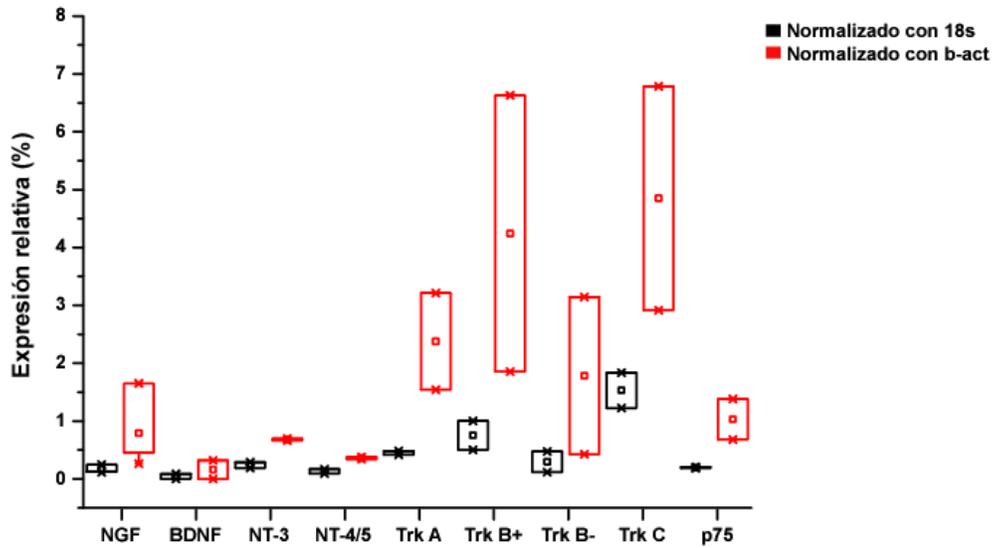


Figura 10. Expresión relativa de genes en ratones tratados con 3-NP respecto a los genes de referencia β -actina y 18S ribosomal. Box plots en los que se muestra la expresión relativa de mRNA de cada neurotrofina y de cada receptor comparando los niveles obtenidos entre el mismo grupo tratado con 3-NP pero normalizado en relación a la expresión de 18s (negro) o a la expresión de β -actina (rojo) a la hora después de la última dosis de tratamiento.

3-NP 48 horas después de la última dosis de tratamiento

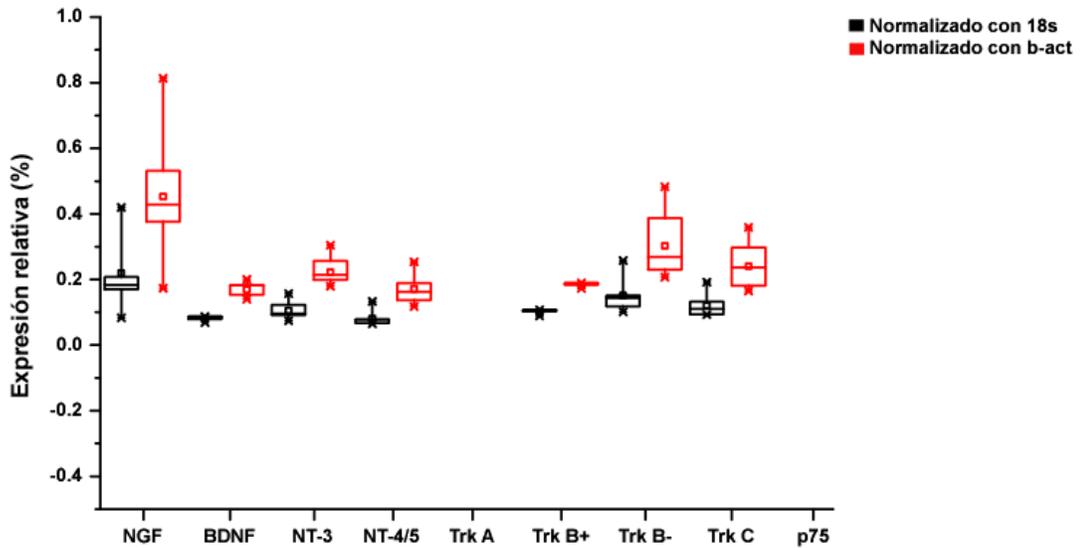


Figura 11. Expresión relativa de genes en ratones tratados con 3-NP respecto a los genes de referencia β -actina y 18S ribosomal. Box plots en los que se muestra la expresión relativa de mRNA de cada neurotrofina y de cada receptor comparando los niveles obtenidos entre el mismo grupo tratado con 3-NP pero normalizado en relación a la expresión de 18s (negro) o a la expresión de β -actina (rojo) a las 48 horas después de la última dosis de tratamiento.

Grupos comparados	Gen evaluado	t	P	
18S CONTROL VS β -ACT CONTROL	NGF	$t_{14}= 2.704$	P= 0.01	**
	BDNF	$t_9= 3.117$	P= 0.01	**
	NT-3	$t_{14}= 3.771$	P= 0.002	***
	NT-4/5	$t_{14}= 4.081$	P= 0.001	****
	Trk A	$t_2= 8.294$	P= 0.01	**
	Trk B+	$t_8= 1.424$	P= 0.192	
	Trk B-	$u= 7$	P= 0.007	***
	Trk C	$u= 14$	P= 0.04	*
	p75	$t_2= 3.534$	P= 0.07	
18S 3-NP VS β -ACT 3-NP	NGF	$t_{20}= 2.706$	P= 0.011	**
	BDNF	$t_8= 3.634$	P= 0.006	***
	NT-3	$t_{17}= 2.911$	P= 0.009	***
	NT-4/5	$t_{18}= 3.839$	P= 0.001	****
	Trk A	$t_2= 2.303$	P= 0.147	
	Trk B+	$t_8= 1.146$	P= 0.2849	
	Trk B-	$u= 9$	P= 0.014	**
	Trk C	$t_{14}= 1.055$	P= 0.309	
	p75	$t_2= 2.380$	P= 0.14	

Cuadro 4. Se presenta el resultado estadístico de la prueba de t de student (t) o de Mann Whitney (u), comparando entre el mismo grupo experimental (Control vs Control, 3-NP vs 3-NP) pero normalizado con 18S Ribosomal y con β -actina. Simbología (diferente estadísticamente), 0.05 (*), 0.01 (**), 0.005 (***), ≤ 0.001 (****).

PCR semicuantitativo: Las neurotrofinas tienden a aumentar ante un daño neurodegenerativo.

Una vez confirmada la expresión de las neurotrofinas en el núcleo estriado de ratón desde el día posnatal 10 hasta el 42, evaluamos su expresión ante un daño neurodegenerativo causado por la administración de 3-NP, una hora después de la última dosis de tratamiento (cuando la inhibición sobre la enzima SDH aún es latente) y 48 horas después (en donde se pueden observar los daños de neurodegeneración causados por la inhibición crónica con dosis bajas de 3-NP). Además, dadas las diferencias que encontramos entre los genes de referencia utilizados, estimamos los niveles de expresión relativa normalizando tanto con 18S Ribosomal como con β -actina. A una hora después de la última dosis no observamos cambios en los niveles de expresión

(Control n=2, 3-NP n=3, Figura 12). 48 horas después de la última dosis, los resultados obtenidos de 6 ratones por grupo experimental mostraron una tendencia al aumento de las cuatro neurotrofinas evaluadas, después del daño ocasionado por la toxina 3-NP, en comparación con el grupo control (Figura 13).

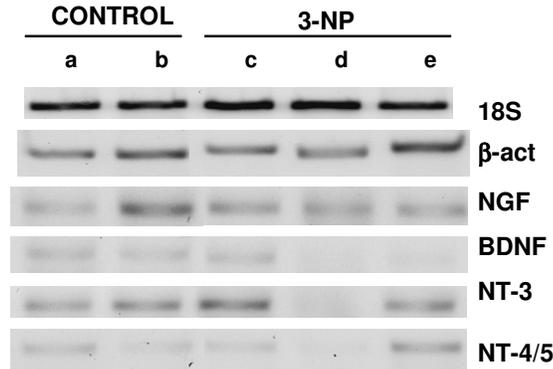


Figura 12. mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo. Se observan los productos de la reacción PCR semicuantitativo (en geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr Green) de los niveles de expresión de mRNA de las neurotrofinas (grupo control n=2, a y b, grupo experimental n=3, c, d y e) después de 1 hora de la última dosis de 3-NP y del control.

Los niveles de expresión de las neurotrofinas una hora después de la última dosis de tratamiento, comparados con el grupo control no fueron diferentes estadísticamente normalizados tanto con como con 18S Ribosomal (Normalizado con 18S: NGF, $t_3= 0.3843$, $P= 0.7264$; BDNF, $t_2= 0.9121$, $P= 0.4580$; NT-4/5, $t_3= 0.2201$, $P= 0.8399$; NT-3, $t_3= 0.2348$, $P= 0.8295$; Normalizado con β-actina: NGF, $t_3= 0.2279$, $P= 0.8344$; BDNF, $t_2= 0.7772$, $P= 0.5184$; NT-4/5, $t_3= 0.6651$, $P= 0.5536$; NT-3, $t_3= 0.017$, $P= 0.9869$) (Figura 12 y 14, 1 hora).

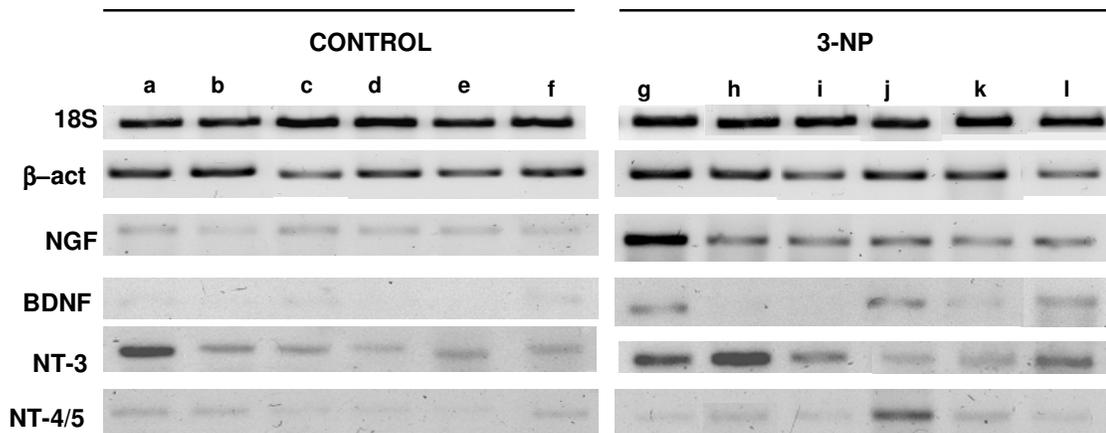
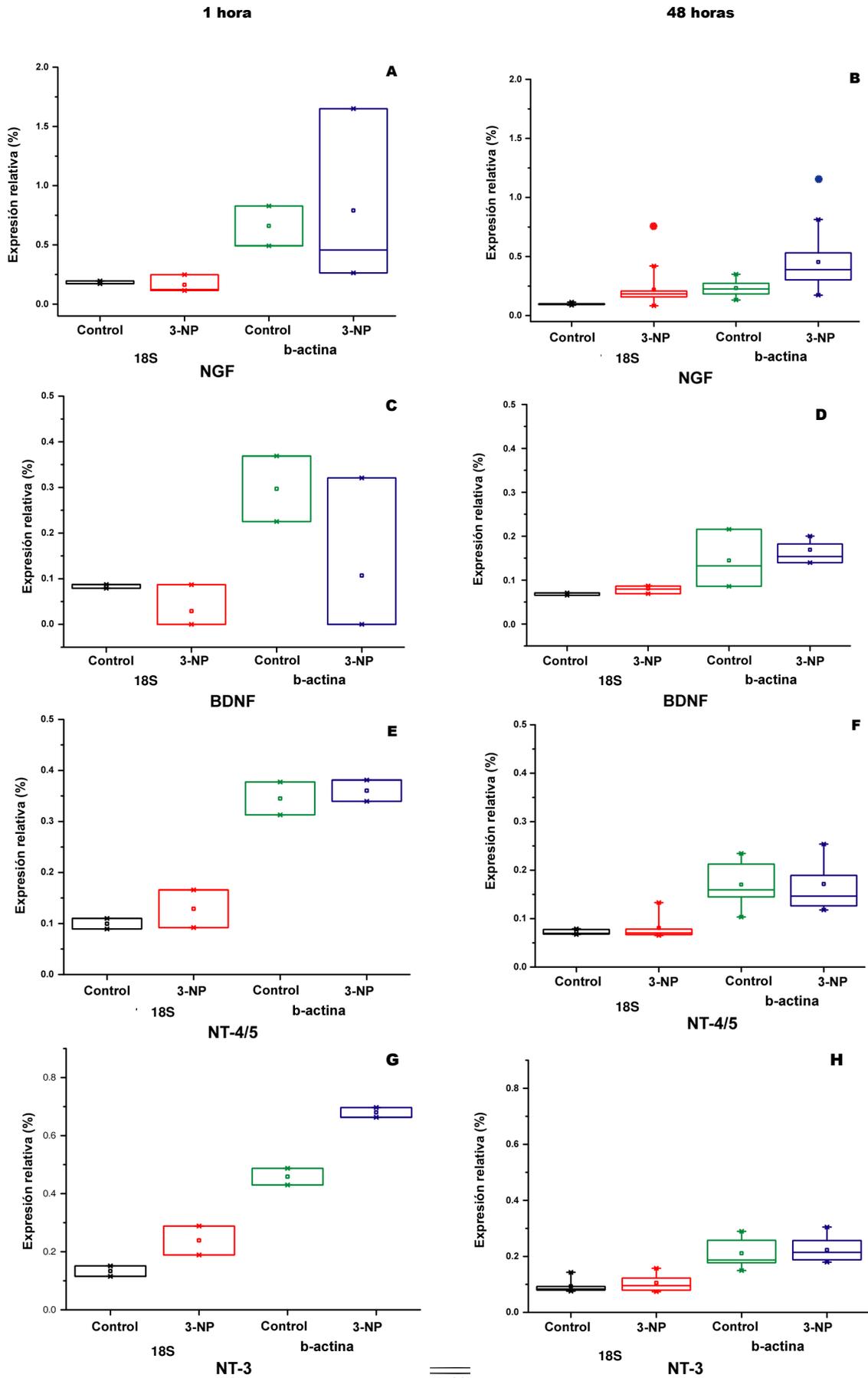


Figura 13. mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo. Se observan los productos de la reacción PCR semicuantitativo (en geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr Green) de los niveles de expresión de mRNA de las neurotrofinas de 12 ratones diferentes 48 hrs. después de la última dosis de 3-NP (n=6, a-f) y del control (n=6, g-l).

El aumento observado en la expresión de mRNA de las neurotrofinas fue estadísticamente significativo sólo para NGF a las 48 horas después de la última dosis de 3-NP, comparado con el grupo control ($t_{12}=2.569$, $P= 0.025^*$, Normalizado con β -actina; $t_{12}=2.656$, $P=0.021^*$, Normalizado con 18S) (Figura 13 y 14, 48 horas). Los niveles de expresión de mRNA de BDNF, NT-3 y NT-4/5, aun cuando tienen a aumentar a las 48 horas después de la última dosis, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con 3-NP y el grupo control (Normalizados con β -actina: $t_5=0.684$, $P= 0.524$, $t_{11}=0.429$, $P=0.676$ y $t_{12}=0.0468$, $P=0.963$, respectivamente; estas mismas neurotrofinas normalizadas con el 18S tampoco muestran cambios significativos: $t_5=2.229$, $P= 0.076$, $t_{11}=-0.066$, $P=0.948$ y $u= 22$, $P=0.8518$, respectivamente; prueba de t o de Mann Whitney) (Figura 14, 48 horas).

Figura 14 (Página 41). Porcentajes de expresión de mRNA de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo. Box Plots de porcentajes de expresión relativa de las neurotrofinas, obtenidos por densitometría y normalizados con la expresión de los genes endógenos 18s y β -actina. Pueden observarse los niveles de expresión relativa a la hora ($n=3$ por grupo experimental, izquierda) y a las 48 horas ($n=6$ por grupo experimental, derecha) después de la última dosis de tratamiento de las neurotrofinas NGF (A y B*), BDNF (C y D), NT-4/5 (E y F) y NT-3 (G y H), comparando a su vez los niveles de expresión normalizados con 18s (Control, negro y 3-NP, rojo) y con β -actina (Control, verde y 3-NP, azul).



PCR semicuantitativo: Los mRNA de los receptores para las neurotrofinas no presentan cambios de expresión ante un daño neurodegenerativo.

Los resultados obtenidos de los mRNA de los receptores para neurotrofinas de 6 ratones diferentes por grupo experimental no mostraron cambios en los niveles de expresión entre el grupo tratado con 3-NP y el grupo control, tanto a 1 hora como a 48 horas después de la última dosis (Figuras 15 y 16). En el análisis estadístico no existen diferencias significativas para ningún receptor, normalizados tanto con β -actina como con 18S Ribosomal (Figura 15). Cabe resaltar que sus niveles de expresión son más altos que los de las neurotrofinas y que, probablemente por la calidad del RNA, no obtuvimos resultados de todas las muestras; además los receptores Trk A y p75 no fueron observados por PCR semicuantitativo 48 horas después de la última dosis.

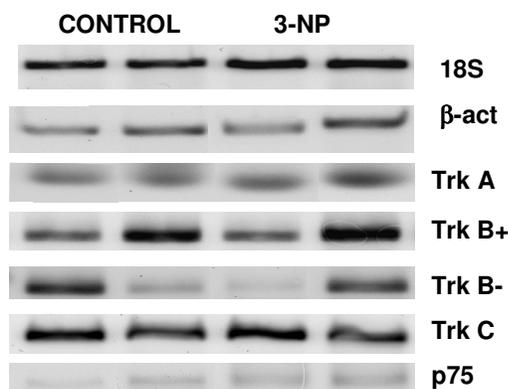


Figura 15. mRNA de receptores en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo. Se observan los productos de la reacción PCR semicuantitativo (en geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr Green) de los niveles de expresión de mRNA de los receptores de 4 ratones diferentes (grupo control n=2, grupo experimental n=2) 1 hora después de la última dosis de 3-NP y del control.

Los niveles de expresión de mRNA después de la última dosis DE 3-NP fueron altos para todos los receptores, pero sin diferencias significativas entre el grupo control y el tratamiento con 3-NP, normalizados tanto con β -actina como con 18S Ribosomal (Normalizados con 18S: Trk A, $t_2= 1.158$, $P= 0.3664$; Trk B+, $t_2=0.4124$, $P= 0.7201$; Trk B-, $t_2= 0.4207$, $P=0.7149$; Trk C, $t_2= 0.1593$, $P= 0.888$; p75, $t_2= 1.310$, $P= 0.3206$; Normalizados con β -actina: Trk A, $t_2= 1.243$, $P= 0.3398$; Trk B+, $t_2=0.8868$, $P= 0.4688$; Trk B-, $t_2= 0.1385$, $P=0.9025$; Trk C, $t_2= 0.1914$, $P= 0.866$; p75, $t_2= 1.654$, $P= 0.2399$; prueba de t) (Figuras 15 y 17, 1 hora).

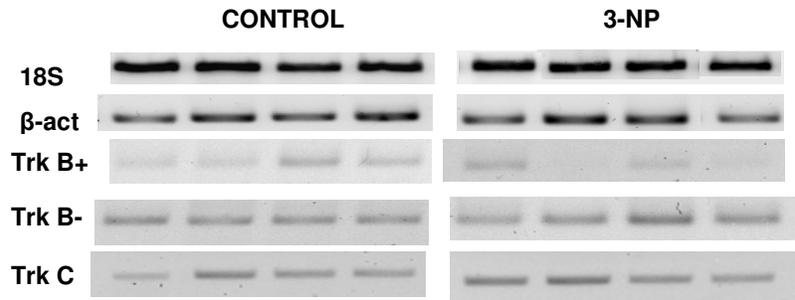
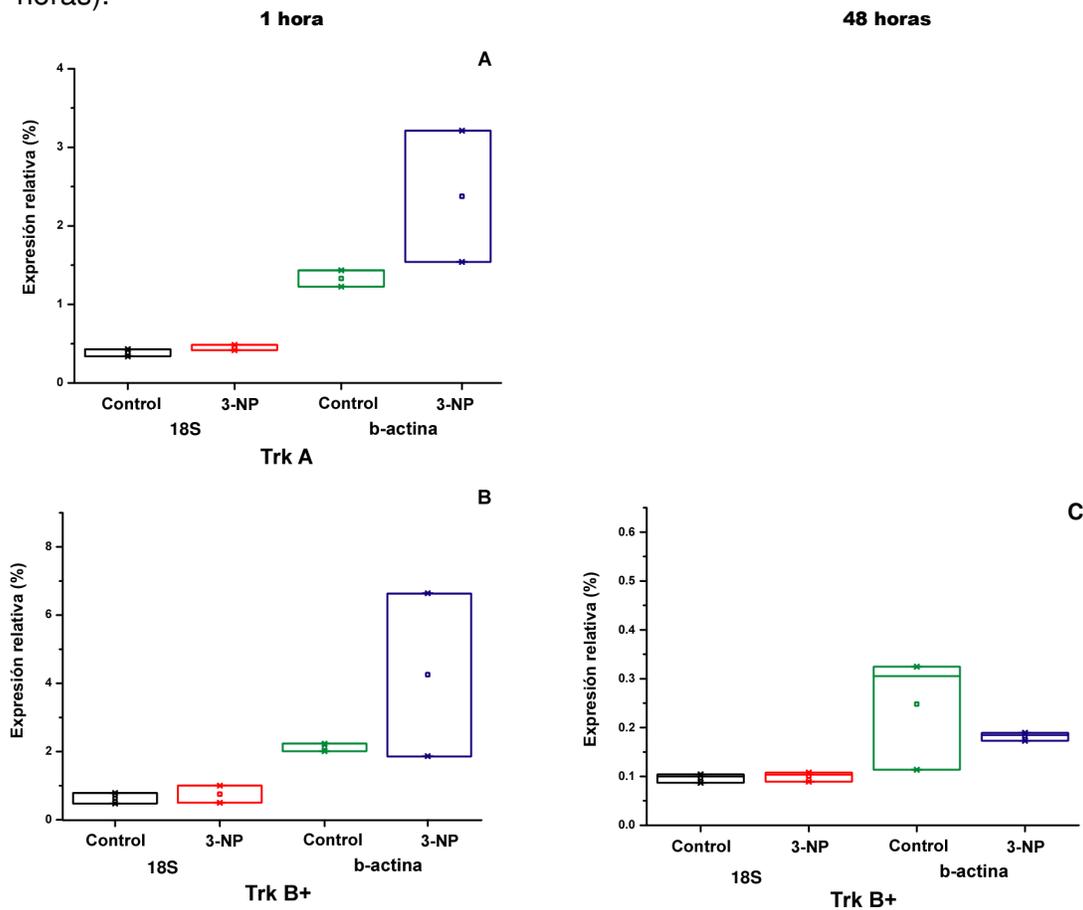


Figura 16. mRNA de receptores en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo. Se observan los productos de la reacción PCR semicuantitativo (en geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr Green) de los niveles de expresión de mRNA de los receptores de 4 ratones diferentes 48 hrs. después de la última dosis de 3-NP y del control.

Los niveles de expresión de mRNA de los receptores tampoco mostraron cambios después de 48 horas del tratamiento con 3-NP, normalizados tanto con β-actina como con 18S Ribosomal (Normalizado con β-actina: Trk B+, $u=3$, $P=0.7$; Trk B-, $t_{10}=0.436$, $P=0.672$; Trk C, $t_{10}=0.611$, $P=0.555$; Normalizados con 18S: Trk B+, $t_4=0.425$, $P=0.693$; Trk B-, $u=9$, $P=0.179$; Trk C, $t_{10}=1.674$, $P=0.125$; prueba de t o de Mann Whitney) (Figuras 16 y 17, 48 horas).



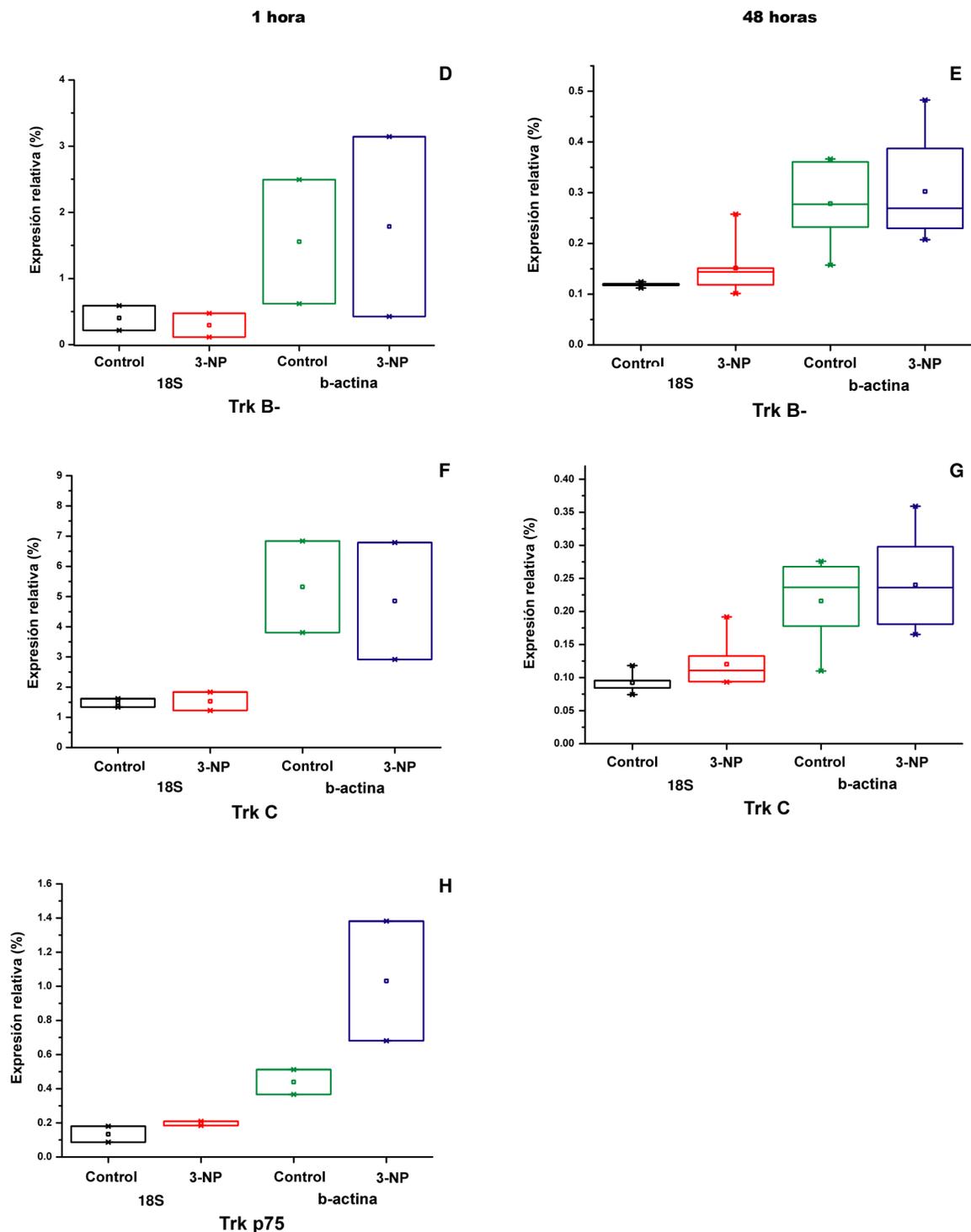


Figura 17 (Páginas 43-44). Porcentajes de expresión de mRNA de receptores de neurotrofinas en tejido estriatal ante un daño neurodegenerativo. Box Plots de porcentajes de expresión relativa de los receptores a neurotrofinas, obtenidos por densitometría y normalizados con la expresión de los genes endógenos 18s y β -actina. Pueden observarse los niveles de expresión relativa a la hora (izquierda) y a las 48 horas (derecha) después de la última dosis de tratamiento de los receptores Trk A (A), Trk B+ (B y C), Trk B- (D y E), Trk C (F y G) y p75 (H), comparando a su vez los niveles de expresión normalizados con 18s (Control, negro y 3-NP, rojo) y con β -actina (Control, verde y 3-NP, azul). Bajo ninguna condición se observaron cambios significativos.

PCR en tiempo real: Cambios en la expresión de mRNA de neurotrofinas y de sus receptores.

Con el fin de obtener resultados que nos permitieran observar cambios más sutiles en los niveles de expresión de mRNA de las neurotrofinas y sus receptores, y debido al poco RNA con el que se contaba realizamos amplificación del material en tiempo real. Además, al igual que con PCR semicuantitativa (o punto final), evaluamos su expresión en dos tiempos distintos: a una hora después de la última dosis (en donde aún la toxina esta causando su efecto) y 48 horas después (dando al organismo un “respiro” al daño causado). Se observaron cambios estadísticamente significativos para p75 a la hora después de la última dosis y para BDNF, NT-3, Trk A, Trk C y p75 a las 48 horas después de la última dosis (ver más adelante, Figuras 19B, 20B, 24B, 25B, 26A y 26B).

Para el análisis de los datos se realizó la cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando solamente como gen de referencia 18S Ribosomal (18S) para normalizar la expresión, ya que mediante PCR semicuantitativo fue el gen que resultó más estable y con niveles altos de expresión.

El método $2^{-\Delta\Delta CT}$ expresa la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión de un gen en estudio, correspondiente a la proporción obtenida de la relación entre los valores CT de la muestra problema y los valores CT del control, tomando de referencia los valores CT de uno o más genes endógenos (Vinueza-Burgos, 2009). El valor de CT corresponde al ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo, determinando así, el ciclo inicial de amplificación, que es inversamente proporcional al número de copias inicial.

NGF y su receptor Trk A

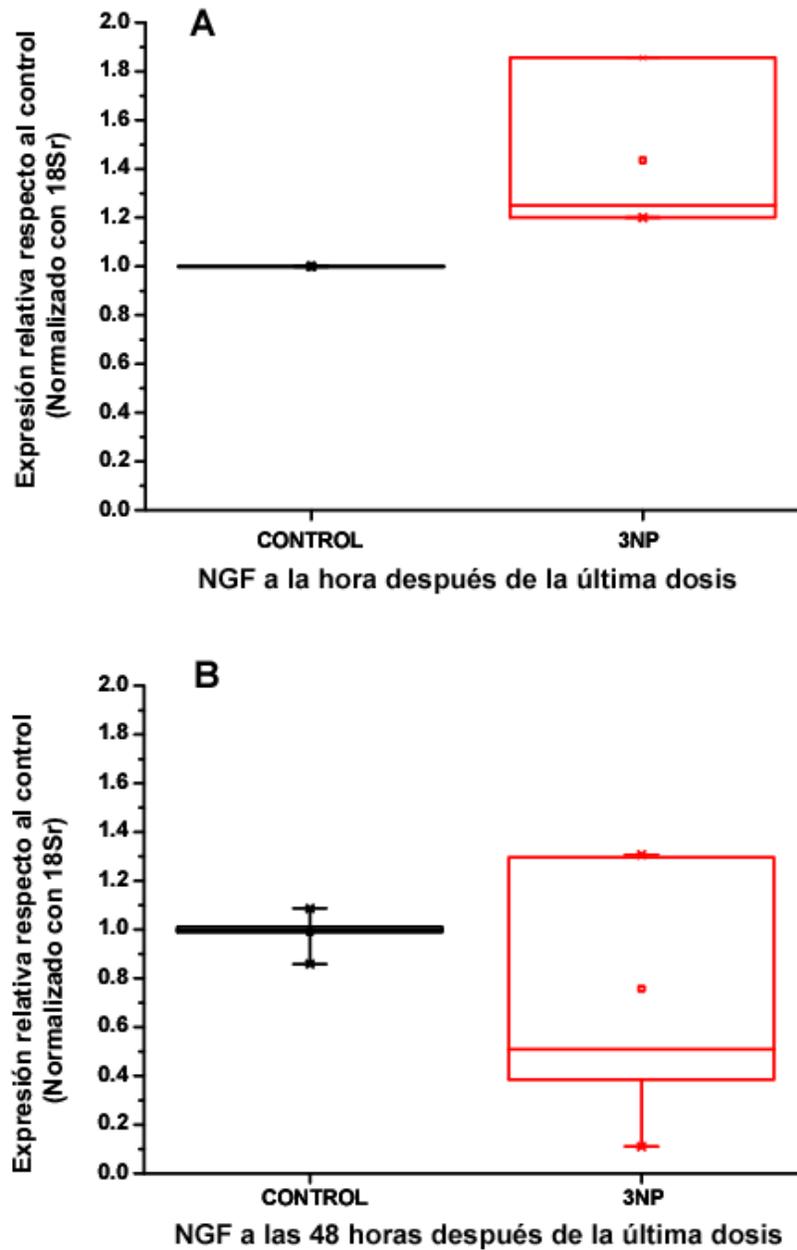


Figura 18. Box plot de la expresión relativa de mRNA de NGF obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=-1.599$, $P=0.208$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($u=11$, $P=0.537$).

Los datos obtenidos muestran una tendencia al aumento de mRNA_{NGF} a la hora después de la última dosis de 3-NP (~40%) y una disminución a las 48 horas (~28%), en comparación al control. Al hacer el análisis estadístico, no existen diferencias significativas entre los grupos tanto a la hora ($t_3=-1.599$, $P=0.208$, prueba de t) como a las 48 horas ($u=11$, $P=0.537$, Mann-Whitney) después de la última dosis (Figura 18). Mientras que para su receptor Trk A hubo tendencia a aumentar los niveles de mRNA_{Trk A} ante el daño, después de 1 hora de la última dosis (~90%), siendo éste aumento estadísticamente significativo a las 48 horas con el tratamiento de 3-NP respecto al control ($u=0$, $P=0.011^*$, ~90%) (Figura 19).

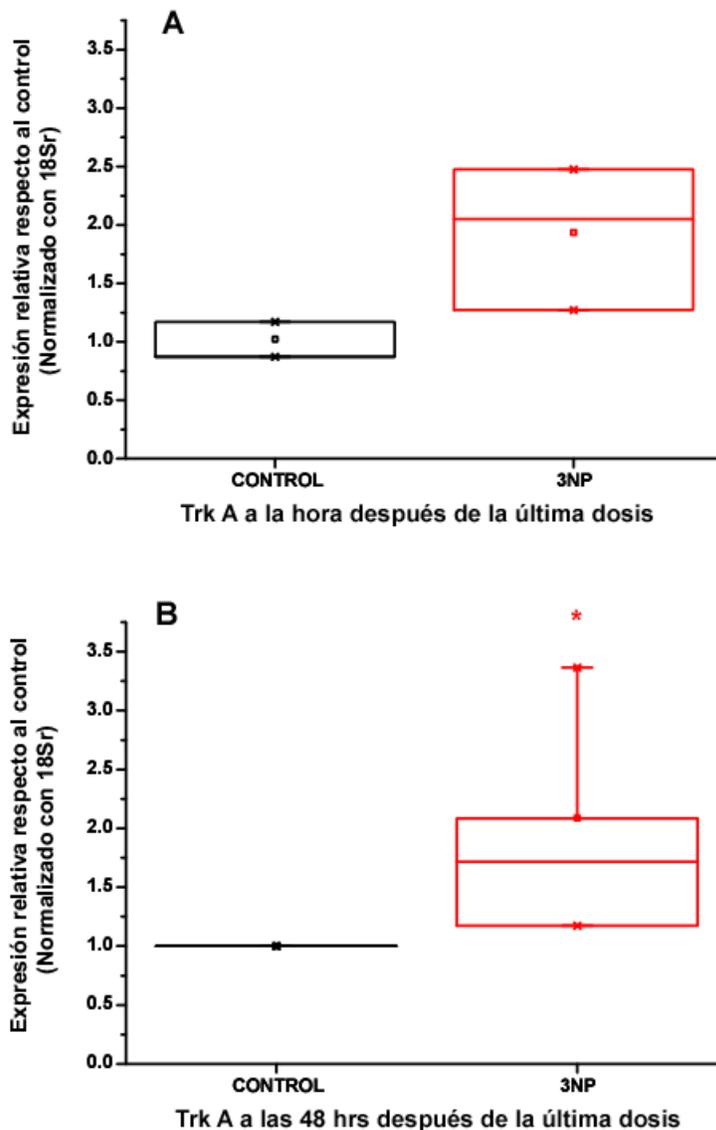


Figura 19. Box plot de la expresión relativa de mRNA de Trk A obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=-1.948$, $P=0.147$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($u=0$, $P=0.011^*$).

BDNF, NT-4/5 y su receptor Trk B.

Los niveles de expresión de mRNA_{BDNF} mostraron un ligero aumento ante el daño con 3-NP a la hora después de la última dosis (~65%), que no fue estadísticamente significativo respecto al control ($t_3=-1.472$, $P=0.237$, prueba de t). Sin embargo, 48 horas después de la última dosis los niveles de mRNA_{BDNF} disminuyeron ~35% respecto al control, siendo esta baja en la expresión estadísticamente significativa ($t_8=3.041$, $P=0.016^*$, prueba de t) (Figura 20).

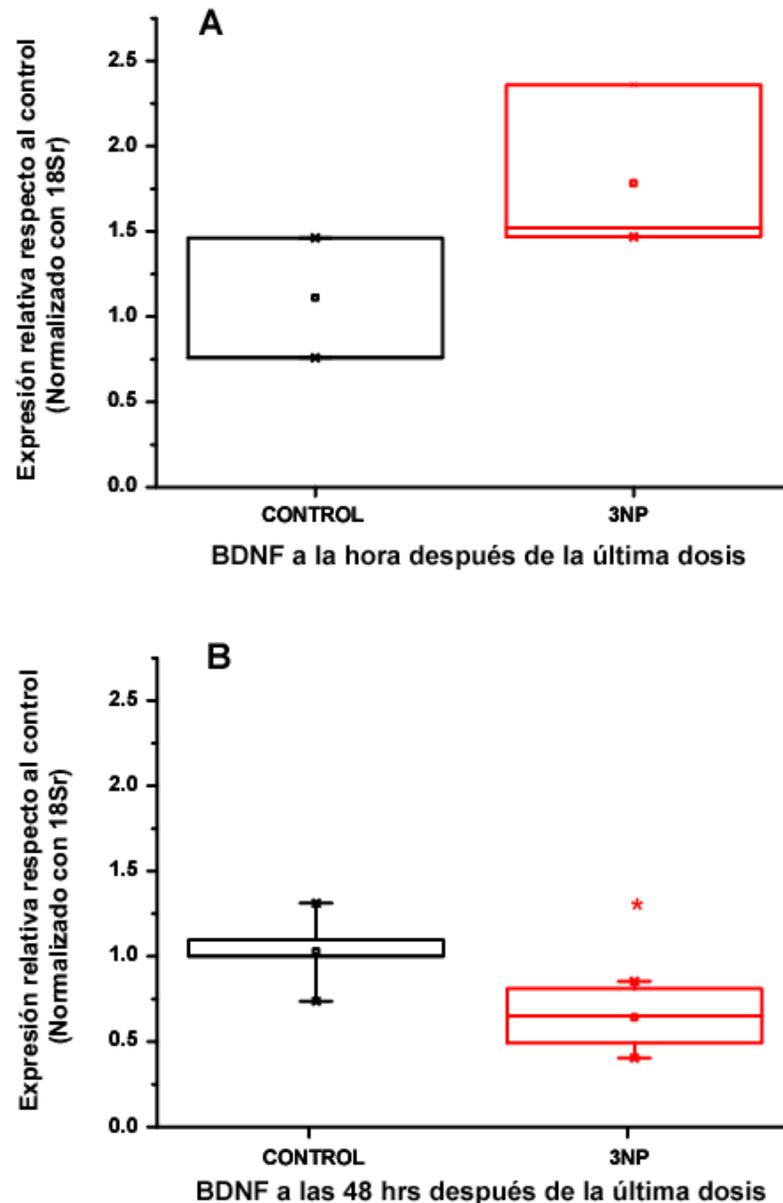


Figura 20. Box plot de la expresión relativa de mRNA de BDNF obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=-1.472$, $P=0.237$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($t_8=3.041$, $P=0.016^*$).

En el caso de la neurotrofina NT-4/5, aún cuando no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el tratado con 3-NP a la hora ni a las 48 horas después de la última dosis ($t_3=2.894$, $P=0.063$ y $t_9=-1.144$, $P=0.282$, respectivamente, prueba de t), se observó una tendencia a disminuir después de una hora ($\sim 30\%$) y a aumentar después de 48 horas ($\sim 29\%$) (Figura 21).

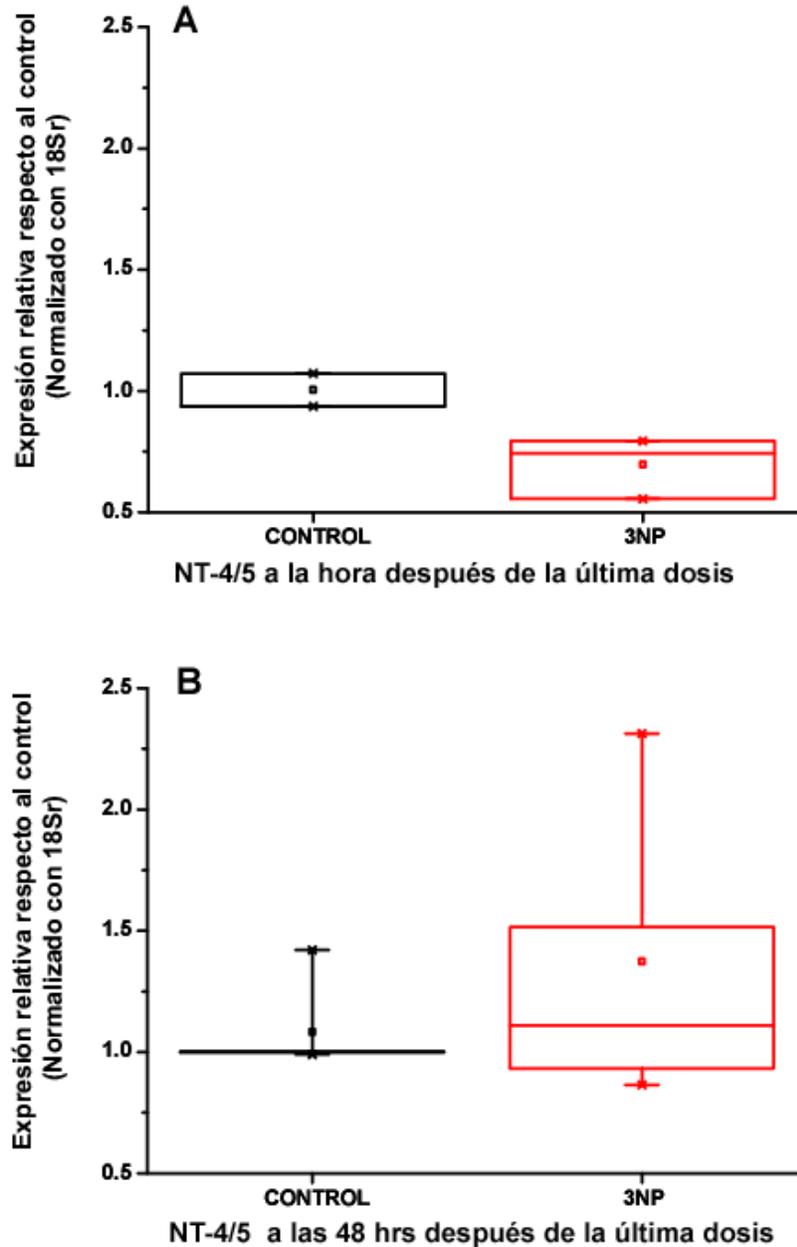


Figura 21. Box plot de la expresión relativa de mRNA de NT-4/5 obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=2.894$, $P=0.063$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($t_9=-1.144$, $P=0.282$).

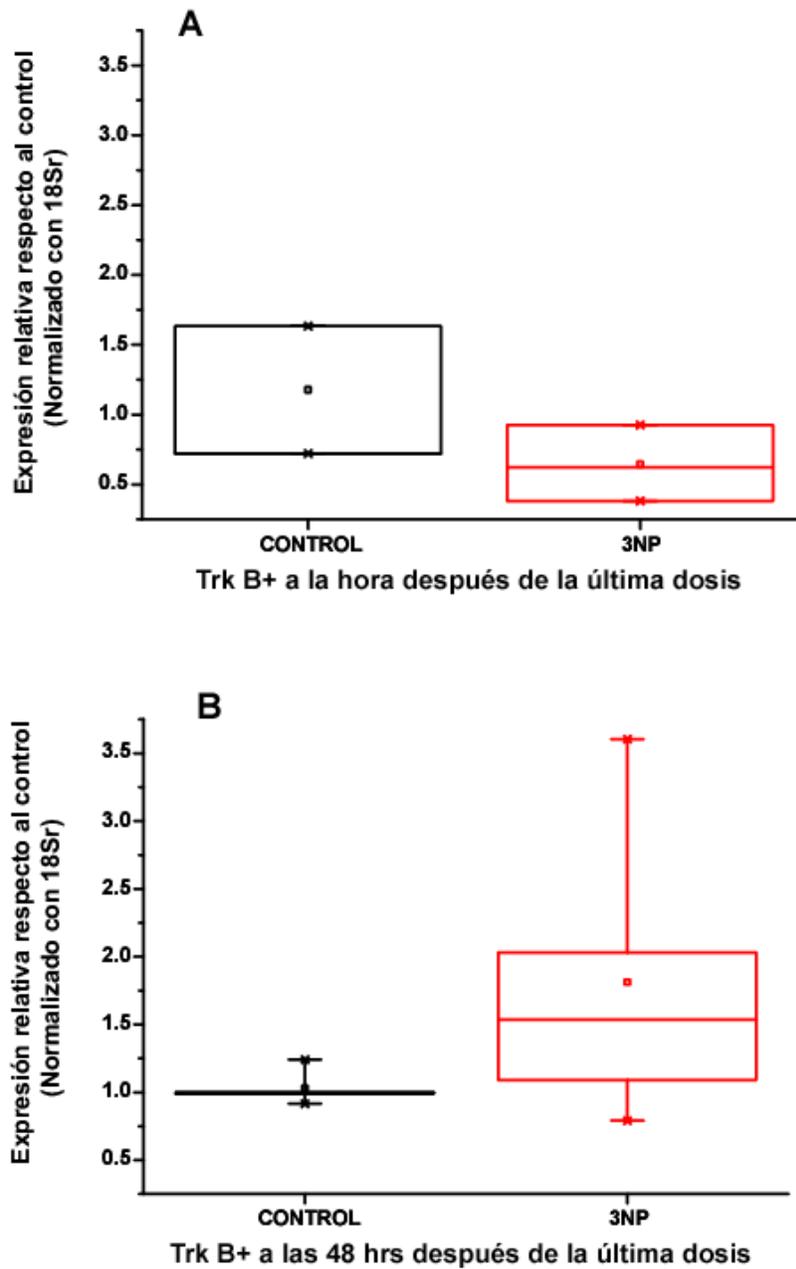


Figura 22. Box plot de la expresión relativa de mRNA de Trk B+ obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=1.348$, $P=0.270$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($u=6$, $P=0.209$).

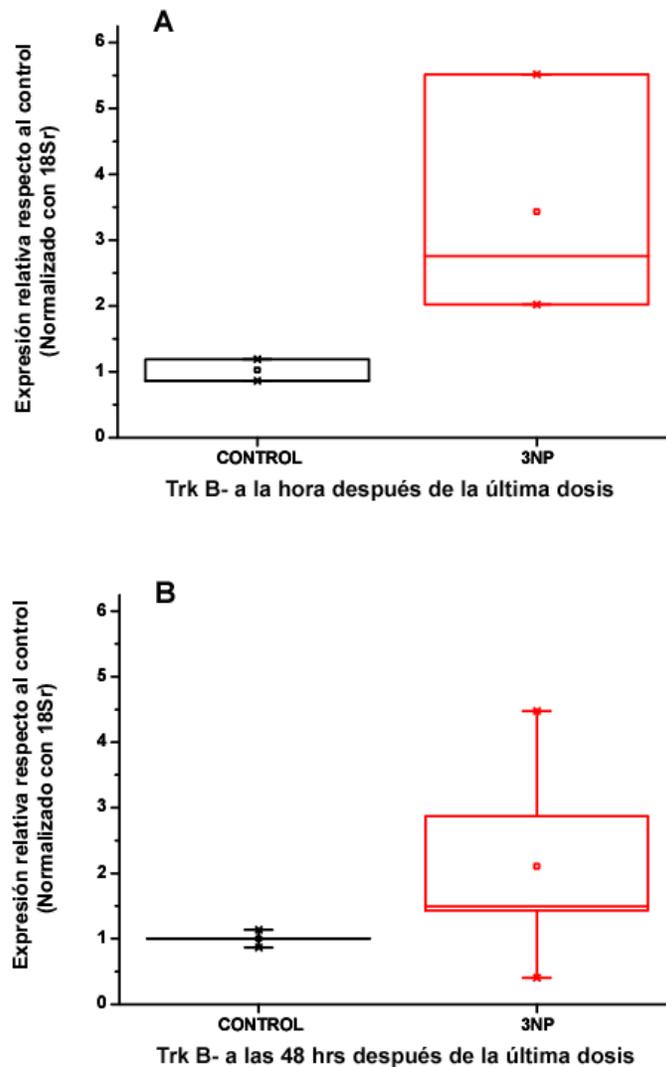


Figura 23. Box plot de la expresión relativa de mRNA de Trk B- obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=1.743$, $P=0.180$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($u=5$, $P=0.08$).

La expresión del receptor Trk B de ambas neurotrofinas (BDNF y NT-4/5) fue evaluada tanto para su isoforma completa (Trk B+) como para una isoforma truncada (Trk B-). La isoforma completa no tuvo diferencia significativa en la expresión de mRNA_{Trk B+} entre el control y el tratamiento con 3-NP a la hora ($t_3=1.348$, $P=0.270$, prueba de t) ni a las 48 horas ($u=6$, $P=0.208$, prueba de Mann Whitney) después de la última dosis; sin embargo mostró tendencias a disminuir (~50%) tempranamente y a aumentar (~75%) como una respuesta tardía después del daño (Figura 22). Por el contrario, la tendencia de la expresión de mRNA de la isoforma truncada fue a aumentar desde una hora después de la última dosis (hasta casi un 300% en algunas muestras) y

continúo así después de 48 horas (~200% en algunas muestras), pero sin diferencias estadísticas entre el grupo control y el tratamiento ($t_3=-1.743$, $P=0.180$ y $u=5$, $P=0.08$, respectivamente, prueba de t y de Mann Whitney) (Figura 23).

NT-3 y su receptor Trk C

Los niveles de mRNA_{NT-3} tuvieron un patrón similar a los de la neurotrofinas NT-4/5; 1 hora después de la última dosis de 3-NP mostraron una tendencia a disminuir (~45%, sin diferencias estadísticas, $t_3=2.617$, $P=0.079$, prueba de t) y aumentaron (~47%) de forma tardía ante el daño causado, siendo este último un aumento significativo respecto al control ($t_8=-2.365$, $P=0.046$, prueba de t) (Figura 24).

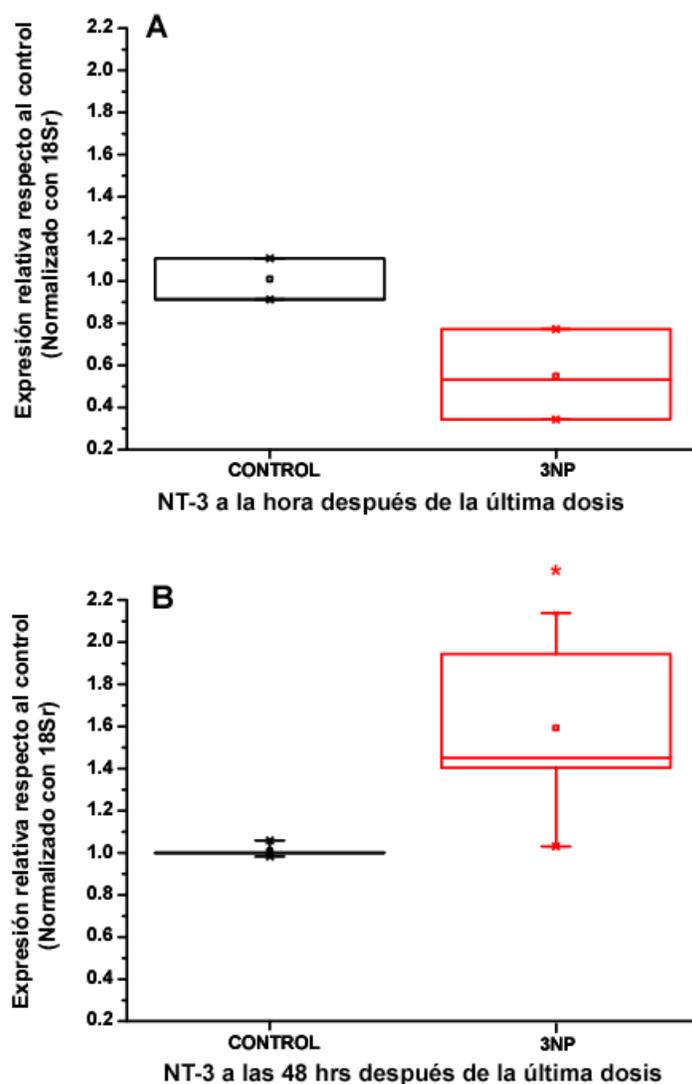


Figura 24. Box plot de la expresión relativa de mRNA de NT-3 obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=2.617$, $P=0.079$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($t_8=-2.365$, $P=0.046^*$).

Los niveles de expresión de mRNA_{Trk C} fueron muy similares después de una hora de la última dosis del daño causado por el 3-NP a los niveles normales ($t_3=0.204$, $P=0.852$, prueba de t , $u= 3$, $P= 0.3$, prueba de Mann Whitney), pero aumentaron (~167%) de forma significativa después de 48 horas como una respuesta tardía al daño ($t_8=-4.204$, $P=0.003$, prueba de t) (Figura 25), similar a lo que observamos con NT-3, la neurotrofinas afín a este receptor (Figura 24).

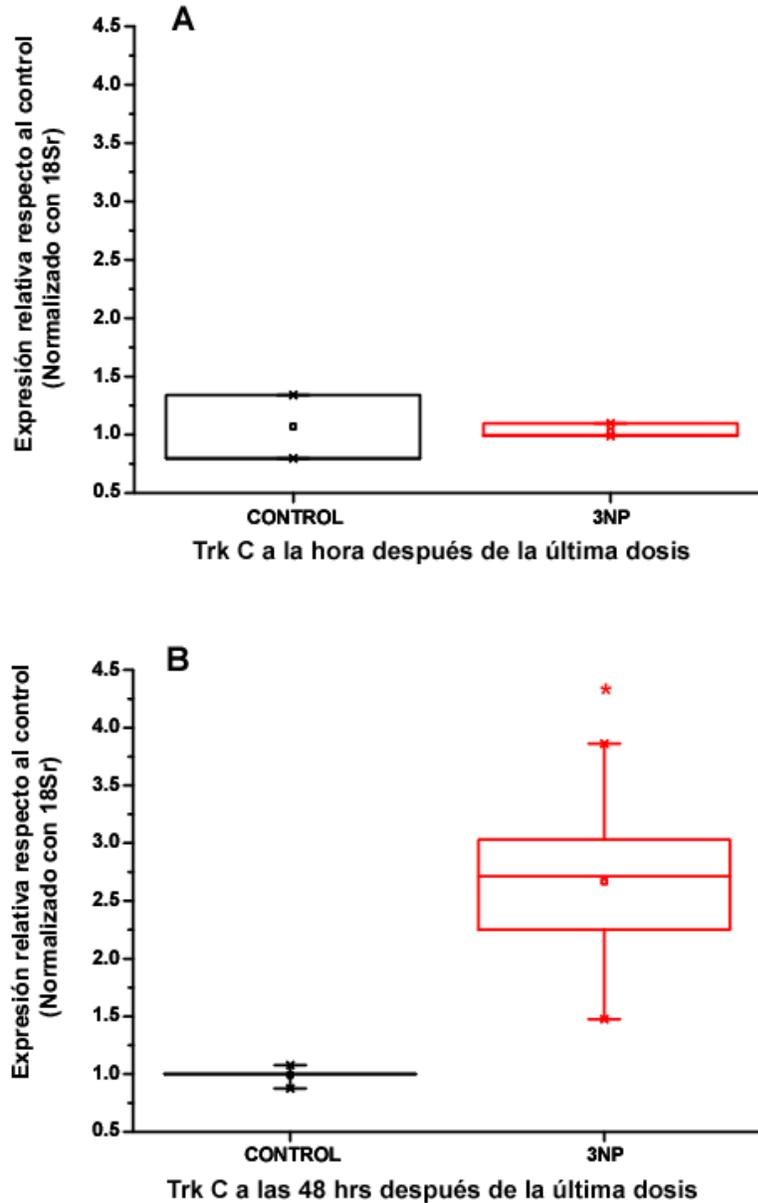


Figura 25. Box plot de la expresión relativa de mRNA de TrkC obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=0.204$, $P=0.852$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($t_8=-4.204$, $P=0.003^*$).

El receptor p75

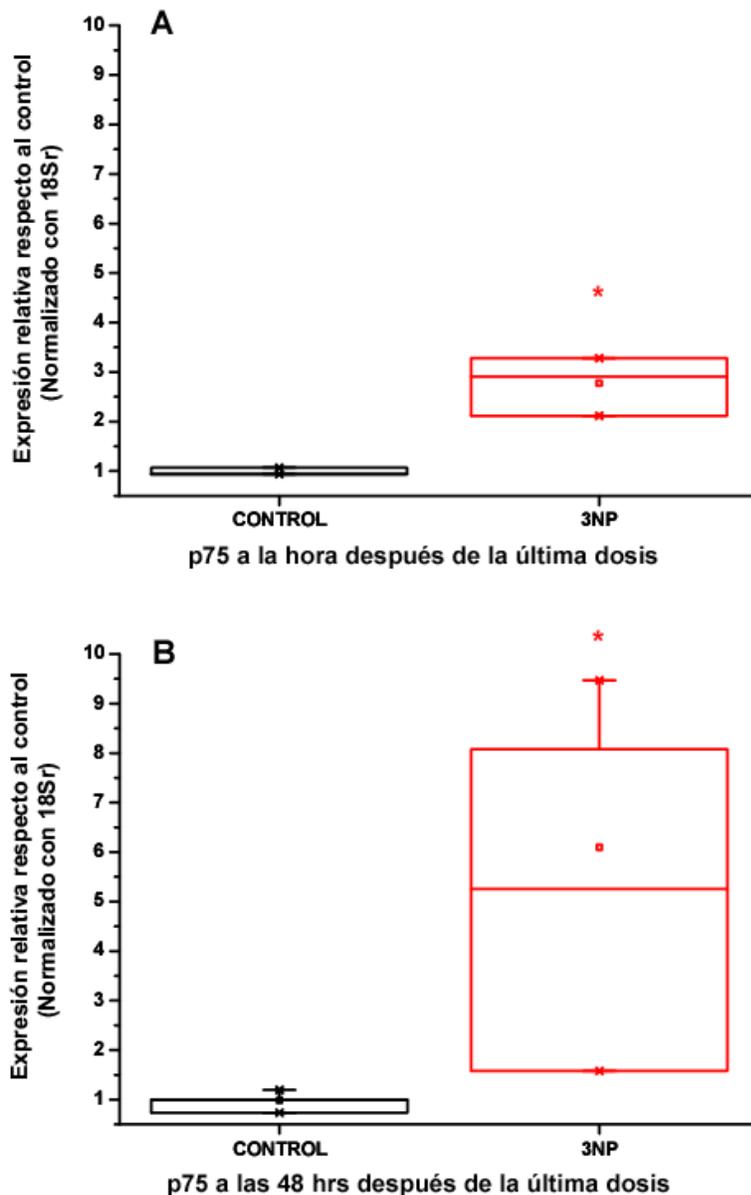


Figura 26. Box plot de la expresión relativa de mRNA de p75 obtenida por qPCR (A) a la hora después de la última dosis de 3-NP respecto al control ($t_3=-3.973$, $P=0.029^*$) y (B) a las 48 horas después de la última dosis ($t_6=-2.931$, $P=0.026^*$).

La expresión de mRNA_{p75} aumentó significativamente ante el daño causado por la toxina 3-NP 1 hora después de la última dosis (~270%) ($t_3=-3.973$, $P=0.029$, prueba de t) y fueron aún mayores después de 48 horas (~600%) ($t_6=-2.931$, $P=0.026$, prueba de t , $u=0$, $P=0.02$, prueba de Mann Whitney) (Figura 26).

En el cuadro 5 se presenta un resumen de los cambios de la expresión de mRNA de las neurotrofinas y de sus receptores después del daño causado por la administración de 3-NP a la hora y a las 48 horas después de la última dosis, en comparación con la expresión en condiciones normales (grupo control), todos los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real y normalizados con el gen 18S Ribosomal.

Neurotrofina	Cambio en la expresión (después de la última dosis)		Receptor	Cambio en la expresión (después de la última dosis)	
	1 hora	48 horas		1 hora	48 horas
NGF	↑	↓	Trk A	↑	↑*
BDNF	↑	↓*	Trk B+	↓	↑
NT-3	↓	↑	Trk B-	↑	↑
NT-4/5	↓	↑*	Trk C	=	↑*
			P75	↑↑*	↑↑*

Cuadro 5. Cambios en la expresión de mRNA de las neurotrofinas y sus receptores después del tratamiento con 3-NP en comparación con el grupo control (↑, aumenta; ↑↑, mayor aumento; ↓, disminuye; *, cambio estadísticamente significativo).

Discusión.

El descubrimiento de que las neurotrofinas participan en vías de señalización relacionadas con la muerte, la sobrevivencia y la regeneración de diferentes poblaciones neuronales adultas, a través de la activación de sus receptores específicos, abrió un panorama más amplio sobre la función de estas moléculas y su estudio se ha vuelto relevante para el entendimiento de diversas patologías, sobre todo por su potencial uso terapéutico, en especial en desórdenes que involucran daños degenerativos (Ho et al., 2001; García, 2007; Tasset, 2009). De esta forma, dilucidar los procesos celulares que se generan en las poblaciones neuronales después de algún daño, constituye el primer paso para pensar en tratamientos futuros con neurotrofinas.

En el presente trabajo, evaluamos la expresión de mRNA de neurotrofinas y sus receptores en el tejido estriatal de ratón y, a partir de un modelo farmacológico murino de la enfermedad de Huntington, determinamos si existen cambios en su expresión después de un daño neurodegenerativo.

Las neurotrofinas presentes a lo largo del desarrollo.

Diversos estudios han mostrado que las neurotrofinas participan durante el desarrollo embrionario y postnatal del SN, en los procesos de diferenciación, sobrevivencia y muerte de poblaciones neuronales, e incluso algunas veces su participación está restringida a estadios específicos de desarrollo. Además su distribución no es homogénea a lo largo del SN y su expresión varía durante el desarrollo postnatal y disminuye en edades adultas (Chao, 2003; Numan et al., 2005; Zermeño et al., 2009).

En el estriado de ratón se han evaluado los niveles de NGF, BDNF, NT-3 y NT-4 por Inmunocitoquímica y Northern blot, encontrando muy baja expresión e incluso algunas de estas moléculas no siempre son detectadas (Numan et al., 2005; Zermeño et al., 2009). Por esta razón, en el presente trabajo evaluamos la expresión del mRNA de las cuatro neurotrofinas en el estriado de ratón en

diferentes edades postnatales (10, 21 y 42 días), principalmente para conocer: a) si se expresan, b) los patrones de expresión durante el desarrollo y c) cuáles son los niveles de expresión que podríamos encontrar en el adulto (42 días) para nuestros experimentos posteriores.

Mediante PCR semicuantitativo encontramos mRNA de todas las neurotrofinas en todas las edades evaluadas (Figuras 5 y 6), con una expresión diferencial de BDNF. Si partimos del hecho que la presencia de mRNA significa que el gen está “prendido” y que por lo tanto se está sintetizando la proteína porque la célula la necesita, entonces la expresión que observamos sugiere que las neurotrofinas si tienen participación, tal como se ha descrito en estudios previos, en el desarrollo y buen funcionamiento neuronal del estriado.

La disminución de la expresión de mRNA_{BDNF} que observamos concuerda con otros estudios realizados (Hofer et al., 1990; Numan et al., 2005; Zermeño et al., 2009). Dicha reducción en la producción de BDNF en el núcleo estriado no esta relacionada con su intervención en las neuronas de esta región; de hecho, se ha mostrado que mantiene la sobrevivencia de las neuronas espinosas del núcleo estriado (Zuccato et al., 2001). La razón a este proceso es que, en el adulto, el BDNF presente en el estriado proviene de las células piramidales de la corteza cerebral, donde es sintetizado (Fusco et al., 2003), por lo que en las células puede encontrarse la proteína pero no necesariamente el mRNA. De hecho, aún no hay datos experimentales que documenten la síntesis de BDNF en el estriado, pero esto puede constituir una pregunta futura por resolver.

Para el caso de NGF, nuestros resultados concuerdan con otros estudios en donde se ha descrito que los niveles de mRNA son altos entre los 2 y 30 días postnatales y que en general se mantiene constante durante el desarrollo postnatal y en edades adultas (Mobley et al, 1985). Al igual que en nuestros resultados, los niveles de mRNA_{NGF} son los más altos en relación al resto de las neurotrofinas; de hecho, dados sus niveles de expresión esta neurotrofina ha sido utilizada en algunos estudios en el estriado como control positivo de expresión (Zermeño et al., 2009).

Las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 estuvieron presentes en todas las edades evaluadas y no presentaron cambios significativos en su expresión a nivel mRNA en los tiempos. Sin embargo, en estudios previos realizados en el laboratorio (Zermeño et al., 2009) se observó una expresión diferencial de las proteínas por inmunolocalización. A diferencia de nuestros resultados, por inmunolocalización no se detectó NT-4/5 a los 10 días postnatales, concordando con otros estudios en los que se muestra que esta neurotrofina es expresada en bajas cantidades durante el desarrollo postnatal y que incrementa en roedores adultos (Ip et al., 1992; Timmusk et al., 1993). La razón por la cual nuestros resultados difieren puede ser porque los niveles de mRNA son insuficientes para la traducción de la proteína y es hasta edades tardías cuando puede verse la proteína, aún cuando el mRNA ya esté presente en edades más tempranas; de hecho, a pesar de que no hay diferencias significativas, al observar la Figura 5 los niveles de mRNA_{Nt-4/5} parecen ser menores a los 10 días postnatales, en comparación con el resto de las edades evaluadas. En el caso de NT-3 a nivel inmunocitoquímico se observó un cambio en la localización de la proteína: a edades tempranas una expresión alta en las fibras corticoestriatales y a edades adultas en los somas de las neuronas. Dado que en nuestro caso, para la obtención del mRNA, tomamos todo el tejido estriatal no podemos saber cómo y en donde estaba distribuido, por lo que es posible que, aún cuando nosotros no vemos cambios en la expresión mediante PCR semicuantitativo, la neurotrofina (tanto la proteína como el mRNA) esté transportándose de las fibras corticoestriatales a las neuronas del estriado y/o que se esté produciendo ahí mismo. Además, no podemos descartar que las diferencias en los cambios de expresión entre mRNA y proteína se deban al procesamiento de la muestra, a la sensibilidad de las técnicas o a cambios biológicos.

En general, nuestros resultados son útiles para conocer los niveles que podemos encontrar en el estriado de ratones adultos en condiciones normales, ya que, aún cuando las neurotrofinas pueden provenir de otras regiones del cerebro, sabemos ahora que si se expresan (en cantidades pequeñas, si se

compara, por ejemplo, con los niveles de los genes endógenos) en el núcleo estriado, lo que nos puede sugerir que participan en la actividad celular de esta región y que pueden verse alteradas en procesos de daño producidos por la degeneración del sistema nervioso. En relación a los resultados presentados, realizar otras pruebas como hibridación *in situ* y buscar los receptores a neurotrofinas durante el desarrollo pueden brindar una idea más amplia de los patrones de expresión y las poblaciones neuronales específicas sobre las que actúan a lo largo del desarrollo. Además, el uso de otras técnicas como FISH o microarreglos que permitan evaluar los patrones de expresión de genes involucrados en etapas tempranas de desarrollo postnatal y relacionados con factores neurotróficos y su cambio en los procesos de plasticidad podría brindarnos un panorama más amplio en relación a la acción que ejercen las neurotrofinas.

La expresión en tejido estriatal de mRNA de neurotrofinas y sus receptores después del daño por 3-NP.

Si bien es cierto que las neurotrofinas fueron originalmente identificadas como importantes mediadores de la sobrevivencia neuronal durante el desarrollo; en las últimas décadas, sus funciones han sido extendidas al control de muchos procesos biológicos, tales como, la regulación del crecimiento axonal y dendrítico, la formación y función de sinapsis, la migración y proliferación celular y la sobrevivencia de neuronas adultas en diferentes condiciones patológicas; y estas funciones son reguladas por la unión a su receptor específico Trk (Segal, 2003; Cui, 2006). El concepto de que la expresión de las neurotrofinas en el cerebro adulto es regulada en respuesta a un daño fue sugerido al demostrar que los niveles de mRNA_{NGF} incrementan después de una lesión electrolítica. En adición se observó que en neurodegeneración la expresión de neurotrofinas se altera (Isackson, 1995) y que el decremento en la expresión de los receptores Trk está asociado con la pérdida celular (Hennigan et al., 2007).

Dado que en un daño neurodegenerativo, como el observado en la enfermedad de Huntington, las neuronas están sometidas a estímulos intra- y extracelulares que desencadenan muerte celular, es posible que la expresión y el aporte de neurotrofinas sea regulado continuamente y durante todo el desarrollo de la enfermedad de forma diferencial con el fin de brindar neuroprotección; asimismo, es posible que la acción que ejercen sea diferente entre poblaciones neuronales, lo que se traduce en una expresión diferencial también de sus receptores (García, 2007). Por esta razón, evaluamos su expresión en dos tiempos de daño: a la hora y a las 48 horas después de la última dosis de 3-NP. En nuestro laboratorio, se tiene evidencia de que 48 horas después de la última dosis de 3-NP puede observarse muerte neuronal causada por la inhibición crónica con la toxina, y se piensa que en ese tiempo el 3-NP es desechado del organismo y puede llevarse a cabo un recambio de los componentes celulares inhibidos, mientras que 1 hora después de la última dosis, la inhibición generada sobre la deshidrogenasa succínica que se encuentra la mitocondria sigue presente en el organismo.

La respuesta neuronal inmediata.

A 1 hora después de la última dosis los cambios que se observan, no son estadísticamente significativos, tanto para las neurotrofinas como para sus receptores (a excepción de p75 que aumentó considerablemente, observado con la técnica de tiempo real). Sin embargo, aún en las pequeñas variaciones, podemos observar un cambio no significativo en la expresión, lo que sugiere que las células si están respondiendo de manera temprana al daño -aún cuando no sea significativo- con una regulación en los niveles de las neurotrofinas y de sus receptores. Otros estudios han evaluado la regulación de las neurotrofinas en el estriado a diferentes tiempos. Canals y colaboradores, (1998), observaron que, en el estriado, los cambios en el mRNA de las diferentes neurotrofinas que se generan desde el inicio de la lesión, son significativos hasta después de 6 horas y que son diferencialmente regulados dependiendo del receptor a glutamato estimulado para generar excitotoxicidad. También en neuronas del ganglio de la raíz dorsal Shen y colaboradores,

(1999), observaron que NGF y BDNF aumentan su expresión significativamente hasta después de 6 horas de una lesión.

Este mismo patrón lo observamos tanto con PCR semicuantitativa como con PCR en tiempo real, lo que demuestra que ambas técnicas fueron manejadas correctamente y que, en este caso, ambas resultaron útiles para conocer los niveles de expresión.

Efecto de la neurodegeneración a largo plazo sobre los niveles de mRNA de neurotrofinas y sus receptores.

De manera natural, tal como lo observamos en el control, la expresión de mRNA de neurotrofinas y sus receptores es baja en el estriado adulto (Segal, 2003). En los resultados obtenidos por PCR semicuantitativa, observamos un ligero aumento en la expresión de las neurotrofinas (Figura 13), siendo estadísticamente significativo sólo para NGF ($P=0.025$) después del tratamiento con 3-NP, comparado con el grupo control (Figura 14). Ya otros estudios han demostrado que la expresión de las distintas neurotrofinas aumenta después de algún daño. Por ejemplo, se ha observado que en un modelo de epilepsia el BDNF y el NGF incrementan en diversas partes del cerebro (Ernfors et al., 2004). Este mismo resultado fue observado después de una lesión excitotóxica con ácido quinolínico (Rocamora, 1994). En hibridación *in situ*, se observó que el BDNF incrementa significativamente después del daño en el estriado, regresando a niveles basales después de un mes (Wong et al., 1997). También se ha reportado que el NT-3, junto con el NGF y el BDNF, aumenta ante un daño al cordón espinal (Qin et al., 2006). En otros tejidos no neuronales, por ejemplo en células de corazón, se ha observado un aumento en la expresión de mRNA tanto de NGF como de BDNF, así como cambios no significativos en la expresión de mRNA de NT-3 (Hiltunen, 2001). En relación al aumento significativo de NGF se ha descrito que diferentes formas de agresión al cerebro, incluida la excitotóxica, inducen la síntesis del NGF (la mayor parte de estos estudios se ha realizado a corto plazo; se desconoce si la síntesis incrementada de NGF persiste pasadas varias semanas de la lesión

(Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004); además, se sabe que en el estriado las neuronas colinérgicas son las principales que producen esta neurotrofina, por lo que en la HD estas neuronas son las que podrían aumentar su expresión, como forma de neuroprotección generando su mantenimiento o sobrevivencia en el estriado ante la neurodegeneración (Shelton y Reichardt, 1986; Mobley et al., 1989; Saporito et al., 1993; Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004).

En general, este incremento puede interpretarse como un mecanismo compensatorio de las células ante el daño causado, en nuestro caso con el 3-NP, es decir, una respuesta de protección basada en un soporte trófico para el mantenimiento de las neuronas. La relevancia fisiológica del aumento en la liberación de neurotrofinas en el proceso neurodegenerativo, puede estar relacionada con su participación en la restauración del árbol dendrítico y del axón, cuya morfología y fisiología se altera en los procesos degenerativos, así como, de forma indirecta, regulando la liberación de hormonas y neurotransmisores o incrementando la liberación de diversas enzimas que participan en el control del metabolismo celular (Isackson, 1995; Asal, 1997). Además es importante considerar que cada neurotrofina podría tener una función importante en el mecanismo de neuroprotección, por lo que su expresión puede verse diferencialmente regulada según las situaciones fisiopatológicas que se presenten (Takeda et al., 1993; Isackson, 1995; Qin et al., 2006), por lo que en algunas circunstancias puede aumentar y en otras disminuir, e incluso aumentar como una respuesta rápida y transitoria, regresando paulatinamente a concentraciones control o por debajo de éstas.

En cuanto a los receptores, su expresión fue más alta que sus ligandos (lo que es de esperarse, ya que independientemente de la región en la que se sintetice la neurotrofina, su acción depende de la presencia de su receptor en las células blanco, en este caso, las neuronas del núcleo estriado) en condiciones normales y no presentaron cambios significativos después del tratamiento con 3-NP (Figuras 16 y 17). Este hecho podría sugerir que la respuesta celular al daño esta basada sólo en la producción de neurotrofinas para estimular o

incrementar una mayor unión a los receptores ya presentes. Sin embargo, dada la sensibilidad de la técnica es probable que los resultados no sean los óptimos (ver más adelante) para evaluar la expresión de mRNA. Por esta razón evaluamos su expresión mediante PCR en tiempo real, técnica que permite evaluar cambios muy sutiles, aún cuando las cantidades de material sean muy pequeñas.

Los resultados obtenidos mediante esta técnica mostraron cambios significativos para las neurotrofinas BDNF y NT-3 y para los receptores Trk A, Trk C y p75, confirmando que la PCR en tiempo real es más sensible a cambios más sutiles para el estudio de pequeñas cantidades de mRNA en el estriado y, por lo tanto, permite diferenciar de una forma más certera los cambios de expresión de mRNA de genes específicos. A continuación haremos referencia a los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real, ya que consideramos son más confiables por las características de la técnica.

- La neurotrofina NGF y su receptor Trk A.

Mediante PCR en tiempo real la expresión de NGF en el estriado no cambia 48 horas después de la última dosis de 3-NP (Figura 18). La diferencia entre estos resultados y los que obtuvimos mediante PCR semicuantitativo puede deberse a que las bandas que observamos mediante este método representan el producto final amplificado, que no siempre corresponde a la cantidad real inicial de mRNA (ver más adelante); mientras que en tiempo real los datos analizados corresponden a la fase exponencial de la reacción, que es proporcional al producto inicial y por lo tanto es más preciso (Applied Biosystems, 2009). De esta manera, es posible que con la PCR semicuantitativa sobreestimamos la expresión de mRNA_{NGF}.

Otros estudios han sugerido que NGF ejerce una acción neuroprotectora en el núcleo estriado, ya que incrementa su expresión frente a lesiones excitotóxicas (Pérez-Navarro y Alberch, 1995; Canals et al., 1998; Menei et al., 2000), y su administración diaria durante una semana es suficiente para prevenir la

reducción de acetilcolinesferasa en animales lesionados con ácido quinolínico (Venero et al., 1994) y se asocia que su disminución exagera el daño al verse limitadas las células al soporte trófico que brinda (Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004). Sin embargo, en el presente estudio no hubo cambios significativos en los niveles entre condiciones control y neurodegeneración (3-NP), evaluados con PCR en tiempo real, probablemente porque la expresión se está dando en las neuronas colinérgicas, neuronas que no se dañan con el modelo 3-NP y que por lo mismo no estén alteradas de forma significativa.

Sin embargo, sí obtuvimos un aumento estadísticamente significativo en los niveles de mRNA_{Trk A} 48 horas después de la última dosis de 3-NP (Figura 19, Cuadro 5). Este aumento puede ser una respuesta de las células, en el núcleo estriado, para tener una mayor cantidad de receptores Trk A a los que pueda unirse el NGF disponible y activar de esta forma vías de señalización que promuevan la sobrevivencia neuronal. De hecho, se sabe que en condiciones normales sólo el 10% de los receptores para NGF se unen a su ligando endógeno (Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004), por lo que no es difícil pensar que cuando ocurre un daño neurodegenerativo las células sensibles a NGF necesitan mayor disponibilidad de receptores. A su vez, se sabe que existe un transporte retrógrado del hipocampo y la corteza hacia los núcleos basales (Saporito et al., 1993), otra razón por la cual sea más evidente la sobreexpresión de Trk A y no de su ligando. Además, como se mencionó, en el estriado el NGF actúa principalmente sobre las interneuronas colinérgicas, ya que el receptor Trk A que transduce su señal está localizado exclusivamente en estas células (Steininger et al., 1993; Castellanos-Ortega et al, 1999), pero es posible que su acción no esté limitada a este tipo neuronal, sino que de manera indirecta pudiera modular la actividad de las células gabaérgicas reduciendo la liberación de GABA, a través de la liberación de acetilcolina de las células colinérgicas (en la HD disminuye el neurotransmisor GABA en el estriado, entre otras regiones; Castellanos-Ortega et al, 1999).

Las vías de señalización que se activan con la unión de NGF a Trk A son, principalmente, PI-3K y MAPK, esta última promueve de forma importante la

sobrevivencia neuronal, sobre todo porque involucra la participación de Bcl-2, un importante factor antiapoptótico (Cui, 2006).

Dado que NGF y su receptor son expresados en el estriado, otros estudios como inmunolocalización de mRNA y detección de vías de señalización pueden complementar el conocimiento de su participación en la HD.

- Las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 y su receptor Trk B.

La protección neuronal, así como la regeneración y el crecimiento axonal y dendrítico mediado por BDNF y NT-4/5 ha sido muy bien documentada (Cui, 2006). En especial, el BDNF es la neurotrofina más ampliamente estudiada en el estriado y su participación en condiciones patológicas de esta región (Zuccato y Cattaneo, 2007), principalmente en la enfermedad de Huntington, donde se ha relacionado a la huntingtina mutada con una disminución en su expresión (Zucatto et al., 2001).

El BDNF es abundante principalmente en corteza cerebral e hipocampo y es transportado anterógradamente a las terminales estriatales vía aferentes corticoestriatales (Canals et al., 2001; Fusco et al., 2003), aunque también se ha visto que puede ser transportado retrógradamente por los receptores Trk B ubicados en las terminales nerviosas presinápticas (Deogracias, 2007). Su presencia en el estriado es importante, ya que las neuronas requieren BDNF para su actividad y sobrevivencia. Estudios previos en el laboratorio (Zermeño et al., 2009) mostraron que la proteína reduce su expresión a lo largo de edades postnatales; sin embargo, se sabe que ~ el 95% del BDNF que se encuentra en las células estriatales es de origen cortical, y el resto proviene de la sustancia negra o es producido en el mismo estriado (Zuccato y Cattaneo, 2007), por lo que aún en condiciones normales es de esperar que los niveles de mRNA sean bajos, debido a que se sintetiza en otras regiones.

En el presente estudio, encontramos una reducción significativa en la expresión de mRNA_{BDNF} en el estriado de ratón después de 48 horas de la última dosis

del daño causado con 3-NP (Figura 20, Cuadro 5). Estos resultados concuerdan con numerosos estudios en los que en muy diversas condiciones experimentales *in vitro* e *in vivo* de la HD, se ha observado disminución tanto de mRNA como de la proteína (Ferrer et al., 2000; Canals et al., 2004; Pineda, 2005; Canudas et al., 2005; Zucatto y Cattaneo, 2007; Chia-Lin Wu et al., 2009). Por ejemplo, se ha reportado que tanto en animales transgénicos con el gen mutado de la huntingtina, como en pacientes con HD, se observa una considerable disminución en los niveles de BDNF en el estriado (Dawbarn y Allen, 2003), y se ha sugerido que esta disminución conduce a la muerte selectiva de las células espinosas medianas (Zucatto *et al.*, 2001); de hecho, se ha descrito que la insuficiencia de BDNF causa degeneración específica de neuronas de proyección estriatal encefalinérgicas, las cuales son las células más afectadas en la enfermedad de Huntington (Canals et al, 2004; Pineda, 2005). En adición, esta disminución en el estriado se ha visto relacionada con una sobreexpresión de mRNA_{BDNF} en la corteza cerebral después de una inyección intraestriatal de toxinas como QUIN, KA y 3-NP (Canals et al., 2001; Chia-Lin Wu et al., 2009). El incremento de BDNF en la corteza después del daño en el estriado puede ser una respuesta compensatoria por la pérdida de terminales nerviosas, para proveer soporte trófico a las neuronas estriatales, por lo que para estudios posteriores podría evaluarse el mRNA en corteza después de la administración de 3-NP, con el fin de correlacionar la respuesta de ambas poblaciones neuronales.

La muerte celular debida al limitado acceso de las células al BDNF por 1) la disminución del aporte de la corteza por la pérdida de conexiones corticoestriatales y, 2) la disminuida síntesis de la neurotrofina en las propias células estriatales (por la disminución en el mRNA) sugiere que el BDNF juega un importante efecto protector en esta región del cerebro, por lo que su aplicación exógena puede representar un tratamiento para desórdenes neurodegenerativos como la HD. En este sentido, Pérez-Navarro y colaboradores, (2000), han demostrado que mediante terapia celular, BDNF es la neurotrofina más eficiente para prevenir la muerte de neuronas de proyección en el estriado.

Por otra parte, y debido a que NT-4/5 se une también al receptor Trk B, la falta de BDNF como factor trófico para las neuronas podría ser contrarrestada por la producción de la neurotrofina NT-4/5. En los resultados observamos un aumento, aunque no significativo, en la expresión de mRNA_{NT-4/5} (Figura 21), lo que sugiere que la célula está tratando de generar una respuesta protectora al no tener el aporte de BDNF, su principal factor trófico. En apoyo a esta suposición, otros estudios han sugerido que NT-4/5 podría reemplazar la deficiencia de BDNF para la sobrevivencia neuronal (Cui, 2006); aunque también es importante señalar que podría tener distintas acciones biológicas (según el contexto celular), o actuar sobre diferentes poblaciones neuronales. Por ejemplo, durante el desarrollo, la proteína de NT-4/5 en el estriado se expresa cuando decrece la expresión del BDNF (Zermeño et al., 2009); y en condiciones patológicas se ha observado que después de una lesión con QUIN, BDNF es más eficiente que NT-4/5 para prevenir la muerte neuronal, y que mientras BDNF protege a todos los tipos de neuronas estriatales, NT-4/5 sólo lo hace con las neuronas de la vía directa que expresan sustancia P (Ardelt et al., 1994; Pérez-Navarro et al., 2000). En resumen, ambas neurotrofinas son importantes factores tróficos en el estriado y es probable que su expresión se vea complementada entre sí para activar las vías de sobrevivencia y regeneración.

En adición, la efectividad de protección de ambas neurotrofinas depende de la expresión del receptor Trk B. Con nuestros resultados observamos que tanto la isoforma completa como la incompleta, tienden a aumentar después del daño producido con 3-NP, 48 horas después de la última dosis (Figura 22 y 23), aunque este cambio no es significativo. Salin y colaboradores, (1995), encontraron un incremento en la expresión de mRNA_{Trk B} tanto con el dominio de tirosina-cinasa (forma completa), como sin él (forma incompleta), en los núcleos putamen y accumbens, con lo cual, sugirieron que la inducción de este receptor después de una actividad anormal neuronal puede mediar un soporte trófico local en el cuerpo estriado por los ligandos BDNF y NT-4/5 en condiciones de neurodegeneración. Wong y colaboradores, (1997), sugirieron

que Trk B- puede jugar un papel importante en la capacidad de regeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y Canals y colaboradores, (2001), han mostrado que el receptor Trk B es esencial para la sobrevivencia de neuronas piramidales en la corteza cerebral.

Sin embargo, se ha señalado que, de las isoformas de Trk B, sólo la isoforma completa (que contiene un dominio de actividad tirosina-cinasa) es capaz de activar la señalización de BDNF y NT-4/5 (Ginés, 2006); y que la isoforma truncada antagoniza los efectos de Trk B+, impidiendo las señales de sobrevivencia neuronal dependientes de la unión de sus ligandos. Dicho de otra manera, la sobreexpresión de Trk B+ reduce la muerte neuronal producida por excitotoxicidad, mientras que la sobreexpresión de Trk B- la aumenta. En el modelo de isquemia (un modelo de excitotoxicidad *in vivo*) aumenta la expresión del receptor truncado, sugiriendo que el cambio de expresión de las isoformas de Trk B está involucrado en los procesos de muerte celular en condiciones de excitotoxicidad (Deogracias, 2007).

En relación a la afirmación anterior, el comportamiento de expresión de Trk B que observamos en este estudio sugiere que el mRNA de este receptor está en equilibrio entre sus isoformas y que su participación ante el daño con 3-NP puede estar involucrada tanto en la muerte (Trk B-) como en la sobrevivencia neuronal (Trk B+).

Así, estudios posteriores sobre las vías de señalización en las que Trk B actúa contribuirán a dilucidar su participación específica en procesos de neurodegeneración y cómo actúa cada isoforma. Por ejemplo, para la unión del BDNF y la NT-4/5 con su receptor Trk B+ se ha mostrado que activan vías de señalización como PI-3K/Akt y MAPK/ERK, interviniendo en la sobrevivencia neuronal a través de la regulación de Bcl-2. Además, se demostró que incrementan la expresión de (GAP)-43, una proteína asociada con el crecimiento de neuritas y regeneración axonal (Pérez-Navarro et al., 2005; Cui, 2006).

- La neurotrofina NT-3 y su receptor Trk C.

Al igual que el resto de las neurotrofinas, la NT-3 tiene una participación importante en la sobrevivencia, diferenciación y mantenimiento de diferentes poblaciones neuronales durante el desarrollo postnatal y, aunque en niveles más bajos, en el cerebro adulto (Numan et al., 2005). En el presente estudio, encontramos un aumento significativo en la expresión después de un daño con 3-NP (48 horas después de la última dosis), en comparación con condiciones control, tanto de la neurotrofina NT-3 como de su receptor Trk C (Figura 24 y 25, Cuadro 5).

En estudios previos en el laboratorio (Zermeño et al., 2009) se encontró por inmunolocalización que la NT-3 esta presente en edades adultas (42 y 80 días postnatales) en el soma de las neuronas del estriado, aparentemente transportado anterogradamente desde la corteza, lo que podría indicar que es posible que participe en el funcionamiento estriatal; de hecho en nuestro laboratorio se ha observado que en condiciones normales esta neurotrofina incrementa la transmisión glutamatérgica corticoestriatal (Miranda, 2008). En cuanto a su receptor también se ha encontrado expresado en el cerebro adulto (Hassink et al., 1999).

El aumento que encontramos tanto de mRNA_{NT-3} como de mRNA_{Trk C} sugiere que esta neurotrofina juega un papel importante en el soporte trófico de las neuronas del estriado cuando se genera un daño neuronal como degeneración. En condiciones normales –como ya se mencionó- la corteza podría estar liberando la neurotrofina hacia el núcleo estriado, pero a causa del daño algunas conexiones corticoestriatales se pierden, por lo que es posible pensar que las neuronas generan de forma autocrina la producción de NT-3 y de su receptor Trk C, para activar vías de señalización de sobrevivencia. La protección estriatal que se genera por la unión de NT-3 a su receptor Trk C se da por la activación de vías de señalización como MAPK/ERK y PI-3K/Ark (Cui, 2006).

Pérez-Navarro y colaboradores, (2000), demostraron la actividad protectora de NT-3 en neuronas del estriado, al encontrar que la neurotrofina previene la pérdida de diferentes subtipos de neuronas en el estriado (neuronas GABAérgicas, así como neuronas espinosas medianas que expresan encefalina y sustancia P), después del daño con QUIN. Sin embargo, este mismo grupo reportó que no encontraron cambios en el mRNA_{Trk C} después de una lesión en el estriado de rata (Canals et al., 1999). Esta diferencia con el presente trabajo puede deberse a la metodología utilizada o por el tipo de daño que generaron.

Un dato relevante acerca de esta neurotrofina es que también es capaz de unirse a los receptores Trk A y Trk B (aunque éstos tengan menor afinidad), por lo que al estar expresada en abundancia podría estar activando vías de señalización alternas para sobrevivencia o regeneración, a través de estos receptores (Segal, 2003; Cui, 2006; Tauszig-Delamasure et al., 2007). Por esta razón, dadas sus características esta neurotrofina puede ser una alternativa atractiva de tratamiento.

- El receptor p75: sobreexpresión de mRNA en el estriado.

Se ha descrito que el receptor p75 participa directamente en varios de los efectos biológicos de las neurotrofinas durante el desarrollo y en el SNC adulto (Dechant y Barde, 2002). Resulta un hecho interesante que, dependiendo del contexto celular, este receptor influye en la activación de diferentes vías de señalización, ya sea favoreciendo la unión de las neurotrofinas con su receptor específico o bien uniéndose directamente a ellas (Nykjaer et al., 2005). Por ejemplo, se ha visto que en ratones adultos transplantados con líneas celulares que sobreexpresan p75, así como en ratones después de una axotomía, este receptor causa muerte celular en neuronas sensoriales y simpáticas, en células ganglionares de la retina, en oligodendrocitos y en algunas líneas celulares (Greferath et al., 2002) y por otro lado se ha visto que p75 participa en procesos como elongación axonal y transmisión sináptica, y para cada caso necesita de la participación de diferentes proteínas (Dechant y Barde, 2002).

Por otra parte, se sabe que este receptor es altamente expresado durante el desarrollo, pues favorece una mayor afinidad de los receptores a las neurotrofinas, como el NGF y el BDNF, para inducir la sobrevivencia y la diferenciación neuronal (Nykjaer *et. al.*, 2005); y su expresión disminuye considerablemente en el adulto (Dechant y Barde, 2002; Nykjaer *et. al.*, 2005). Sin embargo, en condiciones que incrementan la muerte celular como lesiones mecánicas, isquemias, axotomías y enfermedades neurodegenerativas es reexpresado en abundancia. Así, por ejemplo, se han encontrado niveles altos del receptor en corteza cerebral de pacientes con Alzheimer, y en modelos de excitotoxicidad con neuronas motoras (Hanbury *et al.*, 2002; Nykjaer *et. al.*, 2005; Underwood y Coulson, 2008).

En relación al presente trabajo, se ha sugerido que la expresión de p75 después de una lesión en el estriado juega roles importantes y diversos en los procesos de degeneración y regeneración (Hanbury *et al.*, 2002), y que la sobrevivencia y la muerte celular pueden estar controladas por un balance entre las vías de señalización activadas por los receptores Trk y/o p75 y que éstas pueden interactuar entre sí tan pronto como se activan (Bibel *et al.*, 1999; Friedman, 2000).

En concordancia con los estudios antes mencionados observamos, mediante PCR en tiempo real, un considerable incremento en la expresión del mRNA del receptor p75 después del daño neurodegenerativo (inducido con 3-NP), que inició desde un tiempo temprano (1 hora después de la última dosis) y que fue aún mayor después de 48 horas (Figura 26, Cuadro 5).

El aumento de expresión de mRNA_{p75} que observamos podemos explicarlo en dos caminos distintos. En primer lugar y dependiendo del contexto celular, p75 tiene una importante participación en la señalización de muerte celular, por lo que es probable que su expresión se active en las neuronas espinosas medianas del estriado, por la degeneración causada por el 3-NP, con el fin de activar cascadas de señalización para regular procesos apoptóticos (Nykjaer *et. al.*, 2005; Underwood y Coulson, 2008). En relación con este supuesto,

Hanbury y colaboradores, (2002), demostraron que la reexpresión de p75 en el estriado se da en respuesta a un daño excitotóxico causado por 3-NP y KA en astrocitos y en algunas neuronas del estriado entre 3 y 5 días después de la lesión y que se produce en forma dosis-dependiente. Por su parte, Dechant y Barde (2002), observaron que, después de una axotomía, las neuronas corticoespinales muestran una expresión elevada de p75 tres días después de la lesión, tiempo que coincide con la muerte celular.

En relación a las neurotrofinas, se sabe que el receptor p75 se une principalmente a las formas precursoras (pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3 y pro-NT4/5) causando muerte celular, principalmente por apoptosis (Nykjaer et al., 2005), un tipo de muerte celular observado en la enfermedad de Huntington y con el modelo utilizado en el presente trabajo. Sin embargo, las vías por las cuales p75 interviene en la muerte celular todavía se desconocen, pero se cree que esta involucrada la activación de JNK y de caspasas como 9, 6 y 3 (Nykjaer et al., 2005). Debido a que en el presente trabajo evaluamos solo la expresión de los mRNAs, no podemos saber si se está generando la unión de p75 a las pro-neurotrofinas; sin embargo, en nuestro laboratorio se tiene evidencia de que la administración de 3-NP (como se realizó en el presente trabajo) genera la activación de caspasa 3, por lo que al relacionar ambas evidencias podríamos pensar que posiblemente esto suceda, en alguna medida, a través de vías de señalización activadas por dicha unión.

En contraparte, existen trabajos en los que la muerte neuronal ocurre por la ausencia de p75. En estos casos, se piensa que, en ausencia del receptor p75, se necesitan cantidades muy altas de neurotrofinas para activar a los receptores Trks y, en consecuencia, lograr activar vías de sobrevivencia (Dechant y Barde, 2002), ya que es bien conocido que el receptor p75 actúa como co-receptor de los receptores Trk aumentando la afinidad y especificidad para cada neurotrofina, probablemente debido a cambios en la conformación p75-Trk al interactuar (Bibel et al., 1999; Arévalo y Wu, 2006). Por lo que, una segunda explicación a la elevada expresión que observamos, es la posibilidad de que el aumento de mRNA_{p75} sea una respuesta celular para favorecer la

unión de las neurotrofinas a sus receptores Trk específicos y con ello activar vías de señalización para la actividad neurotrófica promoviendo la sobrevivencia estriatal. De hecho, se piensa que todas las situaciones en las que se describe la muerte celular por la interacción de las neurotrofinas y p75 son en ausencia de la expresión de Trk (Friedman y Greene, 1999).

Friedman (2000), observó que en el hipocampo las 4 neurotrofinas intervienen en la muerte neuronal vía receptor p75, cada una afectando a un tipo de subpoblación de neuronas vulnerables selectivamente, pero que, en presencia de los receptores Trk, se promueve la sobrevivencia. Asimismo, Greferath y colaboradores, (2002), sugieren que la reexpresión de p75 después de una lesión en las interneuronas colinérgicas estriatales en combinación con la expresión de Trk A contribuye a su sobrevivencia, lo que favorece a que estas neuronas sean más resistentes ante un daño en el estriado; de hecho esto sugiere que la expresión elevada de mRNA_{p75} que vemos se esté dando en este mismo tipo de neuronas estriatales, por lo que en estudios posteriores podrían realizarse técnicas como FISH o inmunolocalización con el fin de corroborar en cuáles células se encuentra expresado.

Esta capacidad de activar diversas vías de señalización no es específica de p75, se sabe que otros miembros de la superfamilia TNF tienen funciones similares, en particular FAS y TNFR1 (Dechant y Barde, 2002). Queda pendiente averiguar si la vía de señalización que se activa por la sobreexpresión de p75 en el estriado, que observamos después del daño generado por el 3-NP, esta relacionada con la sobrevivencia o con la muerte celular y, en caso de que sea esta última, si esta relacionado con la unión del receptor p75 a las pro-neurotrofinas.

Entre los desafíos para el futuro es comprender la multiplicidad de eventos de señalización que pueden ser activados por las neurotrofinas y sus receptores en función del contexto celular, y cómo estos hechos alteran el desarrollo, funcionamiento y mantenimiento del sistema nervioso. Asimismo, para su posible uso clínico, resulta necesario establecer concentraciones adecuadas que permitan tratar de manera eficaz algunas patologías, como la HD.

El método utilizado para analizar el mRNA es importante.

Principalmente por la sensibilidad de las técnicas y debido a los resultados obtenidos, en el presente estudio evaluamos la expresión de mRNA mediante PCR semicuantitativa y PCR en tiempo real, presentando cada uno ventajas y desventajas para la obtención de resultados y su análisis. Así, por ejemplo, con PCR semicuantitativo se observó que las bandas analizadas eran específicas al material amplificado, ya que es posible separar los productos por peso molecular; sin embargo, algunas bandas obtenidas eran tan tenues que no era posible cuantificarlas por densitometría. Con el uso de la PCR en tiempo real el procedimiento fue más rápido y mediante esta reacción pudimos observar de una forma más sensible y precisa los cambios en los niveles de expresión.

PCR semicuantitativo vs PCR en tiempo real.

Como ya se ha mencionado, la técnica de PCR es ideal para la detección de cambios en la expresión génica a través de la cuantificación de mRNA de genes específicos durante alteraciones celulares, patológicas o experimentales, permitiendo asociar dichos cambios a distintos estados fisiológicos, así como para la cuantificación de mRNA en muestras de tejidos con RNA parcialmente degradado (Bustin, 2002; Vinueza-Burgos, 2009). Sin embargo, los resultados que se obtienen para el análisis pueden depender de la técnica que se utilice.

Como se observó en los resultados, con la PCR semicuantitativa sólo obtuvimos diferencias en la expresión de NGF, e incluso no obtuvimos resultados visibles de los receptores Trk A y p75, 48 horas después de la última dosis de 3-NP, mientras que con la PCR en tiempo real observamos que la expresión tanto de las neurotrofinas como de sus receptores es diferencialmente regulada por el daño causado con 3-NP; en particular, los resultados para NGF revelaron que realmente no hay cambios entre el tratamiento con la toxina y las condiciones normales. Estas diferencias pueden ser explicadas por las características de cada técnica.

Ya otros estudios han observado que los resultados obtenidos mediante PCR semicuantitativo dependen de la cantidad de la reacción, por lo que una mínima variación puede alterar los resultados; incluso se piensa que el análisis por densitometría resulta bastante subjetivo (Nolan et al., 2006), ya que se ha demostrado que el ancho de las bandas observadas no siempre representa el número de copias reales obtenidas o es muy difícil diferenciar cambios sutiles (Applied Biosystems, 2009), además de que los resultados obtenidos son poco reproducibles y tienen una alta variabilidad (30-70%) (Pfaffl, 2004). Por lo anterior, autores como Mi-Kyung-Lee y Hye-Ryoun Kim (2006), sugieren que la PCR semicuantitativa no es del todo confiable, por lo que recomiendan la aplicación de otras técnicas como PCR en tiempo real e Hibridación *in situ*.

Por otra parte, es importante mencionar que el momento de la reacción en el que se cuantifica el producto amplificado es muy importante para el análisis posterior. Según la teoría de la PCR, la cantidad del producto amplificado sólo es directamente proporcional a la cantidad inicial durante la fase exponencial, ya que conforme la reacción progresa los reactivos y el DNA disponible están siendo consumidos como resultado de la amplificación, por lo que la reacción comienza a detenerse (la amplificación deja de ser equivalente a la cantidad inicial), primero en una fase lineal hasta llegar a una fase de meseta que, según la cinética de la reacción, es diferente en cada muestra analizada (Applied Biosystems, 2009). En este sentido, con la PCR semicuantitativa el producto amplificado en los geles teñidos corresponde a la fase de meseta o “punto final” de la reacción (Macdonald et al., 2001; Nolan et al., 2006), por lo que es probable que los datos que obtuvimos no sean equivalentes a la cantidad inicial amplificada y que, por ello los resultados no concuerden con los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, técnica en donde los resultados obtenidos corresponden precisamente a la fase exponencial de la reacción. Por esta razón, la PCR en tiempo real puede ser considerada como más efectiva que la PCR semicuantitativa.

Otra de las razones por las que es probable que nuestros resultados fueron distintos entre las técnicas es que, mediante PCR en tiempo real nos fue

posible analizar un mayor número de genes de la misma muestra lo que permite con una mayor confiabilidad establecer relaciones entre genes (Macdonald et al., 2001). A diferencia, para la PCR semicuantitativa fue necesario realizar nuevamente la reacción RT ya que por la cantidad necesaria para la reacción no fue suficiente para todos los genes que analizamos, así que no podemos descartar que las reacciones, aunque provenientes de la misma muestra, pudieran tener alteraciones debido a la manipulación de RNA total para una nueva reacción.

Las principales ventajas de PCR en tiempo real es que no requiere manipulación post-amplificación, lo que reduce el riesgo de contaminación y degradación; puede detectar diferencias muy pequeñas (23%) en la expresión de genes; tiene un alto rango dinámico; es muy sensible; es eficiente; es rápido y reproducible (Wong y Medrano, 2005; Pfaffl, 2004).

Todas las razones antes expuestas sugieren que nuestros resultados obtenidos por PCR en tiempo real son mucho más confiables para su análisis en este estudio.

Una buena elección de genes de referencia.

Debido a que en la PCR se amplifica una pequeña cantidad inicial de DNA, cualquier variación en la técnica puede producir errores muy grandes, afectando la interpretación final de los niveles de expresión. Para resolver este problema, frecuentemente se recurre a una cuantificación relativa, normalizando la abundancia del gen de interés con la expresión de un gen de expresión estable ("*housekeeping*"), que es medido simultáneamente en la misma muestra (Boda et al., 2009). De esta manera, estos genes constituyen una estrategia para el control del error experimental durante el procesamiento de la muestra (Huggett et al., 2005; Robinson et al., 2007).

Los "*housekeeping genes*", también llamado genes de referencia o endógenos, son genes que se expresan siempre en todos los tejidos, y se relacionan con el

mantenimiento de funciones celulares vitales, como son el metabolismo (GADPH) o el mantenimiento de la estructura celular (actina o tubulina); sin embargo, no todos son expresados de manera abundante ni homogénea (Zhang y Wen-Hsiung Li, 2004), principalmente porque no sólo están implicados en el metabolismo basal de la célula, si no que también participan en otras funciones específicas (Thellin et al., 1999).

Para que estos genes sean útiles en la interpretación de los resultados no deben ser influenciados por las condiciones experimentales ni por el metabolismo celular (Thellin et al., 1999; Boda et al., 2009). En este sentido, los genes endógenos más utilizados son β -actina, GAPDH, β -tubulina, HPRT y 18S Ribosomal, entre otros (Huggett et al., 2005); incluso algunos autores sugieren utilizar dos, tres o más genes endógenos simultáneamente (Lee et al., 2002; Huggett et al., 2005; Robinson et al., 2007; Boda et al., 2009).

En el presente trabajo utilizamos dos genes de referencia β -actina y 18S Ribosomal, observando que, tanto en la PCR semicuantitativa como en la PCR en tiempo real, el gen 18S resultó un buen control interno o gen de referencia, al no presentar prácticamente cambios en su expresión entre las muestras.

Si bien, nuestros resultados de expresión relativa normalizados tanto con β -actina como con 18S Ribosomal muestran un patrón similar de expresión para cada neurotrofina y para cada receptor, los niveles en los que podemos observar son expresados en el tejido estriado son diferentes si los observamos en relación a la expresión de uno u otro gen de referencia (Figuras 12, 13, 14, 15, 16 y 17). Así, los niveles de mRNA del gen 18S son mucho mayores que los del gen β -actina, siendo necesarios menos ciclos de amplificación para poder observarlo, y, aún cuando ambos genes no presentan diferencias significativas entre los grupos experimentales ni entre los tiempos evaluados después del tratamiento con la toxina mitocondrial, la dispersión entre las muestras del gen 18S es muy pequeña mientras que la de las muestras de β -actina es más amplia y, por lo tanto, su expresión menos estable (Figura 7). Estas características generaron variaciones en el porcentaje de expresión

relativa obtenida mismo grupo experimental normalizados con cada gen de referencia (Figuras 8, 9, 10 y 11). Resulta importante hacer hincapié en que, normalizando con el gen β -actina se sobreestimó la expresión de los genes evaluados (si lo comparamos con el gen 18S Ribosomal que resultó más estable), por lo que, para estudios posteriores bajo nuestras condiciones experimentales, recomendamos el uso de 18S Ribosomal como gen de referencia y como control interno.

El gen β -actina se ha descrito como un buen gen de referencia para el cerebro, pero su expresión varía entre diferentes regiones (Calvo et al., 2008). De hecho, β -actina no siempre resulta un buen control; por ejemplo, Selvey y colaboradores, (2001), señalaron que su expresión es inhibida de una manera dosis-dependiente por la administración de *matrigel*. En este sentido un buen conocimiento de la actividad del control interno elegido en las condiciones experimentales es importante antes de comenzar cualquier interpretación de datos (Thellin et al., 1999).

En el estriado, no se ha reportado que la expresión de β -actina se vea modificada por la acción de la toxina 3-NP; sin embargo, se ha reportado que el mRNA $_{\beta-act}$ puede transportarse a través de vías de señalización activadas por las neurotrofinas (Zhang et al., 2001). Dado que en el presente trabajo observamos cambios en la expresión de las neurotrofinas, es posible que sea la razón por la cual la expresión de β -actina no sea totalmente homogénea entre las muestras.

Por su parte, al igual que en nuestros resultados, la expresión del gen 18S Ribosomal ha sido identificado como uno de los más estables en el cerebro (Thellin et al., 1999; Rhinn et al., 2008; Boda et al., 2009) y otros tejidos (Selvey et al., 2001). Por esta razón, y dadas las variaciones que observamos de β -actina, los resultados obtenidos por PCR en tiempo real sólo fueron normalizados con 18S Ribosomal. El uso del gen 18S Ribosomal como referencia es ampliamente recomendado porque su expresión es alta y sólo en caso de que la maquinaria de traducción sea alterada bajo condiciones

experimentales habría variaciones en su expresión (Thellin et al., 1999). Además, debemos tomar en cuenta que si falta el ribosoma (o cualquiera de sus subunidades) por cambios en su expresión génica, entonces la traducción del resto de las proteínas (incluida β -actina) se vería reducida, llevando incluso a la muerte celular.

Aunado a lo anterior, se ha descrito que la técnica que se utilice para el procesamiento de las muestras puede alterar la estabilidad de los genes endógenos, por lo que su manejo y los resultados también deben tomarse en cuenta a la hora de elegir que gen utilizar como referencia (Thellin et al., 1999; Gilsbach et al., 2006).

El uso de dos genes endógenos en este trabajo permitió darnos cuenta de lo importante que resulta su elección, y cómo la expresión de genes y sus variaciones bajo condiciones experimentales pueden ser sobre- o subestimadas con la normalización de un inadecuado gen de referencia.

La importancia de estos resultados recae al caracterizarlos como genes de referencia. Existe una extensa lista de publicaciones enfocadas a la validación de genes internos de referencia, al parecer todos con un patrón común: la dificultad de establecer candidatos adecuados, sobre todo que resulten universales bajo cualquier condición experimental (Thellin et al., 1999; Selvey et al., 2001; Gilsbach et al., 2006; Rhinn et al., 2008; Calvo et al., 2008; Boda et al., 2009). La explicación a esta causa es sencilla: cada condición experimental genera cambios o daños específicos en la célula, y cada cambio puede repercutir de manera particular en la expresión génica, incluso sobre aquellos genes que participen en el mantenimiento de las funciones celulares vitales.

Conclusiones.

Los mRNA de las neurotrofinas son expresados a lo largo del desarrollo en el estriado de ratón, en niveles bajos y con una disminución del BDNF conforme se alcanza la edad adulta.

Una hora después de la última dosis del tratamiento con 3-NP los mRNA de las neurotrofinas y sus receptores no presentan cambios en su expresión.

Usando la RT-PCR semicuantitativa, se observó un ligero aumento en la expresión de NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 después de 48 horas del tratamiento con 3-NP, respecto a la expresión observada en condiciones control, siendo significativo para la neurotrofina NGF. Los receptores no mostraron cambios en su expresión.

Mediante la PCR en tiempo real se observó en tejido estriatal que después de 48 horas del tratamiento con 3-NP, la expresión de mRNA de la neurotrofina BDNF disminuye, mientras que la neurotrofina NT-3 aumenta; las neurotrofinas NGF y NT-4/5 no mostraron cambios. Para el caso de los receptores, que presentaron una expresión más elevada que sus ligandos, los niveles de mRNA de Trk A, Trk C y p75 aumentaron después del tratamiento con la toxina 3-NP.

La PCR en tiempo real fue más eficiente que la PCR semicuantitativa para la evaluación de la expresión génica de las neurotrofinas y sus receptores, por su sensibilidad ante cambios de expresión más sutiles.

Bajo nuestras condiciones experimentales, el gen de referencia 18S Ribosomal fue más estable y con niveles de expresión de mRNA más altos que el gen β -actina, resultando que, al normalizar con éste último, los niveles de expresión obtenidos para las neurotrofinas y sus receptores eran sobreestimados.

Dada la participación que observamos de las neurotrofinas después de un proceso de degeneración neuronal, éstas resultan ser un interesante elemento

de tratamiento con el fin de prevenir la pérdida de neuronas observada en desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Huntington.

Apéndice 1. Descripción de métodos utilizados.

Procedimiento para obtención de RNA.

Reactivos

- **TRIzol Reagent**
- **Cloroformo puro**
- **Isopropanol puro**
- **Etanol**
- **H₂O + DEPC**

1. En un tubo de 1 ml agregar 800 μ l de TRIzol a menos de 10 mg de tejido o para menos de 1×10^6 células.
2. Homogenizar por inversión o vórtex.
3. Congelar por 15 minutos aprox. y descongelar a temperatura ambiente. Repetir.
4. Agregar 200 μ l de Cloroformo por cada mililitro de TRIzol (160 μ l a 800 μ l de TRIzol).
5. Agitar en vórtex por 15 segundos.
6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
8. Transferir fase acuosa (superior) a otro tubo (aprox. 450 μ l). Si la cantidad es muy pequeña puede agregarse 5 μ l de glucógeno.
9. Agregar a la fase acuosa 500 μ l de Isopropanol por ml de TRIzol (400 μ l a 800 μ l de TRIzol);
10. Agitar suavemente por inversión.
11. Incubar toda la noche a -20 °C.
12. Centrifugar a 12 000 rpm por 11 minutos a 4 °C.
13. Desechar el sobrenadante por decantación.
14. Lavar la pastilla obtenida con 1 ml de Etanol al 75% (H₂O + DEPC) por ml de TRIzol (800 μ l a 800 μ l de TRIzol).
15. Centrifugar a 12 000 rpm por 6 minutos a 4 °C.
16. Desechar el sobrenadante por decantación.
17. Dejar secar la pastilla obtenida (de 15 a 20 min. aprox.)
18. Resuspender en 30 μ l de H₂O + DEPC 0.05% (los μ l pueden variar según el tamaño de la pastilla)
19. Agitar suavemente.
20. Guardar a -70 °C.

Procedimiento para cuantificación de RNA.

1. Descongelar y poner en hielo.
2. Resuspender 70 veces aproximadamente.
3. Agitar suavemente.
4. Diluir 2:500 de H₂O + DEPC en un nuevo tubo.
5. Agitar muy bien en vórtex.
6. Prender espectrofotómetro a 280 nm, lavando la cubeta 3 veces con alcohol, secar perfectamente y calibrar a 0 con H₂O + DEPC.
7. Mezclar muy bien la dilución y vaciar en la cubeta.
8. Leer a 280 y 260 nm.
9. Lavar muy bien la cubeta y utilizar puntas nuevas para cada dilución.

Procedimiento para realizar RT

Reactivos

-Buffer 5X First-Strand

- d NTP Mix 10 mM

- DTT 0.1 M

- Oligo dT₁₂₋₁₈ (500 µg/ml)

- Reversa Transcriptasa (M-MLV RT)

- H₂O + DEPC

1. Agregar (por muestra de RNA) a un tubo para microcentrifuga (0.5 ml):

5 µl de Buffer

4 µl de dNTP

1 µl de DTT

1 µl de Oligo dT

1 µl de M-MLV RT

8 µl de muestra + (H₂O + DEPC) (Según la cantidad de RNA obtenido se lleva todo a 1.5 µg/ml y la diferencia es lo que se coloca de agua, si es necesario pueden agregarse los 8 µl de muestra)

2. Colocar los tubos en el termociclador a 37 °C por 1 hora
3. Mantener las muestras obtenidas de cDNA a 4 °C.

Procedimiento para realizar PCR semicuantitativo.

Reactivos

- **Buffer 10X PCR**
- **MgCl₂ 50 mM**
- **d NTP mlx 10 mM**
- **Primer Sentido 10 µM**
- **Primer Antisentido 10 µM**
- **DMSO grado molecular**
- **Taq DNA Polimerase (U/10 µl)**
- **H₂O + DEPC**

1. Agregar (por muestra) a un tubo para microcentrífuga (0.5 ml):

2.4 µl de Buffer

1.25 µl de MgCl₂

1 µl de dNTP

1 µl de primer sentido

1 µl de primer antisentido

0.75 µl de DMSO

0.25 µl de Taq DNA Polimerasa

14.8 µl de H₂O + DEPC

2.5 µl de cDNA obtenido de la

reacción RT

2. Colocar los tubos en un termociclador estableciendo para cada Primer utilizado ciclos específicos de desnaturalización- alineación- extensión.
3. Terminada la reacción conservar los tubos a 4 °C.

Procedimiento para cuantificación de productos de PCR semicuantitativo

Reactivos

- **Agarosa**
- **Buffer TAE 1X**
- **SYBER green 1X**
- **Buffer LB**

1. Preparar un gel de agarosa al 2% utilizando Buffer TAE 1X (2 g de agarosa por cada 100 ml).

2. Colocar el gel en la cámara de electroforesis sumergido en Buffer TAE 1X.

3. Agregar a las muestras 1 µl de SYBR

Green y mezclar (El Buffer LB mezclado con el SYBR sirve como marca de color a la hora de correr el gel en la cámara de electroforesis).

4. Agregar en cada pozo del gel 10 µl de la muestra.
5. Correr el gel de 45 minutos a 1 hora a 100V.
6. Revelar el gel en un transiluminador o un scanner especial para ello.

Procedimiento para realizar PCR en tiempo real.

Reactivos

- **Primer Sentido 10 μ M**
- **Primer Antisentido 10 μ M**
- **H₂O + DEPC**
- **SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix for Quantitative PCR (Sigma-Aldrich)**

1. Agregar (por muestra) a un tubo para microcentrífuga (0.5 ml):

7.5 μ l de SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix

0.75 μ l de primer sentido

0.75 μ l de primer antisentido

4.5 μ l de H₂O + DEPC

1.5 μ l de cDNA obtenido de la reacción RT

2. Colocar los tubos en un termociclador para tiempo real estableciendo para cada Primer utilizado ciclos específicos de desnaturalización-alineación-extensión.

3. Obtener del programa de análisis las CT's a un umbral de 0.02 para su posterior análisis estadístico.

NOTA. Todo se realiza con guantes y con material esterilizado en autoclave y/o con DEPC. El DEPC es usado en el laboratorio para inactivar las RNAsas del agua o de cualquier otro material utilizado (esta inactivación se debe a modificaciones covalentes de los residuos de histidina).

Apéndice 2. *Box Plots*

Los *Box Plots* (o diagrama de caja y bigote) pertenecen a una familia de técnicas estadísticas llamada análisis exploratorio de datos, y se utilizan para visualizar e identificar patrones que de otra manera pueden pasar desapercibidos (Williamson et al., 1989).

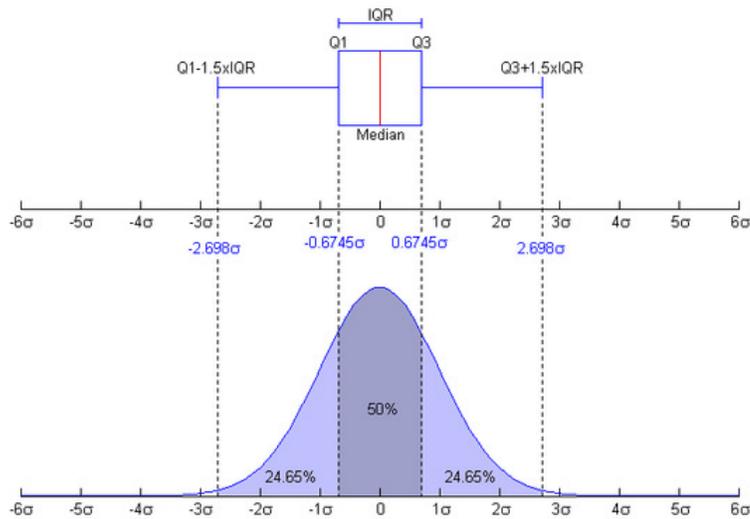
El objetivo de estas graficas es presentar de una manera cuantitativa las características principales de los datos obtenidos: la mediana, los cuartiles 25 y 75, los valores extremos y, en algunos casos, los valores atípicos y la media. Con estos valores puede conocerse la tendencia central de los datos (señalada por la mediana) la extensión de los datos (señalada por el largo de la caja así como la distancia entre los extremos de la caja y los bigotes), la asimetría (según la desviación de la mediana del centro de la caja y en relación a la longitud de la caja) y la dispersión (según el tamaño de la caja y de los bigotes así como en relación a los valores atípicos) (Benjamini, 1988; Frigge et al., 1989).

La importancia de las características que pueden observarse en los *Box Plots* es que proporcionan una visión general de la distribución (simétrica o asimétrica) de los datos: si la mediana no está en el centro del rectángulo, la distribución no es simétrica.

Los cuartiles adquieren una importancia adicional porque son la base para marcar los posibles valores extremos. Además, son útiles para ver la dispersión de los datos y la presencia de valores atípicos ya que, generalmente, al comparar dos o más grupos, los valores de mayor interés son los que se dispersan o se encuentran en alguna de las colas (Benjamini, 1988; Frigge et al., 1989).

Al describir ampliamente la distribución de un conjunto de datos (generalmente de conjuntos pequeños de datos que no se prestan fácilmente a histogramas) estas gráficas resultan ser una forma útil y rápida de evaluar el comportamiento

de uno o más conjuntos de datos gráficamente, ya que permiten comparar las distribuciones entre varios grupos o conjuntos de datos. Actualmente existen diversas variables, por ejemplo, Box Plot ancho y Box Plot con muescas así como combinaciones entre estos (Mg Gill et al., 1978).



Puede observarse las características principales de un grupo de datos y la interpretación de su distribución. En este ejemplo, los datos tienen una distribución normal. (Q1, cuartil 25, Q3, cuartil 75, IQR, rango intercuartil, $Q1-1.5 \times IQR$, límite extremo inferior, $Q3+1.5 \times IQR$, límite extremo superior).

Apéndice 3. Tablas de resultados y análisis estadísticos

DENSITOMETRÍA DE mRNA DE NEUROTROFINAS EN EL DESARROLLO POSTNATAL DEL ESTRIADO DE RATÓN

EXPRESIÓN RELATIVA (Unidades arbitrarias)

	NGF	BDNF	NT-3	NT-4/5
P10	4.5	1.12	5.4	1
	3.8	1	3	0.7
	3.1	0.8	1.95	0.4
P21	2.8	0.1	3.1	2.3
	1.95	0	2.35	1.8
	0.6	0	1	1.15
P42	0.02	0	0.2	0.3
	2	0	1.3	1.75
	2.4	0	1.5	2.1

DENSITOMETRÍA DE GENES ENDÓGENOS EN EL ESTRIADO DE RATÓN

Expresión absoluta (unidades LAU/mm²)

	18S		B-ACTINA	
	Control	3-NP	Control	3-NP
1 hora	7705.53	7365.02	1823.85	1994.97
	7407.86	7696.18	2605.52	1162.5
		7436.38		3235.56
48 horas	7596.17	7668.89	5821.4	4361.65
	7331.67	7596.17	2350.04	3919.88
	7407.86	7452.36	2422.89	3980.72
	7353.16	7418.38	3149.49	4168.27
	7436.38	7341.19	3008.15	2531.05
	7466.72	7275.43	3998.04	2703.15
		7407.86		3623.58
		7436.38		3555.91

**Prueba estadística gen endógeno b-actina CONTROL vs 3-NP
Unpaired t test**

P value	0.9152
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.1081 df=17
How big is the difference?	
Mean ± SEM of CONTROL	3147 ± 445.2 N=8
Mean ± SEM of 3-NP	3203 ± 301.8 N=11
Difference between means	-55.96 ± 517.9
95% confidence interval	-1149 to 1037
R square	0.0006864
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.582, 7, 10
P value	0.4922
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.
 Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.
 Como el p-valor calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0.05$, se puede aceptar la hipótesis nula H0.
 El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es de 91.52%.

**Prueba estadística gen endógeno 18S CONTROL vs 3-NP
Unpaired t test**

P value	0.9993
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.0009199,df=17
How big is the difference?	
Mean ± SEM of CONTROL	7463 ± 44.86 N=8
Mean ± SEM of 3-NP	7463 ± 40.53 N=11
Difference between means	0.05615 ± 61.04
95% confidence interval	-128.7 to 128.8
R square	4.978E-08
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.123, 10, 7
P value	0.9054
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.
 Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.
 Como el p-valor calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0.05$, se puede aceptar la hipótesis nula H0.
 El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es de 99.93%.

**Prueba estadística entre grupos de genes endógenos
One-way analysis of variance**

P value	< 0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	92.26
R square	0.8906
Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	47.66
P value	< 0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	174300000	3	58100000
Residual (within columns)	21410000	34	629781
Total	195700000	37	

RESULTADOS PCR SEMICUANTITATIVO

EXPRESIÓN RELATIVA DE NEUROTROFINAS OBTENIDAS POR DENSITOMETRÍA 1 HORA DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS DE 3-NP

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON 18S

Ratón	NGF		BDNF		NT-3		NT-4/5	
	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP
1	0.1961643	0.1240485	0.0873061	0.0869067	0.1153548	0.1887802	0.0893124	0.0919400
2	0.1728245	0.2492831	0.0792104	0	0.1512420	0	0.1100047	0
3		0.1148408		0		0.2886364		0.1658306
PROMEDIO	0.1844944	0.1627242	0.0832582	0.0289689	0.1332984	0.159138	0.0996586	0.0859235

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON b-act

Ratón	NGF		BDNF		NT-3		NT-4/5	
	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP
1	0.82876881	0.45796177	0.36885709	0.32084192	0.48735916	0.6969378	0.37733366	0.33942365
2	0.49136449	1.65034839	0.22520648	0	0.43000246	0	0.31275907	0
3		0.26394195		0		0.6633813		0.38113341
PROMEDIO	0.66006665	0.7907507	0.29703179	0.10694731	0.45868081	0.4534397	0.34504636	0.24018569

Pruebas estadísticas de NEUROTROFINAS 1 hora después de la última dosis de 3-NP (CONTROL vs 3-NP)

Unpaired t test	NGF		BDNF		NT-4/5		NT-3	
	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act
P value	0.7264	0.8344	0.458	0.5184	0.8399	0.5536	0.8295	0.9869
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	No	No	No	No	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0.3843 df=3	t=-0.2279 df=3	t=0.9121 df=2	t=-0.7772 df=2	t=-0.2201 df=3	t=0.6651 df=3	t=-0.2348 df=3	t=-0.01784 df=3
How big is the difference?								
Mean ± SEM of CONTROL	0.1845 ± 0.01167 N=2	0.6601 ± 0.1687 N=2	0.08326 ± 0.004048 N=2	0.2970 ± 0.07183 N=2	0.09966 ± 0.01035 N=2	0.3450 ± 0.03229 N=2	0.1333 ± 0.01794 N=2	0.4587 ± 0.02868 N=2
Mean ± SEM of 3-NP	0.1627 ± 0.04336 N=3	0.7908 ± 0.4334 N=3	0.04345 ± 0.04345 N=2	0.1604 ± 0.1604 N=2	0.08592 ± 0.04797 N=3	0.2402 ± 0.1207 N=3	0.1591 ± 0.08463 N=3	0.4534 ± 0.2269 N=3
Difference between means	0.02177 ± 0.05665	-0.1307 ± 0.5735	0.03980 ± 0.04364	0.1366 ± 0.1758	0.01374 ± 0.06240	0.1049 ± 0.1577	-0.02584 ± 0.1101	0.005241 ± 0.2937
95% confidence interval	-0.1585 to 0.2020	-1.956 to 1.694	-0.1480 to 0.2276	-0.6197 to 0.8929	-0.1848 to 0.2123	-0.3968 to 0.6065	-0.3761 to 0.3244	-0.9294 to 0.9399
R square	0.04692	0.01701	0.2938	0.232	0.01589	0.1285	0.01804	0.0001061
F test to compare variances								
F,DFn, Dfd	20.71, 2, 1	9.901, 2, 1	115.2, 1, 1	4.988, 1, 1	32.24, 2, 1	20.96, 2, 1	33.37, 2, 1	93.92, 2, 1
P value	0.3071	0.4385	0.1183	0.536	0.2472	0.3053	0.243	0.1455
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Are variances significantly different?	No	No	No	No	No	No	No	No

EXPRESIÓN RELATIVA DE NEUROTROFINAS OBTENIDAS POR DENSITOMETRÍA 48 HORAS DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS DE 3-NP

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON 18S

Ratón	NGF		BDNF		NT-3		NT-4/5	
	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP
1	0.10153801	0.34755486	0.06558305	0.07952129	0.14338673	0.11343363	0.07903193	0.06698623
2	0.08782992	0.41977207	0.07053589	0.08636657	0.09272649	0.15729374	0.07515477	0.06516968
3	0.11479969	0.20771943	0.07087851	0.06901606	0.0842227	0.09589982	0.06953965	0.07832418
4	0.09664144	0.17012205		0.0870679	0.07596598	0	0.06821013	0.13294412
5	0.09445725	0.18320735	0		0.08348686	0.07441164	0.06725315	0.08749535
6	0.09851715	0.15895693		0	0.08009005	0.0796434	0.07748248	0.07030237
7		0.18388981		0		0.09194018		0.06731229
8		0.08291265				0.12283261		0.07777171
PROMEDIO	0.09896391	0.2192669	0.05174936	0.05366197	0.09331314	0.09193188	0.07277869	0.08078824

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON b-act

Ratón	NGF		BDNF		NT-3		NT-4/5	
	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP
1	0.1324939	0.61108984	0.08557735	0.13981865	0.18710104	0.19944516	0.1031264	0.11777882
2	0.27401236	0.81345858	0.21565981	0.15370885	0.28928869	0.3048129	0.23446835	0.12628958
3	0.35099406	0.38887437	0.13237236	0.20017779	0.25750653	0.17953536	0.21261386	0.14663177
4	0.22563018	0.30277069		0.18208279	0.17735887	0.21582742	0.15925118	0.23660415
5	0.23350564	0.53138421			0.20638598	0.21435732	0.16625501	0.2537761
6	0.18399016	0.42782679			0.14957579	0.18795777	0.14470591	0.18921628
7		0.37593485				0.25687658		0.13760977
8		0.17339303						0.16264191
PROMEDIO	0.23343772	0.45309155	0.14453651	0.16894702	0.21120282	0.2226875	0.17007012	0.17131855

Pruebas estadísticas de NEUROTROFINAS 48 horas después de la última dosis de 3-NP (CONTROL vs 3-NP)

Unpaired t test	NGF		BDNF		NT-4/5		NT-3	
	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act
P value	0.0209	0.0246	0.076	0.5243	0.4108	0.9635	0.9481	0.676
P value summary	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=2.656 df=12	t=2.569 df=12	t=2.229 df=5	t=0.6842 df=5	t=0.8521 df=12	t=0.04677 df=12	t=0.06645 df=12	t=0.4294 df=11
How big is the difference?								
Mean ± SEM of CONTROL	0.09896 ± 0.003685 N=6	0.2334 ± 0.03064 N=6	0.1445 ± 0.03804 N=3	0.1445 ± 0.03804 N=3	0.07278 ± 0.002072 N=6	0.1701 ± 0.01933 N=6	0.09331 ± 0.01027 N=6	0.2112 ± 0.02144 N=6
Mean ± SEM of 3-NP	0.2193 ± 0.03873 N=8	0.4531 ± 0.06976 N=8	0.1689 ± 0.01363 N=4	0.1689 ± 0.01363 N=4	0.08079 ± 0.007913 N=8	0.1713 ± 0.01798 N=8	0.09193 ± 0.01615 N=8	0.2227 ± 0.01665 N=7
Difference between means	-0.1203 ± 0.04529	-0.2197 ± 0.08549	-0.02441 ± 0.03568	-0.02441 ± 0.03568	-0.008010 ± 0.009400	-0.001248 ± 0.02669	0.001381 ± 0.02079	-0.01148 ± 0.02675
95% confidence interval	-0.2190 to -0.02161	-0.4059 to -0.03338	-0.1161 to 0.06732	-0.1161 to 0.06732	-0.02849 to 0.01247	-0.05941 to 0.05691	-0.04391 to 0.04668	-0.07036 to 0.04739
R square	0.3703	0.3549	0.0856	0.0856	0.05706	0.0001823	0.0003678	0.01648
F test to compare variances								
F, DFn, Dfd	147.3, 7, 5	6.912, 7, 5	5.844, 2, 3	5.844, 2, 3	19.45, 7, 5	1.153, 7, 5	3.301, 7, 5	1.422, 5, 6
P value	< 0.0001	0.0491	0.1846	0.1846	0.0048	0.9069	0.2073	0.6743
P value summary	***	*	ns	ns	**	ns	ns	ns
Are variances significantly different?	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
Mann Whitney test								
P value	0.02	0.02			0.8518			
Exact or approximate P value?	Exact	Exact			Exact			
P value summary	*	*			ns			
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes			No			
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed			Two-tailed			
Sum of ranks in column C,D	27, 78	27, 78			43, 62			
Mann-Whitney U	6	6			22			

EXPRESIÓN RELATIVA DE RECEPTORES PARA NEUROTROFINAS OBTENIDAS POR DENSITOMETRÍA 1 HORA DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS DE 3-NP

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON 18S

Ratón	Trk A		Trk B+		Trk B-		Trk C		P75	
	CONTR OL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP
1	0.339462	0.41740416	0.47627094	0.5023991	0.5903059	0.1155570	1.6178355	1.8380764	0.0867091	0.1844462
2	0.431079	0.48505232	0.7855818	1.0016176	0.2178726	0.4749070	1.3389993	1.2259393	0.1801019	0.2087412
PROM.	0.385271	0.45122824	0.63092637	0.7520084	0.4040892	0.2952320	1.4784174	1.5320079	0.1334055	0.1965937

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON b-act

Ratón	Trk A		Trk B+		Trk B-		Trk C		P75	
	CONTROL	3-NP	CONTR OL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP
1	1.4341859	1.540970	2.012183	1.8547547	2.4939660	0.4266129	6.8351454	6.7858012	0.3663349	0.6809375
2	1.2256209	3.211225	2.233519	6.6310795	0.6194425	3.1440602	3.8069636	2.9160485	0.5120551	1.3819440
PROMEDIO	1.3299034	2.376098	2.122851	4.2429171	1.5567043	1.7853365	5.3210545	4.8509249	0.4391950	1.0314408

Pruebas estadísticas RECEPTORES PARA NEUROTROFINAS 1 hora después de la última dosis de 3-NP (CONTROL vs 3-NP)

Unpaired t test										
	Trk A		Trk B +		Trk B -		Trk C		p75	
	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act
P value	0.3664	0.3398	0.7201	0.4688	0.7149	0.9025	0.888	0.8659	0.3206	0.2399
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=1.158 df=2	t=1.243 df=2	t=0.4124 df=2	t=0.8868 df=2	t=0.4207 df=2	t=0.1385 df=2	t=0.1593 df=2	t=0.1914 df=2	t=1.310 df=2	t=1.654 df=2
How big is the difference?										
Mean ± SEM of CONTROL	0.3853 ± 0.04581 N=2	1.330 ± 0.1043 N=2	0.6309 ± 0.1547 N=2	2.123 ± 0.1107 N=2	0.4041 ± 0.1862 N=2	1.557 ± 0.9373 N=2	1.478 ± 0.1394 N=2	5.321 ± 1.514 N=2	0.1334 ± 0.04670 N=2	0.4392 ± 0.07286 N=2
Mean ± SEM of 3-NP	0.4512 ± 0.03382 N=2	2.376 ± 0.8351 N=2	0.7520 ± 0.2496 N=2	4.243 ± 2.388 N=2	0.2952 ± 0.1797 N=2	1.785 ± 1.359 N=2	1.532 ± 0.3061 N=2	4.851 ± 1.935 N=2	0.1966 ± 0.01215 N=2	1.031 ± 0.3505 N=2
Difference between means	-0.06596 ± 0.05694	-1.046 ± 0.8416	-0.1211 ± 0.2936	-2.120 ± 2.391	0.1089 ± 0.2588	-0.2286 ± 1.651	-0.05359 ± 0.3363	0.4701 ± 2.457	-0.06319 ± 0.04825	-0.5922 ± 0.3580
95% confidence interval	-0.3110 to 0.1791	-4.668 to 2.575	-1.385 to 1.142	-12.41 to 8.167	-1.005 to 1.222	-7.331 to 6.874	-1.501 to 1.394	-10.10 to 11.04	-0.2708 to 0.1444	-2.133 to 0.9482
R square	0.4015	0.4359	0.07836	0.2822	0.08129	0.009502	0.01254	0.01798	0.4616	0.5778
F test to compare variances										
F,DFn, Dfd	1.834, 1, 1	64.13, 1, 1	2.605, 1, 1	465.7, 1, 1	1.074, 1, 1	2.102, 1, 1	4.819, 1, 1	1.633, 1, 1	14.78, 1, 1	23.14, 1, 1
P value	0.8098	0.1582	0.7063	0.059	0.9772	0.7689	0.5442	0.8454	0.324	0.261
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Are variances significantly different?	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

EXPRESIÓN RELATIVA DE RECEPTORES PARA NEUROTROFINAS OBTENIDAS POR DENSITOMETRÍA 48 HORAS DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS DE 3-NP

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON 18S

Ratón	Trk A		Trk B+		Trk B-		Trk C		P75	
	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP
1			0.08716761	0.1077705	0.12058314	0.13561524	0.08434909	0.09395912		
2			0.1040677	0.08920065	0.11744937	0.11859759	0.08577991	0.09328151		
3			0.0998156	0.10374736	0.11796119	0.25776984	0.07434131	0.19177306		
4			0	0	0.11864695	0.15124167	0.11817912	0.13269239		
5			0	0	0.11214865	0.14384717	0.09566079	0.11070411		
6			0	0	0.12427679	0.10142335	0.09525334	0.09883016		
PROMEDIO			0.04850848	0.03758981	0.11851101	0.12978498	0.09226059	0.10303434		

EXPRESIÓN RELATIVA NORMALIZADA CON b-act

Ratón	Trk A		Trk B+		Trk B-		Trk C		P75	
	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP	CONTROL	3-NP
1			0.1137424	0.18948794	0.15734531	0.23844607	0.11006459	0.16520404		
2			0.32467107	0.17285818	0.36641929	0.22982526	0.26761672	0.18076629		
3			0.305181	0.18464191	0.3606602	0.48257443	0.22729468	0.35902096		
4					0.27700675	0.26916879	0.27591451	0.23615615		
5					0.27724016	0.38715943	0.23648089	0.29795609		
6					0.23209873	0.20734467	0.17789467	0.20204328		
PROMEDIO			0.24786482	0.18232934	0.27846174	0.30241977	0.21587768	0.24019113		

Pruebas estadísticas RECEPTORES PARA NEUROTROFINAS 48 horas después de la última dosis de 3-NP (CONTROL vs 3-NP)

Unpaired t test	Trk B +		Trk B -		Trk C	
	18S	b-act	18S	b-act	18S	b-act
P value	0.6929	0.3864	0.1754	0.6719	0.125	0.5551
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	No	No	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0.4247 df=4	t=0.9712 df=4	t=1.458 df=10	t=0.4363 df=10	t=1.674 df=10	t=0.6107 df=10
How big is the difference?						
Mean ± SEM of CONTROL	0.09702 ± 0.005075 N=3	0.2479 ± 0.06730 N=3	0.1185 ± 0.001628 N=6	0.2785 ± 0.03231 N=6	0.09226 ± 0.006105 N=6	0.2159 ± 0.02548 N=6
Mean ± SEM of 3-NP	0.1002 ± 0.005640 N=3	0.1823 ± 0.004938 N=3	0.1514 ± 0.02251 N=6	0.3024 ± 0.04440 N=6	0.1202 ± 0.01553 N=6	0.2402 ± 0.03060 N=6
Difference between means	-0.003223 ± 0.007588	0.06554 ± 0.06748	-0.03290 ± 0.02256	-0.02396 ± 0.05491	-0.02795 ± 0.01669	-0.02431 ± 0.03982
95% confidence interval	-0.02429 to 0.01784	-0.1218 to 0.2529	-0.08318 to 0.01737	-0.1463 to 0.09839	-0.06513 to 0.009239	-0.1130 to 0.06440
R square	0.04315	0.1908	0.1754	0.01868	0.219	0.03595
F test to compare variances						
F,DFn, Dfd	1.235, 2, 2	185.7, 2, 2	191.2, 5, 5	1.889, 5, 5	6.475, 5, 5	1.442, 5, 5
P value	0.8949	0.0107	< 0.0001	0.5021	0.0612	0.6977
P value summary	ns	*	***	ns	ns	ns
Are variances significantly different?	No	Yes	Yes	No	No	No
Mann Whitney test						
P value		0.7	0.1797			
Exact or approximate P value?		Exact	Exact			
P value summary		ns	ns			
Are medians signif. different? (P < 0.05)		No	No			
One- or two-tailed P value?		Two-tailed	Two-tailed			
Sum of ranks in column C,D		12 , 9	30 , 48			
Mann-Whitney U		3	9			

RESULTADOS PCR EN TIEMPO REAL

EXPRESIÓN RELATIVA OBTENIDA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y NORMALIZADA CON 18S

NEUROTROFINAS 1 HORA DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS DE 3-NP ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Ratón	NGF		BDNF		NT-3		NT-4/5	
	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP
1	0.9982701 3	1.1995573 8	0.7597147 8	1.5194295 5	1.1070974 4	0.7720585 7	0.9367864 5	0.7932195 3
2	1.0017358 7	1.856393	1.4625944 4	1.4676722	0.9117955 1	0.3431193 1	1.0723620 8	0.5550894 2
3		1.2504974 9		2.3595795 1		0.5309994 3		0.7426694 4
PROMEDIO	1.000003	1.4354826 3	1.1111546 1	1.7822270 9	1.0094464 8	0.5487257 7	1.0045742 6	0.6969928

RECEPTORES 1 HORA DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS DE 3-NP ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Ratón	Trk A		Trk B+		Trk B-		Trk C		p75	
	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP
1	0.8724193 7	2.4761414	1.6328838 9	0.3808836 3	0.8609823 6	2.0195802 6	1.3408964 2	0.9884211 5	1.0664419 4	2.1181509 8
2	1.1712862 5	2.05351246	0.7206757 5	0.9249339 2	1.1925547 3	5.5176558 8	0.7973017 8	0.9952961 7	0.9413515	3.2779763 1
3		1.2728776		0.6230510 2		2.7588279 4		1.0967219 4		2.9136052 5
PROMEDIO	1.0218528 1	1.93417715	1.1767798 2	0.6429561 9	1.0267685 2	3.4320213 6	1.0690991	1.0268130 9	1.0038967 2	2.7699108 5

EXPRESIÓN RELATIVA OBTENIDA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y NORMALIZADA CON 18S

NEUROTROFINAS 48 HORAS DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS ($2^{-(MENOS DDcT)}$)

Ratón	NGF		BDNF		NT-3		NT-4/5	
	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP
1	1.01050606	1.29690965	1.09873935	0.85384448	1.05864357	1.83047356	1.00347778	1.50525579
2	0.98971015	1.30593037		0.40389305		1	1.28986219	0.98971015
3	1.08641747	0.50876734	1.3122524	0.81059053		1	2.02401073	1
4	0.85856544	0.93303299	0.73713461	0.4927217	0.98296816	1.33844184	1.42018765	0.86453723
5		0.3842188		0.65067093		1	0.91705361	1
6		0.11033787						0.93303299
PROMEDIO	0.98903982	0.75653284	1.02962527	0.64234414	1.00832235	1.47996838	1.08267511	1.37358403

RECEPTORES 48 HORAS DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS ($2^{-(MENOS DDcT)}$)

Ratón	Trk A		Trk B+		Trk B-		Trk C		p75	
	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP	Control	3-NP
1	1	1.17352101	0.91465977	0.79075743	1.13728031	1.49028462	0.87631169	3.03041632	1.19255473	8.07832105
2	1	2.08615112	0.98971015	2.02975712		1	1.42957656	1	3.86244932	1
3	1	1.71813533	1	1.53826825	0.86602142	1.95285914	1.07834409	2.71229858	0.73164702	5.25632865
4	1	3.36358566	1.2397077	1.09116075		1	4.47682095	1	2.25011697	1
5	1		1	3.60500185		1	2.87283398	1	1.47606066	
6						0.40401328				
PROMEDIO	1	2.08534828	1.02881552	1.81098908	1.00066035	2.10439809	0.99093116	2.66626837	0.98105044	6.0971038

**Pruebas estadísticas NEUROTROFINAS 1 y 48 horas después de la última dosis de 3-NP
(CONTROL vs 3-NP, expresión normalizada con 18S)**

Unpaired t test	NGF		BDNF		NT-4/5		NT-3	
	1 HORA	48 HORAS	1 HORA	48 HORAS	1 HORA	48 HORAS	1 HORA	48 HORAS
P value	0.2081	0.3333	0.2374	0.016	0.0628	0.282	0.0792	0.0456
P value summary	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	No	No	Yes	No	No	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=-1.599 df=3	t=-1.022 df=9	t=-1.472 df=3	t=3.041 df=8	t=2.894 df=3	t=1.144 df=9	t=2.617 df=3	t=-2.365 df=8
How big is the difference?								
Mean ± SEM of CONTROL	1.000 ± 0.001733 N=2	0.9890 ± 0.03680 N=5	1.111 ± 0.3514 N=2	1.030 ± 0.09273 N=5	1.005 ± 0.06779 N=2	1.083 ± 0.08441 N=5	1.009 ± 0.09765 N=2	1.008 ± 0.01301 N=5
Mean ± SEM of 3-NP	1.435 ± 0.2110 N=3	0.7565 ± 0.2035 N=6	1.782 ± 0.2891 N=3	0.6423 ± 0.08728 N=5	0.6970 ± 0.07244 N=3	1.374 ± 0.2194 N=6	0.5487 ± 0.1241 N=3	1.480 ± 0.1990 N=5
Difference between means	-0.4355 ± 0.2724	0.2325 ± 0.2274	-0.6711 ± 0.4559	0.3873 ± 0.1273	0.3076 ± 0.1063	-0.2909 ± 0.2542	0.4607 ± 0.1760	-0.4716 ± 0.1994
95% confidence interval	-1.302 to 0.4312	-0.2820 to 0.7470	-2.122 to 0.7797	0.09363 to 0.6809	-0.03064 to 0.6458	-0.8659 to 0.2841	-0.09937 to 1.021	-0.9315 to - 0.01181
R square	0.4601	0.104	0.4193	0.5362	0.7362	0.127	0.6955	0.4115
F test to compare variances								
F,DFn, Dfd	22232, 2, 1	36.70, 5, 4	1.015, 2, 1	1.129, 4, 4	1.713, 2, 1	8.105, 5, 4	2.424, 2, 1	234.1, 4, 4
P value	0.0095	0.0039	1	0.9094	0.9507	0.0644	0.827	0.0001
P value summary	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	***
Are variances significantly different?	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes
Mann Whitney test								
P value	0.2	0.5368						0.1388
Exact or approximate P value?	Exact	Exact						Gaussian Approximation
P value summary	ns	ns						ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	No						No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed						Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	34 , 32	34 , 32						20 , 35
Mann-Whitney U	3	11						5

Pruebas estadísticas RECEPTORES PARA NEUROTROFINAS 1 y 48 horas después de la última dosis de 3-NP (CONTROL vs 3-NP, expresión normalizada con 18S)

Unpaired t test	Trk A		Trk B +		Trk B -		Trk C		p75	
	1 HORA	48 HORAS	1 HORA	48 HORAS	1 HORA	48 HORAS	1 HORA	48 HORAS	1 HORA	48 HORAS
P value	0.1466	Falló prueba de normalidad	0.2704	0.1549	0.1796	0.1179	0.8516	0.003	0.0285	0.0262
P value summary	ns		ns	ns	ns	ns	ns	**	*	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=-1.948 df=3		t=1.348 df=3	t=1.571 df=8	t=-1.743 df=3	t=1.729 df=9	t=0.2037 df=3	t=-4.204 df=8	t=-3.973 df=3	t=-2.931 df=6
How big is the difference?										
Mean ± SEM of CONTROL	1.022 ± 0.1494 N=2		1.177 ± 0.4561 N=2	1.029 ± 0.05509 N=5	1.027 ± 0.1658 N=2	1.001 ± 0.04289 N=5	1.069 ± 0.2718 N=2	0.9909 ± 0.03242 N=5	1.004 ± 0.06255 N=2	0.9811 ± 0.09472 N=4
Mean ± SEM of 3-NP	1.934 ± 0.3524 N=3		0.6430 ± 0.1574 N=3	1.811 ± 0.4950 N=5	3.432 ± 1.064 N=3	2.104 ± 0.5764 N=6	1.027 ± 0.03501 N=3	2.666 ± 0.3972 N=5	2.770 ± 0.3424 N=3	6.097 ± 1.743 N=4
Difference between means	-0.9123 ± 0.4684		0.5338 ± 0.3960	-0.7822 ± 0.4980	-2.405 ± 1.380	-1.104 ± 0.6384	0.04229 ± 0.2076	-1.675 ± 0.3985	-1.766 ± 0.4445	-5.116 ± 1.745
95% confidence interval	-2.403 to 0.5782		-0.7264 to 1.794	-1.931 to 0.3663	-6.796 to 1.985	-2.548 to 0.3402	-0.6182 to 0.7028	-2.594 to 0.7563	-3.181 to -0.3515	-9.387 to 0.8450
R square	0.5584		0.3772	0.2357	0.5032	0.2493	0.01365	0.6884	0.8403	0.5888
F test to compare variances										
F,DFn, Dfd	8.344, 2, 1		5.600, 1, 2	80.72, 4, 4	61.83, 2, 1	216.7, 5, 4	40.18, 1, 2	150.1, 4, 4	44.96, 2, 1	338.6, 3, 3
P value	0.4755		0.2832	0.0009	0.1791	0.0001	0.048	0.0003	0.2097	0.0005
P value summary	ns		ns	***	ns	***	*	***	ns	***
Are variances significantly different?	No		No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Mann Whitney test										
P value		0.0108		0.2087		0.08	0.8	0.0112		0.0294
Exact or approximate P value?		Gaussian Approximation		Gaussian Approximation		Gaussian Approximation	Exact	Gaussian Approximation		Gaussian Approximation
P value summary		*		ns		ns	ns	*		*
Are medians signif. different? (P < 0.05)		Yes		No		No	No	Yes		Yes
One- or two-tailed P value?		Two-tailed		Two-tailed		Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed		Two-tailed
Sum of ranks in column C,D		15, 30		21, 34		20, 46	15, 35	15, 40		10, 26
Mann-Whitney U		0		6		5	3	0		0

Referencias bibliográficas.

1. Alberch J., E. Perez-Navarro y J. M. Canals, 2004. Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog. Brain Res.*, 146: 195-229.
2. Alston T., Mela L. y Brig H. J., 1977. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate deshidrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:3767-3771.
3. Applied Biosystems, 2009. Real-Time PCR vs Traditional PCR. USA. pp. 15. Tomado de: www.appliedbiosystems.com/support/.../pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf
4. Ardelt A.A., N.A. Flaris y K.A. Roth, 1994. Neurotrophin-4 selectively promotes survival of striatal neurons in organotypic slice culture. *Brain Res.*, 647: 340-344.
5. Arévalo J.C. y S.H. Wu, 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 1523–1537.
6. Armanini M. P., S.B. McMahon, J. Sutherland, D.L. Shelton y H.S. Phillips, 1995. Truncated and catalytic isoforms of Trk B are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS. *Eur. J. Neurosci.*, 7:1403-1409.
7. Asal C. M., 1997. Las neurotrofinas. *Salud Mental*, 20(2): 55-59.
8. Barbacid M., 1995. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 766: 442-458.
9. Beck K. D., F. Lamballe, R. Klein, M. Barbacid, P.E. Schaufwecker, T.H. McNeill, C.E. Finch, F. Hefti y J.R. Day, 1993. Induction of noncatalytic Trk B neurotrophin receptors during axonal sprouting in the adult hippocampus. *J. Neurosci.*, 13: 4001-4014.
10. Beers M.H, A.J. Fletcher, T.V. Jones, R. Porter, M. Berkwits y J.L. Kaplan (MSD), 2008. Nuevo manual Merck de información médica general. Editorial Océano. España. pp. 521-522.
11. Benítez-Burraco A., 2009. Enfermedad de Huntington: fundamentos moleculares e implicaciones para una caracterización de los mecanismos neuronales responsables del procesamiento lingüístico. *Rev Neurol*, 48 (2):75-84.
12. Benjamini, Y., 1988. Opening the Box of a Boxplot. *The American Statistician*, 42(4): 257-262.

13. Bibel M., E. Hoppe y Yves-Alain Barde, 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.*, 18 (3): 616-622.
14. Biffo S., N. Offenhauser, B.D. Carter y Y.A. Barde, 1995. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development*, 121:2461-2470.
15. Bio-Rad, 2006. Real Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc, USA. pp. 2-3.
16. Blum D., M.C. Galas, D. Gall, L. Cuvelier y S. N. Schiffmann, 2002. Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, 10: 410-426.
17. Boda E., A. Pini, E. Hoxha, R. Parolisi y F. Tempia, 2009. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Studies in Mouse Brain *J. Mol. Neurosci.*, 37: 238-253.
18. Bonini P., Pierucci D., Cicconi S., Porzio O., Lauro R., Marlier L.N. y Borboni P., 2001. Neurotrophins and neurotrophin receptors mRNAs expression in pancreatic islets and insulinoma cell lines. *JOP*, 2(3):105-111.
19. Borlongan C. V., T.K. Koutouzis, T.S. Randall, T.B. Freeman, D.W. Cahill y P. R. Sanberg, 1995. Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain Res. Bull.*, 36: 549-556.
20. Bosch, M. P., 2005. Terapia celular en modelos de la enfermedad de Huntington. Tesis Doctorado en Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona. España. 172 pp.
21. Brouillet E., Conde F., Beal M.F., Hantraye P. 1999. Replicating Huntington's Disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.*, 59:427-468.
22. Brustovetsky N., R. LaFrance, K.J. Purl, T. Brustovetsky, C.D. Keene y W.C. Low, 2005. Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's disease. *J. Neurochem.*, 93: 1361-1370.

23. Bustin S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, 29: 23-39.
24. Calvo A. C., M. Moreno-Igoa, R. Manzano, L. Ordovás, G. Yagüe, S. Oliván, M.J. Muñoz, P. Zaragoza y R. Osta, 2008. Determination of protein and RNA expression levels of common housekeeping genes in a mouse model of neurodegeneration. *Proteomics*, 8: 4338-4343.
25. Canals J.M., J.R. Pineda, J. F. Torres-Peraza, M. Bosch, R. Martín-Ibañez, M.T. Muñoz, G. Mengod, P. Ernfors y J. Alberch, 2004. Brain-Derived Neurotrophic Factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington 's disease. *J. Neurosci.*, 24(35):7727–7739.
26. Canals J.M., N. Checa, S. Marco, A. Michels, E. Perez-Navarro y J. Alberch, 1999. The neurotrophin receptors Trk A, Trk B y Trk C are differentially regulated after excitotoxic lesion in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 69:242-248.
27. Canals J.M., N. Checa, S. Marco, P. Akerud, A. Michels, E. Perez-Navarro, E. Tolosa, E. Arenas y J. Alberch, 2001. Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in cortical neurons is regulated by striatal target area. *J. Neurosci.*, 21:117-124.
28. Canals J.M., S. Marco, N. Checa, A. Michels, E. Pérez-Navarro, E. Arenas y J. Alberch, 1998. Differential Regulation of the Expression of Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, and Neurotrophin-3 after Excitotoxicity in a Rat Model of Huntington's Disease. *Neurobiol. Dis.*, 5:357-364.
29. Canudas A.M., S. Pezzi, J.M. Canals, M. Pallàs y J. Alberch, 2005. Endogenous brain-derived neurotrophic factor protects dopaminergic nigral neurons against transneuronal degeneration induced by striatal excitotoxic injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 134: 147-154.
30. Chao M. V., 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4: 299-309.

31. Checa N., J. Canals, E. Gratacos y J. Alberch, 2001. Trk B and TRC are differentially regulated by excitotoxicity during development of the basal ganglia. *Exp. Neurol.*, 172: 282-292.
32. Chia-Lin Wu, Shang-Der Chen, Chi-Shin Hwang y Ding-I Yang, 2009. Sonic hedgehog mediates BDNF-induced neuroprotection against mitochondrial inhibitor 3-nitropropionic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 385: 112-117.
33. Coles C. J., Edmondson D.E. y Singer T.P., 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-Nitropropionate. *J. Biol. Chem.*, 254: 5161-5167.
34. Connor B. , D. Young, P. Lawlor, W. Gai, H. Waldvogel, R.L. Faull y M. Dragunow, 1996. Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 42: 1-17.
35. Connor B. y M. Dragunow, 1998. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Rev.*, 27:1-39.
36. Cooper A J., G. Schilling, M. F. Peters, W. J. Herring, A.H. Sharp, Z. Kaminky, J. Masone, F.A. Khan, M. Delaney, D.R. Borchelt, V.L. Dawson, T.M. Dawson y C.A. Ross, 1998. Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum. Mol. Genet.*, 7: 783-790.
37. Cui Q., 2006. Actions of Neurotrophic Factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Mol. Neurobiol.*, 33: 155-179.
38. Dalbem A., C. Volkweis, M. Franzen, R. Vaz, C. Von Werne, A. P. Bartmann y J. Costa, 2005. Altered distribution of striatal activity-dependent synaptic plasticity in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res.*, 1047: 148, 158.
39. Dawbarn D. y S.J. Allen, 2003. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 29:211-230.
40. Dechant G. y Yves-Alain Barde, 2002. The neurotrophin receptor p75^{NTR}: novel functions and implications for disease of the nervous system. *Nat. Neurosci.*, 5(11): 1131-1136.

41. Deogracias P. R., 2007. *Regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas Trk B en células nerviosas. Mecanismos moleculares e implicaciones biológicas*. Tesis doctoral. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols". UAM. pp. 137.
42. Djousse L., B. Knowlton, M. Hayden, E.W. Almqvist, R. Brinkman y C. Ross, 2003. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am. J. Med. Genet.*, 119(A): 279-282.
43. Ernfors P., J. Bengzon, Z. Kokaia, H. Persson y O. Lindvall, 2004. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron*, 7(1): 165-176.
44. Ferrer I., E. Goutan, C. Marín, M.J. Rey y T. Ribalta, 2000. Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res.*, 866: 257-261.
45. Flori P, B. Belleste, F. Durand, H. Raberin, C. Cazorla, J. Hafid, F. Lucht y R. Manh Sung, 2004. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J. Med. Microbiol.*, 53: 603-607.
46. Friedman W.J. y L.A. Greene, 1999. Neurotrophin Signaling via Trks and p75. *Exp. Cell Res.*, 253:131-142.
47. Friedman W.J., 2000. Neurotrophins Induce Death of Hippocampal Neurons via the p75 Receptor. *J. Neurosci.*, 20 (17): 6340-6346.
48. Frigge M., D. C. Hoaglin y B. Iglewicz, 1989. Some Implementations of the Boxplot. *The American Statistician*, 43(1): 50-54.
49. Fusco F.R., C. Zuccato, M. Tartari, A. Martorana, Z. De March, C. Guampà, E. Cattaneo y G. Bernardi, 2003. Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 18(5): 1093-1102.
50. García M.J.M., 2007. *Mecanismos intracelulares de supervivencia y muerte neuronal en modelos excitotóxicos y transgénicos de la enfermedad de Huntington*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, España. 1-46 pp.

51. Gilsbach R., M. Kouta, H. Bönisch y M. Brüss, 2006. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *BioTechniques*, 40: 173-177.
52. Ginés S., M. Bosch, S. Marco, N. Gavalda, M. Díaz-Hernández, J.J. Lucas y J.M. Canals y J. Alberch, 2006. Reduced expression of the Trk B receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *Eur. J. Neurosci.*, 23:649–658.
53. Greferath U., C. Mallard, E. Roufail, S.M. Rees, G.L. Barrett y P.F. Bartlett, 2002. Expression of the p75 neurotrophin receptor by striatal cholinergic neurons following global ischemia in rats is associated with neuronal degeneration. *Neurosci. Lett.*, 332(1):57-60.
54. Hanbury R., V. Charles, E. Y. Chen, L. Leventhal, J.M. Rosenstein, E.J. Mufson y J.H. Kordower, 2002. Excitotoxic and metabolic damage to the rodent striatum: role of the P75 neurotrophin receptor and glial progenitors. *J. Comp. Neurol.*, 444(4):291-305.
55. Harper P. S., 1992. The epidemiology of Huntington's disease. *Hum. Genet.*, 89: 365-376.
56. Hassink G.C., K.E. Van Esseveldt, P.A. Dijkhuizen, J. Verhaagen y G.J Boer, 1999. Ontogeny of neurotrophin receptor Trk C expression in the rat forebrain and anterior hypothalamus with emphasis on the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 92(2): 705-712.
57. Hennigan A., R.M. O'Callaghan y A.M. Kelly, 2007. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem. Soc. Trans.*, 35 (2): 424-427.
58. Hernández A., P.M. Vasallo A. Torres y E. Salido, 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*, 14(2): 145-162.
59. Hernández-Echeagaray E., 2004. Avances sobre la Neurobiología de la Enfermedad de Huntington. En: Temas Selectos de Neurociencias III. Ed. Javier Velázquez Moctezuma, Editorial UAM. ISBN 970-31-0244-1. pp. 33-41.
60. Hernández-Echeagaray E., en proceso. Advances in the neurobiology of Huntington's disease. Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala. México.

61. Hiltunen J. O., A. Laurikainen, A. Väkevä, S. Meri y M. Saarma, 2001. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *Am. J. Pathol.*, 194:247-253.
62. Ho L.W., J. Carmichael, J. Swartz, A. Wytttenbach, J. Rankin y D.C. Rubinstein, 2001. The molecular biology of Huntington's disease. *Psychol. Med.*, 31: 3-14.
63. Hofer M. S. R. Pagliusi, A. Hohn, J. Leibrock y Yves-Alain Barde, 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.*, 9 (8): 2459-2464.
64. Holtzman D.M., Y. Li, L.F. Parada, S. Kinsman, C.K. Chen, J.S. Valletta, J. Zhou, J.B. Long y W.C. Mobley, 1992. p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron*, 9: 465 – 478.
65. Hong-Tian Zhang, Li-Yan Li, Xiao-Li Zou, Xin-Bo Song, Yan-Li Hu, Zhong-Tang Feng y Tim Ting-Hua Wang, 2007. Immunohistochemical Distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in Adult Rhesus Monkey Brains. *J. Histochem. Cytochem.*, 55(1): 1–19.
66. Huang L., G. Sun, D. Cobessi, A. Wang, J. T. Shen, E. Y. Tung, V. E. Anderson y E. A. Berry, 2006. 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex ii, forms a covalent adduct with a catalytic-base arginine in the active site of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 9: 5965-5972.
67. Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. NEUROTROPHINS: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24:677-736.
68. Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2003. Trk receptors: roles in neuronal Signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 72: 609-642.
69. Huggett J. K. Dheda, S. Bustin y A. Zumla, 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.*, 6: 279-284.
70. Humbert S. y F. Saudou, 2005. Huntington's disease: intracellular signaling pathways and neuronal death. *J. Soc. Biol.*, 199: 247-51.
71. Ip N.Y., C.F. Ibañez, S.H. Nye, J. McClain, P.F. Jones, D.R. Gies, L. Belluscio, M.M. Le Beau, R. Espinosa y S.P. Squinto, 1992. Mammalian

- neurotrophin-4 structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 3060-3064.
72. Isackson P.J., 1995. Trophic factor response to neuronal stimuli or injury. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5:350-357
73. Jung A. B. y J.P. Jr. Bennett, 1996. Development of striatal dopaminergic function. III: Pre- and postnatal development of striatal and cortical mRNAs for the neurotrophin receptors Trk BTK1 and Trk C and their regulation by synaptic dopamine. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 94: 133–143.
74. Kandel E., J.H. Schwartz y T.M. Jessell, 2001. Principios de neurociencia. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, cuarta edición. España. pp. 853-867.
75. Kawaguchi Y., 1993. Physiological, Morphological and Histochemical Characterization of three Classes of Interneurons in Rat Neostriatum. *J. Neurosci.*, 13:4908-4923.
76. Kawakami T., Wakabayashi Y., Isono T., Aimi Y. y Okada Y., 2002. Expression of neurotrophin messenger RNAs during rat urinary bladder development. *Neurosci. Lett.*, 329: 77-80.
77. Kim JYH, Sutton ME, Lu DT, Cho TA, Goumnerova LC, et al. 1999. Activation of neurotrophin-3 receptor Trk C induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res.*, 59:711–19
78. Klein R., D. Martín-Zanca y M. Barbacid, 1990. Expression of the tyrosine kinase receptor gene Trk B is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development*, 109:845-850.
79. Kumanogoh H. J. Asami, S. Nakamura y T. Inoue, 2008. Balanced expression of various Trk B receptor isoforms from the Ntrk2 gene locus in the mouse nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.*, 39: 465-477.
80. Lee F.S. y M.V. Chao, 2001. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Neurobiology*, 98 (5): 3555-3560.
81. Lee P.D., R. Sladek, C.M. Greenwood y T.J. Hudson, 2002. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res.*, 12: 292-297.

82. Leßmann V., 1998. Neurotrophin-Dependent Modulation of Glutamatergic Synaptic Transmission in the Mammalian CNS. *Gen. Pharmacol.*, 31(5): 667–674.
83. Lorigados-Pedre L. y J. Bergado-Rosado, 2004. El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurador. *Rev Neurol*, 38 (10): 957-971
84. Macdonald R., S. Bingham, B.C. Bond, A.A. Parsons y K.L. Philpott, 2001. Determination of changes in mRNA expression in a rat model of neuropathic pain by *TaqmanE* quantitative RT-PCR. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 90: 48-56.
85. Martín-Zanca D., M. Barbacid y L.F. Parada, 1990. Expression of the trk protooncogen is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev.*, 4: 683-694.
86. McAllister A.K., Lo D.C. y Katz L.C., 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15:791-803.
87. McGill R., J.W. Turkey y W.A. Larsen, 1978. Variations of Box Plots. *The American Statistician*, 32(1): 12-16.
88. McPherson M.J., B.D. Hames y G.R. Taylor, 2008. *PCR a Practical Approach*. Ed. Oxford University Press, USA.
89. Menei P., J.M. Pean, V. Neriére-Daguin, C. Jollivet, P. Brachet y J.P. Benoit, 2000. Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage. *Exp. Neurol.*, 161:259–272.
90. Merlio J. P., P. Ernfors, M. Jaber y H. Persson, 1992. Molecular cloning of rat Trk C and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 51: 513–532.
91. Mi-Kyung Lee y Hye-Ryoun Kim, 2006. Comparison between Real-Time PCR and Agarose Gel Electrophoresis for DNA Quantification. *Korean J. Lab. Med.*, 26:217-22.
92. Miranda B. J. A., 2008. *Estudio Electrofisiológico de la modulación en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal por la neurotrofina 3 (NT-3) en un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington*. Tesis de

- Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo. FES-Cuautitlán, UNAM. México. 75 pp.
93. Mobley W.C., J.E. Woo, R.H. Edwards, R.J. Riopelle, F.M. Longo, G. Weskamp, U. Otten, J.S. Valletta y M.V. Johnston, 1989. Developmental regulation of nerve growth factor and its receptor in the rat caudate-putamen. *Neuron*, 3(5): 655-664.
 94. Mobley W.C., J.L. Rutkowski, G.I. Tennekoon, K. Buchanan y M.V. Johnston, 1985. Choline acetyl-transferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science*, 229: 284-287.
 95. Moris G. y J. A. Vega, 2003. Revisión: Factores neurotróficos: fundamentos para su aplicación clínica. *Neurología*, 18 (1): 18-28.
 96. Nawa H., J. Carnahan y C. Gall, 1995. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur. J. Neurosci.*, 7:1527-1535.
 97. Nockher W. A. y Renz H., 2005. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clin. Chim. Ac.*, 352: 49–74.
 98. Nolan T. R.E. Hands y S.A. Bustin, 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1(3): 1558-1582.
 99. Numan S., C.M. Gall y K.B. Seroogy, 2005. Developmental Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Postnatal Rat Ventral Midbrain. *J. Mol. Neurosci.*, 27: 245-260.
 100. Nykjaer A., T.E. Willnow y C.M. Petersen, 2005. p75NTR – live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 15: 49-57.
 101. Pasantés H., 1999. Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. Fondo de cultura económica. México. pp. 117-131.
 102. Pattarawarapan, M. y Burgess K., 2003. Molecular Basis of Neurotrophin-Receptor Interactions. *J. Med. Chem.*, 46 (25): 5277-5291.
 103. Pérez-Navarro E. y J. Alberch, 1995. Protective role of nerve growth factor against excitatory amino acid injury during neostriatal cholinergic neurons postnatal development. *Exp. Neurol.*, 135(2): 146-152.
 104. Pérez-Navarro E., A.M. Canudas, P. Akerund, J. Alberch y E. Arenas, 2000. Brain-derived neurotrophin factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5

- prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J. Neurochem.*, 75:2190-2199.
105. Pérez-Navarro E., J. Alberch, I. Neveu y E. Arenas, 1999. Brain-derived neurotrophin 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.
 106. Pérez-Navarro E., N. Gavalda, E. Gratacos y J. Alberch, 2005. Brain-derived factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J. Neurochem.*, 92:678-691.
 107. Pfaffl M.W., 2004. *Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. In: A-Z of quantitative PCR.* SA. Bustin Editor. IUL, La Jolla. USA. pp. 87-112.
 108. Pineda M.J.R., J.M. Canals, M. Bosch, A. Adell, G. Mengod, F. Artigas, P. Ernfors y J. Alberch, 2005. Brain-derived neurotrophic factor modulates dopaminergic deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.*, 93: 1057-1068.
 109. Pineda, M. J. R., 2006. Implicación de los factores neurotróficos en la fisiopatología y protección de la enfermedad de Huntington. Tesis Doctorado en Biología. Universidad de Barcelona. España. 183 pp.
 110. Poo M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2:24-32.
 111. Purves D., G.J Augustine, D. Fitzpatrick, L.C. Katz, A. LaMantia, J. McNamara y S.M. Williams, 2001. *Neurosciencie.* Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc. USA. Fig. 18.1.
 112. Qin Dan Xia, Xiao li Zou, Wei Luo, Wei Zhang, Hong Tian Zhang, Xiao Li Li, Han Zhang, Xu Yang Wang y Ting-Hua Wang, 2006. Expression of some neurotrophins in the spinal motoneurons after cord hemisection in adult rats. *Neurosci. Lett.*, 410:222-227.
 113. Rajput S. P., Geentajali K., Rishi R.K., Ujendra K. 2009. Colocalization of dopamine receptor subtypes with dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) in rat brain. *Neurosci. Res.*, 65: 53-63.

114. Rhinn H., C. Marchand-Leroux, N. Croci, M. Plotkine, D. Scherman y V. Escriou, 2008. Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury. *BMC Mol. Biol.*, 9 (62): 1-12.
115. Robinson T.L., I.A. Sutherland y J. Sutherland, 2007. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 115: 160-165.
116. Rocamora N., L. Massieu, H.W.G.M. Boddeke, J.M. Palacios y G. Mengod, 1994. Differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in adult rat brain after intrahippocampal injection of quinolinic acid. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 26:89-98.
117. Ross C.A., 2002. Polyglutamine Pathogenesis: Emergence of unifying mechanisms for Huntington's Disease and related disorders. *Neuron*, 35:819-822.
118. Ross C.A., 2004. Huntington's disease: new paths to pathogenesis. *Cell*, 118: 4-7.
119. Rubinsztein D.C., J. Leggo, M. Chiano, A. Dodge, G. Norbury y E. Rosser, 1997. Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 3872-3876.
120. Rubinsztein D.C., W. Amos, J. Leggo, S. Goodburn, R.S. Ramesar, J. Old, R. Bontrop, R. McMahon, D.E. Barton y M.A. Ferguson-Smith, 1994. Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nat. Genet.*, 7: 525.
121. Salin T., G. Mudò, X.H. Jiang, T. Timmusk, M. Metsis y N. Belluardo, 1995. Up-regulation of Trk B mRNA expression in the rat striatum after seizures. *Neurosci. Lett.*, 194: 181-184.
122. Saporito M.S., H.M. Wilcox, K. C. Hartpence, M. E. Lewis, J.L. Vaught y S. Carswell, 1993. Pharmacological induction of Nerve Growth Factor mRNA in Adult Rat Brain. *Exp. Neurol.*, 123:295-302.

123. Saulle E. P. Gubellini, B. Picconi, D. Centonze, D. Tropepi, A. Pisan, M. Morari, M. Marti, L. Rossi, M. Papa, G. Berdardi y P. Calabresi, 2004. Neuronal vulnerability following inhibition of mitochondrial complex II: a possible ionic mechanism for Huntington's disease. *Mol. Cell. Neurosci.*, 25:9-20.
124. Segal R. A., 2003. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu. Rev. Neurosci.*, 26: 299-330.
125. Selvey S., E.W. Thompson, K. Matthaei, R.A. Lea, M.G. Irving y L.R. Griffiths, 2001. β -Actin- an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol. Cell. Probes*, 15: 307-311.
126. Shelton D.L. y L.F. Reichardt, 1986. Studies on the expression of the 13 nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: Level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. *Neurobiology*, 83: 2714-2718.
127. Shen H., Cheng J.M. y Cheng K., 1999. Expression of neurotrophin mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 64: 186–192.
128. Siegel G. J., Agranoff B. W., Wayne R., Fisher S. T. y Uhler M., 1999. Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. 6° Edición. Lippincott Williams and Wilkins. USA. pp. 45-46.
129. Sieradzan K. A., A.O. Mechan, L. Jones, E.E. Wanker, N. Nukina y D.M. Mann, 1999. Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp. Neurol.* 156(1): 92–99.
130. Sieradzan K.A. y D.M. Mann, 2001. The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 27: 1-21.
131. Smeyne R.J., R. Klein, A. Schnapp, L.K. Long, S. Bryant, A. Lewin, S.A. Lira y M. Barbacid, 1994. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature*, 368: 246 – 249.
132. Takeda A., T. Onodera, A. Sugimoto, K. Kogure, M. Obinata y S. Shibahara, 1993. Coordinated expression of messenger RNAs for Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in

- the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience*, 55 (1): 23-31.
133. Tang Shang-Tie, X. Chen X., J. Liu y I. Bezprozvanny, 2007. Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, 27(30): 7899-7910.
 134. Tasset I., F. Sánchez y I. Túnez, 2009. Bases moleculares de la enfermedad de Huntington: papel del estrés oxidativo. *Rev Neurol*, 49 (8): 424-429.
 135. Tauszig-Delamasure S., Li-Ying Yu, J.R. Cabrera, J. Bouzas-Rodriguez, C. Mermet-Bouvier, C. Guix, Marie-Claire Bordeaux, U. Arumaë y P. Mehlen, 2007. The Trk C receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(33): 13361-13366.
 136. Thellin O., W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout y E. Heinen, 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 75: 291-295.
 137. Timmusk T., N. Belluardo, M. Metsis y H. Persson, 1993. Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur. J. Neurosci.*, 5:605-613.
 138. Túnez I. y A. Santamaría, 2009. Modelo de enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico. *Rev Neurol*, 48: 430-434.
 139. Underwood C.K. y E.J. Coulson, 2008. The p75 neurotrophin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40: 1664-1668.
 140. Venero J.L., K.D. Beck y F. Hefti, 1994. Intrastratial infusion of nerve growth factor after quinolinic acid prevents reduction of cellular expression of choline acetyltransferase messenger RNA and Trk A messenger RNA, but not glutamate decarboxylase messenger RNA. *Neuroscience*, 61(2): 257-268.
 141. Vinuesa-Burgos C., 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Rev. Electrón. Vet.*, 10 (2): 1-14.
 142. Walling H. W., J.J. Baldassare y T. C. Westfall, 1998. Molecular Aspects of Huntington's Disease. *J. Neurosci. Res.*, 54:301-308.

143. Williamson D.F., R.A. Parker y J.S. Kendrick, 1989. The Box Plot: A Simple Visual Method to Interpret Data. *Annals of Internal Medicine*, 110: 916-921.
144. Wong J. Y. F., G. T. Liberatore, G. A. Donnan y D. W. Howells, 1997. Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Trk B Neurotrophin Receptors after Striatal Injury in the Mouse. *Exp. Neurol.* 148:83-91.
145. Wong M.L. y J.F. Medrano, 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1): 1-11.
146. Zermeño V., S. Espindola, E. Mendoza y E. Hernández-Echeagaray, 2009. Differential expression of neurotrophins in postnatal C57BL/6 mice striatum. *Int. J. Biol. Sci.*, 5(2):118-127.
147. Zhang H.L., T. Eom, Y. Oleynikov, S.M. Shenoy, D.A. Liebelt, J.B. Dichtenberg, R.H. Singerand y G.J. Bassell, 2001. Neurotrophin-Induced Transport of a β -Actin mRNA Complex Increases β -Actin Levels and Stimulates Growth Cone Motility. *Neuron*, 31: 261-275.
148. Zhang L. y Wen-Hsiung Li, 2004. Mammalian Housekeeping Genes Evolve More Slowly than Tissue-Specific Genes. *Mol. Biol. Evol.*, 21(2): 236-239.
149. Zoghbi H.Y. y Orr H. T., 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23:217-247.
150. Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D., Leavitt B.R., Goffredo D., Conti L., MacDonald M. E., Friedlander R.M., Silani V., Hayden M.R., Timmusk T., Sipione S. y Cattaneo E., 2001. Loss of Huntingtin-mediated BDNF transcription in Huntington's Disease. *Science*, 293(20):493-498.
151. Zuccato, C. y Cattaneo E., 2007. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.*, 81: 294–330.
152. Zuccato, C., M. Marullo, P. Conforti, M.E. MacDonald, M. Tartari y E. Cattaneo, 2007. Systematic Assessment of BDNF and Its Receptor Levels in Human Cortices Affected by Huntington's Disease. *Brain Pathol.*, 18 (2): 225-238.