



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA PLASTICIDAD
SINÁPTICA GABAÉRGICA ESTRIATAL POR EL FACTOR
NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF),
EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE
HUNTINGTON

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Angélica Edith Ruelas Callejas

TUTORA PRINCIPAL: Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

COMITÉ TUTOR: Dra. María Rosa Avila Costa
Dr. Abel Santamaría del Ángel

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de octubre del 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **RUELAS CALLEJAS ANGÉLICA EDITH** con número de cuenta **402091208** con la tesis titulada **“Estudio de la modulación de la plasticidad sináptica GABAérgica estriatal por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en un modelo murino de la Enfermedad de Huntington”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY**:

Presidente: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
Vocal: DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO
Secretario: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
Suplente: DRA. LAURA COLIN BARENQUE
Suplente: DRA. MARÍA ROSA ÁVILA COSTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de noviembre de 2010.



Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al CONACyT por la beca otorgada para estudios de Maestría: 261782/220286.

Al COMECyT por la beca otorgada para Tesis de Posgrado con número de folio: 10BTM0187.

A los miembros del comité tutor:

Dra. María Rosa Avila Costa

Dr. Abel Santamaría del Ángel

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

A los miembros del jurado:

Dra. Martha Lilia escobar Rodríguez

Dra. Patricia Rivas Manzano

Dra. Laura Colin Barenque

Dra. María Rosa Avila Costa

Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, orientarme y brindarme ideas en todo momento.

A mis tutores por su apoyo y observaciones durante cada semestre que enriquecieron este trabajo:

Dra. María Rosa Avila Costa

Dr. Abel Santamaría del Ángel

A los miembros del jurado por la revisión paciente que hicieron de este manuscrito y por las sugerencias para mejorarlo:

Dra. Martha Lilia escobar Rodríguez

Dra. Patricia Rivas Manzano

Dra. Laura Colin Barenque

Dra. María Rosa Avila Costa

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Liz, Neto y Jorge, por su ayuda, amistad y buenos momentos.

**A cada uno
de los que forman parte
de mi todo.**

**“No hay barrera, cerradura
ni cerrojo que puedas
imponer a la libertad de mi
mente.”
Virginia Woolf**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurofisiología del Desarrollo y Neurodegeneración (L-6), UBIMED, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS..... III

ÍNDICE DE GRÁFICAS..... IV

ABREVIATURAS V

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

INTRODUCCIÓN

 Núcleo Estriado 3

 Vía directa y vía indirecta 5

 Enfermedad de Huntington 7

 Modulación de la transmisión sináptica 10

 Neurotrofinas 11

 Mecanismos de señalización mediados por receptores 12

 BDNF 16

 Modelo Farmacológico de la enfermedad de Huntington 19

JUSTIFICACIÓN 23

HIPÓTESIS 24

OBJETIVO GENERAL 24

 Objetivos particulares 24

METODOLOGÍA

 Tratamiento de ratones con 3-NP 25

 Registros electrofisiológicos 25

 Evaluación conductual 27

Imunohistoquímica	28
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS	
Registros Electrofisiológicos de la Actividad GABAérgica Estriatal.....	30
Efecto del BDNF en las corrientes GABAérgicas en condiciones control.....	33
Efecto del BDNF sobre las corrientes GABAérgicas en rebanadas de cerebro provenientes de ratones a los que se les administro la toxina mitocondrial 3-NP...36	
Comparación de la modulación de las corrientes GABAérgicas del BDNF en condiciones control vs. 3-NP.....	39
Evaluación conductual	41
Imunohistoquímica	50
Células inmunoreactivas a BDNF	50
Células inmunoreactivas a TrkB	51
DISCUSIÓN	
El BDNF disminuye la amplitud de las corrientes GABAérgicas.....	52
Modulación del BDNF en las corrientes GABAérgicas en el modelo de 3-NP de la EH.....	54
Comparación de la modulación de las corrientes GABAérgicas del BDNF en condiciones control vs. 3-NP.....	55
Efecto del 3-NP en la conducta espontánea en campo abierto.....	56
Imunohistoquímica	57
CONCLUSIONES	59
ANEXO 1	60
REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conexiones de los Ganglios Basales.....	6
Figura 2. Daño excitotóxico en la Enfermedad de Huntington	9
Figura 3. Mecanismos de Señalización de las Neurotrofinas.....	15
Figura 4. Mecanismo de liberación y de acción del BDNF.....	17
Figura 5. Daño excitotóxico provocado por la administración del ácido 3-nitropropiónico (3-NP).....	21
Figura 6. Actividad Horizontal y Actividad Vertical.....	41
Figura 7. Distancia Recorrida.....	43
Figura 8. Tiempo Activo e Inactivo.....	44
Figura 9. Tiempo Actividad Vertical, Movimientos Estereotipados, Permanencia en margen de la caja o en el centro de la caja	46
Figura 10. Número de movimientos.....	47
Figura 11. Resumen del efecto de la administración sistémica del 3-NP sobre la actividad espontánea	48
Figura 12. Resumen del efecto de la administración sistémica del 3-NP sobre la actividad espontánea	49
Figura 13. Localización inmunohistoquímica de BDNF.....	50
Figura 14. Localización inmunohistoquímica del receptor TrkB	51

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva intensidad-amplitud	¡Error! Marcador no definido.
Gráfica 2. Porcentaje de cambio de la respuesta poblacional a lo largo del tiempo. ...	32
Gráfica 3. Efecto del BDNF sobre la respuesta GABAérgica en células del estriado en condiciones control.....	34
Gráfica 4. Facilitación (S_2/S_1) antes y después de la administración del BDNF.....	35
Gráfica 5. Efecto del BDNF sobre la respuesta GABAérgica en células del estriado en condiciones de 3-NP.	37
Gráfica 6. Cociente del Pulso Pareado (S_2/S_1) en registros de células provenientes de rebanadas de cerebro de ratón a los que se les administro 3-NP	38
Gráfica 7. Comparación de la modulación del BDNF en las corrientes GABAérgicas estriatales en rebanadas de cerebro de ratones control y tratados con 3-NP.	39
Gráfica 8. Comparación del cambio en el cociente de pulso pareado inducido por la administración de la neurotrofina en condiciones control y de 3-NP.....	40

ABREVIATURAS

3-NP:	Ácido 3 Nitropropiónico
AIF:	Factor Inductor de Apoptosis
Akt:	Serine/Threonine Protein Kinase
AMP:	Adenosin Monofisfato
AMPA:	Alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid
AP5:	2-amino-5-phosphonovaleric acid
ATP:	Adenosin Trifosfato
BDNF:	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CDK5:	Cyclin-Dependent Kinase 5
ChAT:	Acetil Colina Transferasa
CNQX:	6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2, 3-dione
CREB:	cAMP Response Element-Binding
DAG:	Diacilglicerol
DARPP-32:	Dopamine-and Cyclic AMP-Regulated Phosphoprotein
EH:	Enfermedad de Huntington
ERK:	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERN:	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERO:	Especies Reactivas de Oxígeno
FPP:	Facilitación por Pulso Pareado
GABA:	Gamma-aminobutyric acid
GB:	Ganglios Basales
Gpe:	Globo pálido externo
Gpi:	Globo pálido interno
HD:	Huntington's Disease (en español: Enfermedad de Huntington).
htt:	huntintina
IA:	Ácido Ibotenico
IP₃:	Inositol Trifosfato
KA:	Ácido Kainico
LTD:	Long Term Depression
LTP:	Long Termo Potentiation

MAP:	Mitogen Activated Protein
NADPH:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase
NE:	Neoestriado
NEM:	Neurona Espinosa Mediana
NGF:	Nerve Growth Factor
NMDA:	N-methyl-D-aspartic acid
NO:	Óxido Nítrico
NT-3:	Neurotrophin 3
NT- 4/5:	Neurotrophin 4/5
NT-6:	Neurotrophin 6
NT-7:	Neurotrophin 7
ONS:	Óxido Nítrico Sintasa
P75NTR:	p75 Neurotrophin Receptor
PBS:	Solución Buffer de Fosfatos
PIP₂:	Fosfatidil Inositol
PKA:	Protein Kinase A
PKC:	Protein Kinase C
PLC:	Fosfolipasa C
PTB:	Phosphotyrosine-binding
QA:	Ácido Quinolínico
RAC-PK:	RAC Protein Kinase
SDH:	Succinato deshidrogenasa
SNpc:	Sustancia nigra compacta
SNr:	Sustancia nigra reticulata
STN:	Núcleo subtálmico
Trk:	Tirosina cinasa
TrkA:	Tirosina cinasa A
TrkB:	Tirosina cinasa B
TrkC:	Tirosina cinasa C

RESUMEN

Los factores neurotróficos (entre ellos la neurotrofina BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor) modulan la transmisión sináptica en los circuitos neuronales. Sin embargo, si la expresión de las neurotrofinas disminuye, las conexiones sinápticas se alteran. En diversas enfermedades neurodegenerativas se ha sugerido que existe pérdida de neurotrofinas; se ha demostrado que la degeneración de las células de proyección del núcleo estriado observada en la enfermedad de Huntington (HD, por sus siglas en inglés) se debe, en parte, a una disminución en la síntesis de BDNF. En este proyecto se utilizó el modelo de HD inducido con la administración crónica del ácido 3-nitropropiónico (3-NP), el cual produce un déficit energético al unirse irreversiblemente a la succinato deshidrogenasa (SDH, el complejo II mitocondrial), así como alteraciones neuronales parecidas a las observadas en la HD. Con la técnica de fijación de voltaje y estimulando extracelularmente, se evaluó *in vitro* la modulación que ejerce el BDNF en las sinapsis GABAérgicas estriatales en rebanadas de cerebro provenientes de ratones C57/BL6, control y de ratones tratados con 3-NP. Nuestros resultados muestran que el BDNF disminuye las corrientes sinápticas inducidas por GABA en condiciones control; mientras que en rebanadas provenientes de animales tratados con 3-NP el BDNF incrementa la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas. El análisis en el cociente del pulso pareado nos indicó que los cambios observados parecen ser debidos a mecanismos postsinápticos. En la evaluación de la actividad motora espontánea el grupo tratado con 3-NP mostró incremento en el tiempo que pasaron en movimiento y en la distancia total recorrida. Estos resultados sugieren que la administración subcrónica de 3-NP genera cambios en las corrientes sinápticas GABAérgicas en respuesta al BDNF exógeno, así como cambios en la actividad conductual reflejados en hiperactividad.

ABSTRACT

Neurotrophic factors (including the neurotrophin BDNF) modulate synaptic transmission in neural circuits. However, if there is decreased expression of neurotrophins, synaptic connections are altered. In several neurodegenerative diseases has been suggested that there is loss of neurotrophins, it has been shown that the degeneration of projection cells in the striatum observed in Huntington's disease (HD) is due in part to a decrease in the synthesis of BDNF. In this project was used HD model induced by chronic administration of 3-nitropropionic acid (3-NP), an irreversible inhibitor of SDH found in the mitochondrial complex II, producing an energy deficit induced neuronal alterations as seen in HD. In the present study we was evaluated *in vitro* modulation exerted by BDNF in the striatal GABAergic synapses in brain slices from normal mice and from mice treated with 3-NP. To evaluate changes in electrical activity of striatal cells from C57/BL6 mice, the cells were recorder with the voltage clamp technique and stimulated extracellularly using paired pulse protocol. Our results show that BDNF reduces GABA-induced currents in control conditions, whereas in slices from animals treated with 3-NP, BDNF increases the amplitude of GABAergic currents. The analysis in the paired pulse ratio indicates that the observed changes appear to be due to post-synaptic mechanisms. Also spontaneous activity was evaluated in an open field where there was a rise in the time mice were moving and in total distance traveled, so there was a decrease in time break in the group treated with 3-NP. These results suggest that sub-chronic administration of 3-NP induces changes in GABAergic currents in response to exogenous BDNF, as well as behavioral changes in activity reflected in hyperactivity.

Introducción

Los ganglios basales consisten en un grupo de núcleos conectados subcorticalmente, entre los que se encuentran: núcleo estriado, núcleo subtalámico, globo pálido interno (GPi) y externo (GPe), la sustancia *nigra pars reticulata* (SNpr) y sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) (Jain et al., 2001). Estos, están involucrados en una variedad de procesos entre los que se encuentran funciones motoras y cognitivas; uno de sus principales roles es la integración de la información sensomotora, asociativa y límbica (Bolam et al., 2000).

La entrada principal a los ganglios basales es el núcleo estriado (caudado y putamen), que recibe aferentes excitatorias de la corteza y el tálamo, también recibe una densa inervación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Kreitzer y Malenka, 2008). Los axones corticoestriatales y talamoestriatales establecen sinapsis de relevo con múltiples neuronas, incluidas las interneuronas, a través de grandes regiones del cuerpo estriado. Algunas de las sinapsis que se establecen en las interneuronas GABAérgicas, que a pesar de su pequeño número, influyen significativamente las propiedades de disparo de las neuronas espinosas medianas; de tal forma que se ha observado que la estimulación intraestriatal puede activar preferencialmente sinapsis inhibitorias provenientes de interneuronas (Koos y Tepper, 1999; Bolam et al., 2000; Tecuapetla et al., 2005).

Núcleo Estriado

Las fibras de entrada al núcleo estriado que provienen de la corteza son de naturaleza glutamatérgica y establecen contactos con las neuronas espinosas medianas de proyección que son de tipo GABAérgico, que forman el 95% de la población del estriado; el otro 5% de la población está formado por interneuronas de naturaleza GABAérgica y colinérgica (Brodal, 1992; Kawaguchi, 1997). Se considera

que las interneuronas reciben varias entradas excitatorias y contribuyen de manera importante en la determinación de si una neurona espinosa de proyección dispara o no (Kawaguchi et al., 1995; Kawaguchi, 1997; Tepper et al., 2004; Gustafson et al., 2006).

Las células que proyectan a la *pars reticulata* y *compacta* de la sustancia *nigra* están segregadas espacialmente en diferentes compartimentos llamados: Matriz (85% área del estriado) y Parches o estriosomas (15%) (Johnston et al., 1990). La matriz recibe aferencias de la corteza de asociación, sensomotora, oculomotora y del tálamo; mientras que los estriosomas reciben de la amígdala y de la corteza límbica.

Inmunohistoquímicamente las células positivas a calbindina y a somatostatina se observan en la matriz, mientras que los receptores a opioides μ , sustancia P y dinorfina se observan en los parches (Herkenham y Pert, 1981; Gerfen, 1992; Jain et al., 2001). Las neuronas espinosas medianas que proyectan hacia las células dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) y hacia el globo pálido externo (GPe) se encuentran en los parches (Kawaguchi, 1997); mientras que las colaterales axónicas que se encuentran en la matriz van hacia el GPe.

Las interneuronas pueden clasificarse en tres grupos (Kawaguchi, 1997):

1.- Interneuronas reactivas a parvalbumina (proteína unidora de calcio) de tipo GABAérgico o FS (fast-spiking). Su soma tiene un tamaño de 10-35 μm , sus dendritas se encuentran tanto en parches como en la matriz. *In vivo*, su disparo es fásico a altas frecuencias en respuesta a estimulación cortical en comparación a otras células del estriado (Kita, 1993). Tienen potencial de reposo más negativo y espigas de menor duración (cesan de disparar abruptamente después de un tiempo corto) (Kawaguchi, 1997).

2.- Interneuronas reactivas a NADPH diaforasa (parecida a la oxido nítrico sintasa (ONS)), también son positivas a somatostatina, neuropeptido Y, expresan Calbindina D_{28K} (proteína unidora de calcio); de tipo GABAérgico. El tamaño de su soma es de 10-35 μm , sus dendritas se encuentran tanto en parches como en la matriz, los axones colaterales de estas células se extienden más que otras clases de células estriatales; sus dendritas no son tan ramificadas como las colinérgicas o las de parvalbumina. Son células de disparo de bajo umbral, el potencial de reposo se encuentra cercano al umbral de disparo, como en las células colinérgicas (Kawaguchi, 1997).

3.- Interneuronas colinérgicas, expresan acetilcolina. De soma grande (20-50 μm) pueden inervar células de la matriz, pero sus dendritas están presentes tanto en los parches como en la matriz. Su potencial de reposo se encuentra cercano al umbral de disparo (Kawaguchi, 1997).

Células de proyección: las células principales de proyección del núcleo estriado forman dos vías conocidas como directa e indirecta.

Vía directa y vía indirecta

Los axones de las neuronas espinosas medianas que salen del núcleo hacia el GPi forman la vía directa, esta población se caracteriza por la expresión además de GABA, de sustancia P, dinorfina y receptores de dopamina D1 estableciendo sinapsis que promueven el movimiento. Mientras que los axones que proyectan hacia GPe forman la vía indirecta, esta población expresa además de GABA, encefalina y receptores D2 estableciendo sinapsis que inhiben el movimiento (Gerfen, 1992) (Figura 1).

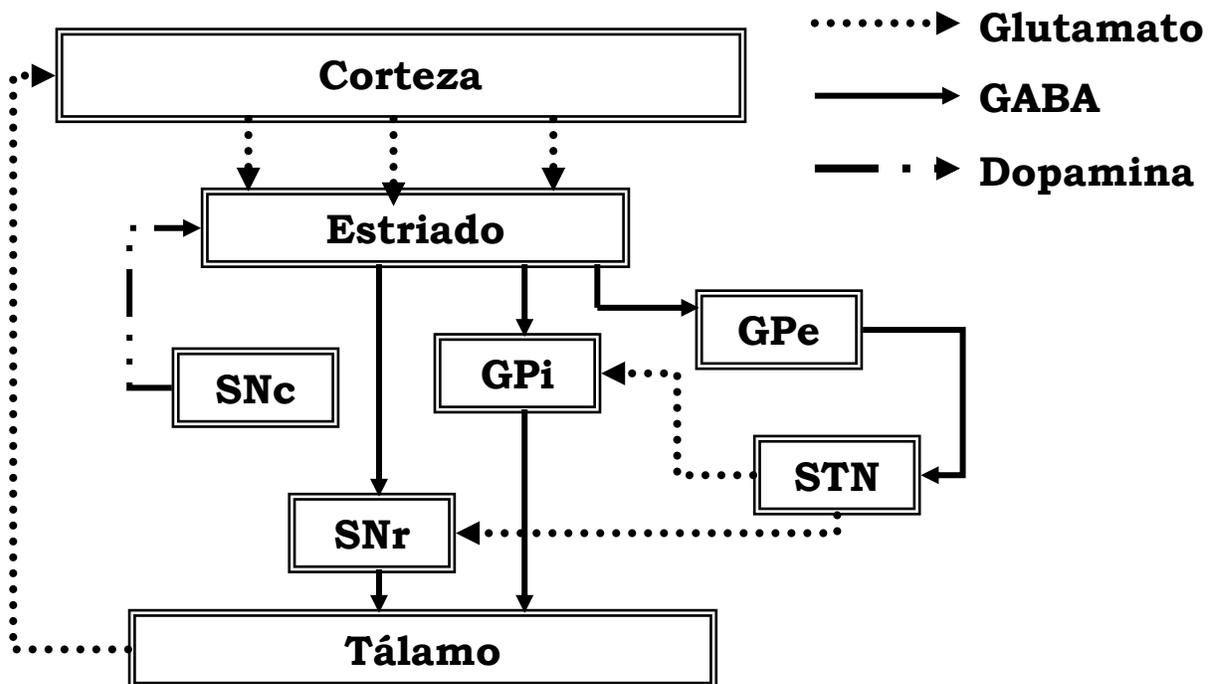


Figura 1. Conexiones de los Ganglios Basales (modificado de Zermeño, 2009). El estriado es el núcleo principal a donde llegan las aferencias glutamatergicas de la corteza y el tálamo. Las neuronas espinosas medianas del estriado envían proyecciones gabaérgicas al globo pálido interno (GPI) y la sustancia *nigra reticulata* (SNr); el resultado de sus operaciones regresa a la corteza motora vía el tálamo. Otras neuronas espinosas medianas envían sus proyecciones al globo pálido externo (GPe) que a su vez proyecta al núcleo subtalámico (STN); este núcleo proyecta hacia los núcleos de salida: el GPI y la SNr. La sustancia *nigra compacta* (SNc) contiene neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el núcleo estriado regulando su actividad.

La degeneración de los GB está relacionada con enfermedades tales como el Parkinson, síndrome de Tourett, discinesias y la corea de Huntington; todas ellas ocasionan alteraciones de los movimientos voluntarios.

Enfermedad de Huntington

La Enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo progresivo, incapacitante, heredable, caracterizado por la presencia de movimientos incesantes y rápidos (coreas) y demencia. La magnitud de la degeneración neuronal conduce a la muerte del paciente. De 4 a 10 personas de cada 100,000 son afectadas por la EH, y en la mayoría de los pacientes se manifiesta hacia la tercera o cuarta década de la vida (Hernández-Echeagaray, 2004; Hernández-Echeagaray et al., 2010; Leegwater-Kim y J. Cha, 2004).

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

Durante el transcurso de la enfermedad la disfunción intracelular inducida por la huntingtina mutada conduce a la degeneración progresiva de vías neuronales importantes y pérdida selectiva de poblaciones estriatales, corticales y de otras regiones del cerebro (Alberch et al., 2004; Gil y Rego, 2008), en especial, la degeneración de las neuronas espinosas medianas (NEMs) de la vía indirecta (estriato-palidales) está relacionada con el desarrollo de la enfermedad de Huntington (Fusco et al., 2003; Leegwater-Kim y J. Cha, 2004). Una de las causas de la degeneración de las neuronas espinosas medianas parece deberse a la pérdida de factores tróficos, que participan en el mantenimiento de éstas células (Gauthier et al.,

2004). El BDNF endógeno regula el comienzo y la severidad de las disfunciones motoras y por tanto la degeneración estriatal (Canals et al., 2004; Zuccato et al., 2001; 2005).

Así mismo la excitotoxicidad se ha propuesto como el principal mecanismo de vulnerabilidad que conduce a la degeneración de las neuronas de proyección en la EH (Beal et al., 1993); principalmente por la activación de tres tipos de receptores glutamatérgicos (AMPA, NMDA y metabotrópicos) (Estrada et al., 2008; Gil y Rego, 2008). La activación de los receptores AMPA (Alpha-amino-3-hidroxy-5-Methy-4-isoxazole Propionic-Acid) induce el flujo de sodio que provoca la despolarización de la membrana, promoviendo la activación de los receptores NMDA (N-Methyl-D-Aspartic acid), permitiendo la entrada de calcio (Ca^{2+}) a la célula. La activación de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G induce la activación de segundos mensajeros como el inositol trifosfato (IP-3) que dispara la liberación de Ca^{2+} citoplasmático. La entrada masiva de calcio a la célula durante la excitotoxicidad conduce a una sobrecarga de calcio mitocondrial, alterando su actividad y la producción de ATP. La cantidad de calcio intracelular activa enzimas como las proteasas, endonucleasa o fosfolipasas, especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres que generan una serie de componentes que contribuyen a la degeneración de diferentes componentes celulares y a la muerte neuronal (Gil y Rego, 2008). En la Figura 2 se ejemplifica el daño excitotóxico generado durante la EH.

Estudios bioquímicos han evidenciado la presencia de alteraciones y defectos en el metabolismo energético debidos a disfunción mitocondrial en pacientes con la enfermedad de Huntington; estos enfermos manifiestan alteraciones en la cadena de transporte electrónico caracterizadas por afectación de sus complejos, especialmente el II y III, que disminuyen la producción de adenosín trifosfato (ATP) e incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), exceso de excitación neuronal debido al trastorno del procesamiento

de glutamato (no hay recaptación de glutamato por las inclusiones de huntingtina) (García et al., 2002; Gil y Rego, 2008).

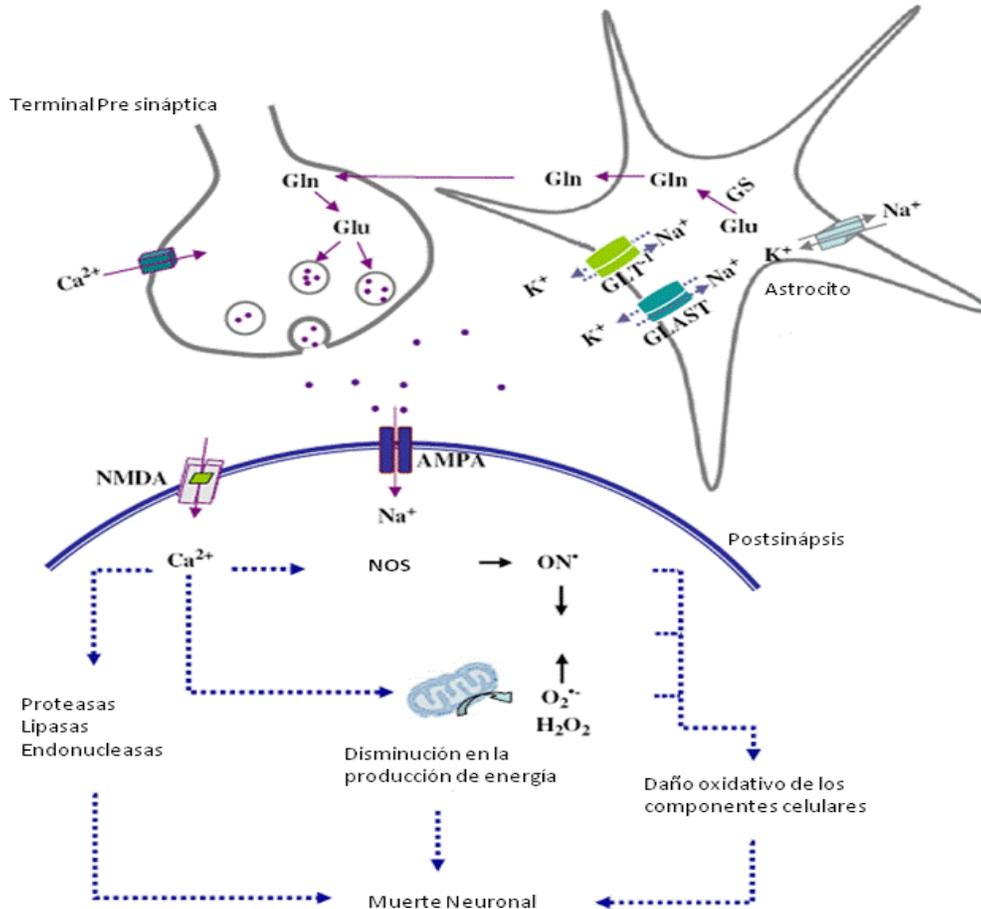


Figura 2. Daño excitotóxico en la Enfermedad de Huntington (Tomada de Estrada et al., 2008). La despolarización de la terminal presináptica permite la entrada de calcio hacia la terminal, promoviendo la movilización de las vesículas y su fusión con la membrana plasmática para la liberación de glutamato (Glu) al espacio sináptico. El glutamato activa los receptores AMPA en la neurona postsináptica, induciendo flujo de sodio y la despolarización de la membrana plasmática. La liberación de magnesio que normalmente bloquea los receptores NMDA conduce a la activación de estos, induciendo flujo de calcio hacia dentro de la célula. El glutamato es eliminado del medio extracelular por proteínas específicas localizadas en los astrocitos (GLT y GLAST) y reabsorbido por las neuronas. El Glu es metabolizado a glutamina en las células gliales por la glutamina sintasa (GS), posteriormente la glutamina es liberada y absorbida por las neuronas. Cuando el proceso de recaptura de Glu se ve alterado, éste se acumula y sobreactiva a los receptores AMPA, desencadenando la entrada masiva de calcio por los receptores NMDA, estimulando entre otras cosas la producción de especies reactivas de oxígeno, daño mitocondrial, oxidación de lípidos, proteínas y DNA.

No se tiene conocimiento de la razón por la cual la mutación en el gene IT15 conduce a la muerte neuronal, sin embargo se ha propuesto que existe estrés oxidativo y que la pérdida de factores tróficos podrían producir muerte neuronal, ya que los factores tróficos participan en el mantenimiento y sobrevivencia de las células (Gauthier et al., 2004). En particular, se sabe que el BDNF controla el crecimiento, desarrollo, diferenciación y mantenimiento de algunas poblaciones neuronales (Chao, 2003; Binder y Scharfman, 2004; Zuccato y Cattaneo, 2007) y en el núcleo estriado (Zuccato et al., 2001). El BDNF puede participar en la plasticidad sináptica, modulando la transmisión sináptica en los circuitos neuronales (Poo, 2001).

Modulación de la transmisión sináptica

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio predominante en el sistema nervioso central en adultos y juega un papel fundamental en el equilibrio entre la excitación neuronal y la inhibición (Purves, 1998). Los receptores GABA ($GABA_A$ R) están ligados a canales iónicos que median la mayor parte de la neurotransmisión inhibitoria en el cerebro.

La modulación de la transmisión sináptica desempeña un papel importante en el control de entrada, así como de salida de las neuronas espinosas medianas de proyección. La eficiencia de la transmisión sináptica puede modificarse a través de diferentes tipos de moléculas llamadas neuromoduladores (Purves, 1998). Los neuromoduladores actúan uniéndose a receptores metabotrópicos o de tipo tirosina cinasa (Trk) que activan diversas vías de señalización interna que traen como consecuencia el incremento o disminución de la respuesta sináptica mediada por un neurotransmisor (Poo, 2001).

Las sinapsis en el estriado están sujetas a la modulación sináptica que pueden incluso producir plasticidad de corto plazo, incluidas las modificaciones de la función de los canales iónicos y liberación del neurotransmisor. Dos formas de plasticidad sináptica a largo plazo también se han observado en el estriado: potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) (Purves, 1998).

La plasticidad de corto plazo generada por el uso del protocolo de pulso pareado se basa en la teoría del calcio residual que modifica la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Katz y Miledi, 1968). Este protocolo de estimulación permite saber si los cambios en la amplitud de las corrientes sinápticas después de administrar un modulador son debidos a modificaciones presinápticas (cambios en la liberación del neurotransmisor) o postsinápticas (cambios en la conductancia de los canales iónicos asociados a receptores, expresión de los receptores, etc.) (Katz y Miledi, 1968).

Las poblaciones neuronales, como las del núcleo estriado son preservadas gracias a la disposición de cantidades limitadas de factores tróficos, que también participan durante el desarrollo embrionario. Un grupo de factores tróficos, llamado neurotrofinas también participan en estas funciones y en la modulación de la transmisión sináptica (Poo, 2001; Huang y Reichardt, 2001; Lessman, et al., 2003; Skaper, 2008).

Neurotrofinas

Los factores tróficos son proteínas que se encuentran naturalmente en el organismo, éstas promueven la sobrevivencia de poblaciones neuronales específicas, estimulando su diferenciación morfológica y regulando su expresión génica a través de la interacción con receptores celulares específicos que a su vez interactúan con diversos tipos de sistemas de segundos mensajeros (Huang y Reichardt, 2001; Skaper,

2008). Las neuronas secretan cantidades limitadas de factores tróficos de manera que estas son inervadas por otras neuronas, asegurando un balance entre la talla y la cantidad de inervaciones de las poblaciones neuronales (revisado en Purves, 1988).

Las neurotrofinas son un tipo de factores tróficos que se encuentran distribuidos principalmente en el Sistema Nervioso. Se han caracterizado cuatro neurotrofinas en mamíferos: NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (Neurotrophin 3), NT-4/5 (Neurotrophin 4/5); mientras que las NT-6 (neurotrofina 6) y la NT-7 (neurotrofina 7) solo han sido aisladas en peces. Todas se derivan de un gen ancestral común, poseen secuencias y estructura similar. Generalmente funcionan como homodímeros asociados no covalentemente, algunas subunidades pueden formar homodímeros con subunidades de otras neurotrofinas (Huang y Reichardt, 2001; Skaper, 2008).

La neurotrofina producto de la activación de sus genes, incluye una secuencia señal y un pro-dominio, seguido de la secuencia de la neurotrofina madura. La actividad de la neurotrofina está regulada por proteasas responsables de la conversión de las pro-neurotrofinas a neurotrofinas maduras (Skaper, 2008). Las pro-neurotrofinas se unen con gran afinidad al receptor p75NTR (p75 neurotrophin receptor), y pueden activar vías de señalización controladas por este receptor, que en muchas ocasiones resulta en la promoción de muerte por apoptosis (Lee et al., 2001).

Mecanismos de señalización mediados por receptores

Cada uno de los factores tróficos actúa sobre su receptor modulando varias vías de señalización entre las que se encuentran: vías de proliferación, sobrevivencia, crecimiento axonal y dendrítico, remodelamiento y ensamblaje del citoesqueleto, fusión y tráfico de membrana, formación y funcionamiento sináptico; también modulan la expresión y actividad de varias proteínas funcionales como canales

iónicos y receptores de neurotransmisores en todas las poblaciones neuronales (Huang y Reichardt, 2001; Huang y Reichardt, 2003).

La activación de los receptores ocurre mediante la unión y dimerización de las neurotrofinas a cada uno de ellos en los dominios transmembranales de los receptores. NGF activa específicamente a TrkA; BDNF y NT-4 son específicos del receptor TrkB; NT-3 activa a TrkC, que también puede activar menos eficientemente a los otros dos receptores (Huang y Reichardt, 2001). Existe otro tipo de receptor al cual son afines todas las neurotrofinas, el receptor p75^{NTR}; la presencia de este receptor promueve el transporte retrógrado de las neurotrofinas (Curtis et al., 1995).

Cada receptor contiene 10 residuos de tirosina conservados evolutivamente en sus dominios citoplasmáticos, de los cuales, tres de ellos están presentes en el asa autoregulatoria que controla la actividad de la tirosina cinasa (Stephens et al., 1994); mientras que en los dominios extracelulares cada receptor contiene dominios ricos en cisteína y leucina (Skaper, 2008). La fosforilación de estos residuos activa el receptor, promoviendo la señalización mediante la creación de sitios de acoplamiento para adaptar proteínas que contengan secuencias de reconocimiento PTB (phosphotyrosine-binding) o SH-2 (src-homologo-2) (revisado en Huang y Reichardt, 2001). Las principales vías activadas por los receptores Trk son las vías Ras/ERK, la vía de señalización de PI-3 (phosphatidilinositol-3-cinasa), y la vía de PLC- γ 1 (fosfolipasa C- γ 1). La activación de estas vías se ejemplifica en la Figura 3 (Huang y Reichardt, 2003).

Señalización Ras-MAP cinasas

La activación de Ras promueve la sobrevivencia de las neuronas por la activación de la PI-3 cinasa o a través de la activación de la familia ERK (Extracellular signal-regulated kinase) de las MAP (mitogen activated protein) cinasas. La activación de las vías de las MAP cinasas ha sido asociada con la proliferación

promovida por la respuesta inducida al aplicar neurotrofinas. La activación de Ras también puede ser facilitada por la fosforilación dependiente de neurotrofina y la activación del factor liberador de la proteína Ras-G (RasGRF1) (Skaper, 2008).

Señalización PI-3 cinasa

La activación de la fosfatidil-inositol-3-cinasa es esencial para la supervivencia de muchas poblaciones neuronales. Los fosfoinosítidos generados por la PI-3 activan la proteína cinasa Akt (también conocida como proteína cinasa B) y la RAC-PK (proteína cinasa A y C). La Akt fosforilada controla las funciones biológicas de varias proteínas importantes en la modulación de la supervivencia celular y regula varios factores de transcripción (Huang y Reichardt, 2003; Skaper, 2008).

Señalización PLC- γ 1

La fosforilación del residuo Y785 en TrkA se ha visto que recluta directamente a la PLC- γ 1, que es activada por la fosforilación y posteriormente se hidroliza formando fosfatidil inositol para generar inositol tri-fosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 induce liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, incrementando los niveles de Ca^{2+} citoplasmático; mientras que el DAG estimula isoformas de la proteína cinasa C, lo que resulta en la activación de varias enzimas reguladas por las concentraciones de calcio, incluida la Ca^{2+} -calmodulin-cinasa y fosfatasas de calcio (Huang y Reichardt, 2003).

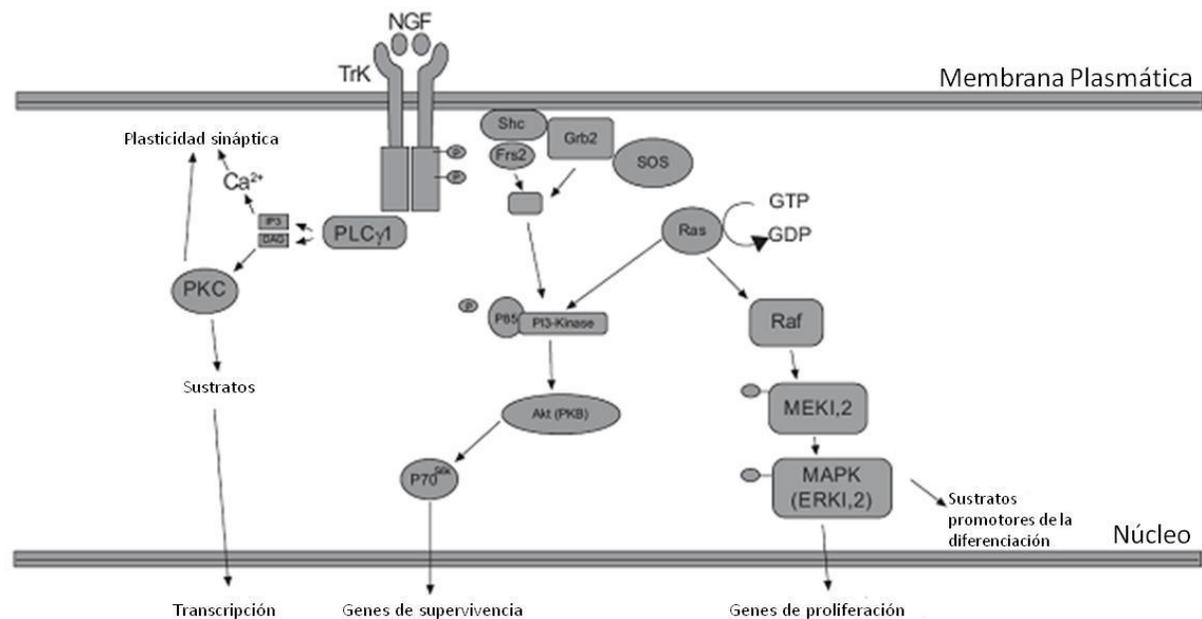


Figura 3. Mecanismos de Señalización de las Neurotrofinas (Tomada de Skaper, 2008). Interacción del NGF con su receptor Trk y las principales vías de señalización activadas. La unión de la neurotrofina a los receptores Trk conduce a su dimerización y autofosforilación. El vinculador Shc se une al residuo Y490 de Trk y a un complejo Grb2-SOS. SOS es un factor de intercambio de nucleótidos que activa Ras mediante la sustitución de GDP con GTP. La Ras activada interactúa directamente con la serina-treonina-cinasa Raf. La activación de Raf conduce a la activación secuencial de MEK. MAPK se transloca al núcleo, donde fosforila factores de transcripción, que promueven la diferenciación neuronal. La activación de PI-3 cinasa a través de Ras o Gab1 promueve la supervivencia y el crecimiento de las neuronas. La activación de PLC- γ 1 resulta en la movilización de Ca^{2+} citoplasmático y activación de la proteína C (PKC) que promueven la plasticidad sináptica.

La activación de los receptores Trk regula la expresión y actividad de canales iónicos, receptores de neurotransmisores y otros receptores del tipo tirosina cinasa. La activación del receptor Trk también modula la endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas. Algunos de estos efectos son observados de segundos a minutos, donde ciertamente no requieren de la síntesis de proteínas *de novo*, aunque también controlan la expresión génica a través de regular factores de transcripción (Huang y Reichardt, 2003).

En la superficie celular los dominios de receptores Trk son ricos en áreas de caveolinas; una vez que se han unido las caveolinas a sus ligandos se estimula la internalización de los receptores Trk a través de la formación de depresiones en la membrana revestidas de clatrina y por macropinocitosis en la superficie celular. Después de la internalización, las neurotrofinas son localizadas junto con sus receptores Trk en endosomas, que también contienen intermediarios de señalización como Shc y PLC- γ 1. El transporte retrógrado de estos endosomas proporciona un mecanismo mediante el cual la neurotrofina puede transmitir señales al soma celular y núcleo (Huang y Reichardt, 2003).

El BDNF juega un papel importante en el mantenimiento y plasticidad sináptica de las poblaciones neuronales del núcleo estriado a continuación se describen sus características más relevantes.

BDNF

El BDNF y su receptor TrkB están ampliamente expresados durante el desarrollo embrionario y en el adulto. Existen dos vías para su secreción (i) la vía regulada, que emplea la exocitosis dependiente de Ca^{2+} de los gránulos secretores y (ii) la vía constitutiva, que emplea distintos tipos de vesículas que liberan su contenido de manera predeterminada cuando alcanzan la membrana plasmática (Lessmann y Brigadski, 2009). Puede actuar de manera parácrina (sobre la célula blanco) o autocrina (sobre la célula que lo libera), también sus niveles de expresión son regulados por la actividad neuronal (ver Figura 4) (Acheson et al., 1995; Robinson et al., 1996; Lessmann, 1998; Lessmann et al., 2003; Lu, 2006).

En las neuronas corticales que proyectan hacia el estriado se ha visto que el transporte del BDNF ocurre de manera anterógrada, ya que la neurotrofina viaja a través de los axones corticales para ser liberado en el estriado (Altar et al., 1997; Lessmann y Brigadski, 2009). El BDNF se encuentra almacenado dentro de una vía regulada de secreción por lo tanto es necesario el incremento de la actividad neuronal para activar el factor de transcripción del gen e incrementar la secreción de la proteína BDNF; también la expresión de su receptor TrkB está regulada por la actividad neuronal (Lu, 2006). Varios promotores controlan la expresión del mRNA de BDNF, uno de ellos está regulado por Ca^{2+} que actúa a través de la proteína cinasa IV dependiente de la calcio calmodulin-cinasa que fosforila y activa el factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding) (Tao et al., 1998).

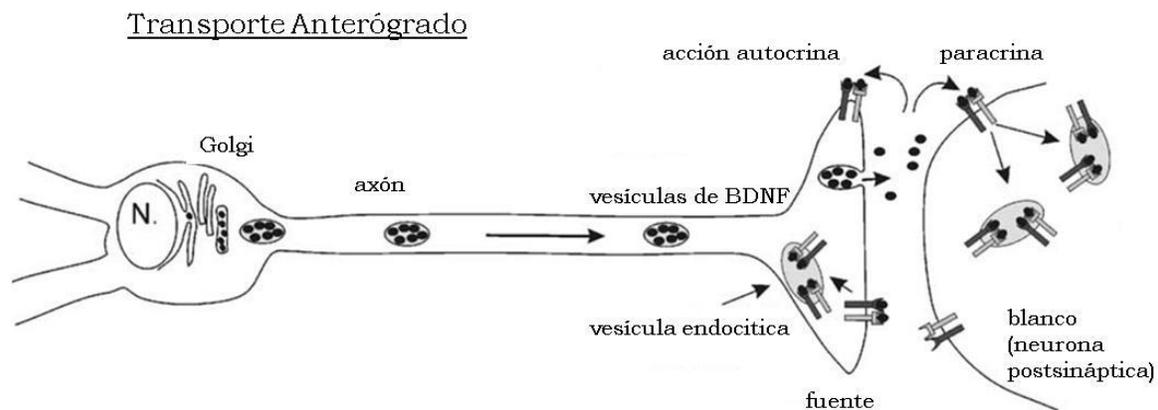


Figura 4. Mecanismo de liberación y de acción del BDNF en las sinapsis corticoestriatales (Tomado de Lessmann, 2003). Las vesículas de BDNF son transportadas desde el soma celular hasta las terminales axónicas de las neuronas que sintetizan el BDNF (corticales). Siguiendo la liberación presináptica, las acciones del BDNF pueden ser paracrina o autocrina, dependiendo de los sitios de expresión del TrkB en las neuronas espinosas medianas.

Bajas concentraciones de BDNF y NT-4 activan conductancias de sodio así como de glutamato en rebanadas de hipocampo, corteza, giro dentado, corteza visual y cerebelo (Akaneya et al., 1997; Carmignoto et al., 1997; Lessmann y Heumann, 1998; Koyama et al., 2004). Las espinas dendríticas parecen ser un sitio exclusivo para la activación rápida de los canales de Ca^{2+} por el BDNF, que en conjunto con los receptores NMDA inducen LTP. Varios grupos han observado que las neurotrofinas incrementan el calcio intracelular y potencian la transmisión sináptica a través de la vía de la PLC- γ 1 mediante la generación de IP3, que resulta en la liberación de calcio intracelular (Carmignoto et al., 1997; Zhang y Poo, 2002; Koyama et al., 2004).

Se ha demostrado que el BDNF disminuye las corrientes inhibitorias postsinápticas en las células piramidales CA1 (Tanaka et al., 1997, Frerking et al., 1998). Se ha demostrado también que el BDNF afecta la función de los receptores NMDA en cultivos de neuronas del hipocampo, aumentando la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} acoplados a dichos receptores (Levine et al., 1998).

Los factores tróficos previenen la muerte celular en procesos degenerativos. De esta forma, la regulación endógena de la expresión de los factores tróficos y sus receptores en el estriado y en sus conexiones pueden ser importantes para la protección de las células estriatales y mantener la conectividad de los ganglios basales (Alberch, 2004). La ausencia o disminución de factores tróficos puede llevar a la degeneración de los sistemas, que se ve reflejado en la aparición de enfermedades neurodegenerativas. Algunos desordenes del movimiento son originados por procesos degenerativos en los ganglios basales. En particular el proceso neurodegenerativo observado en la EH provoca disfunciones cognitivas y motoras.

Existen varios modelos animales que imitan los síntomas neurobiológicos y clínicos de la EH que nos pueden ofrecer una aproximación alternativa para el desarrollo de nuevas terapias y entender el proceso degenerativo de la enfermedad. A continuación se mencionan algunos modelos farmacológicos en ratones que se utilizan para imitar los síntomas de la EH.

Modelo Farmacológico de la enfermedad de Huntington

Los primeros estudios se llevaron a cabo provocando lesiones excitotóxicas en corteza, hipocampo y estriado con la infusión de ácido kaínico (KA), ácido iboténico (IA) o ácido quinolínico (QA). Si bien estas manipulaciones han reproducido la mayoría de los síntomas y cambios patológicos observados en la enfermedad, no toda la fisiopatología se reproduce (Borlongan et al., 1995, 1997a, 1997b; García-Ramos et al., 2007; Túnez y Santamaría, 2009). La administración sistémica del ácido 3-nitropropiónico (3-NP) provoca atrofia estriatal y alteraciones en la actividad motora reflejada en periodos de hiperactividad, seguidos por hipocinesia (Borlongan et al., 1995), y distonia (García et al., 2002) síntomas parecidos al déficit motor observado en la enfermedad.

El 3-NP es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa (SDH), inhibe tanto al ciclo de Krebs como al complejo II mitocondrial de la cadena respiratoria al unirse covalentemente al sitio activo de la SDH en vez de su sustrato endógeno, el ácido succínico (Coles et al., 1979; Ludolph et al., 1991; Huang et al., 2006). Es una toxina que produce naturalmente la planta *Indigofera endecaphylla* Jacq. (Coles et al., 1979), algunas especies del género *Astragalus* (hierbas), y del género *Arthrinium* (hongos) (revisado en Wei et al., 1994). La oxidación del 3-NP por la SDH resulta en la formación de 3-nitroacrilato que reacciona con un grupo tiol (-SH) en el sitio activo de la enzima formando un complejo irreversible con la SDH (Coles et al., 1979). La toxina, cuando es consumida accidentalmente por animales o humanos

genera necrosis bilateral en el putamen, distonia como las observadas en pacientes con EH (Ludoph et al., 1991). La administración de esta toxina mitocondrial es suficiente para reproducir algunas de las alteraciones patofisiológicas de la EH y ha servido para dilucidar algunos mecanismos celulares de dicha patología (Beal et al., 1993; Fu et al., 1994; Wüllner et al., 1994; Saulle et al., 2004).

La administración de 3-NP provoca la despolarización de la membrana mitocondrial, que conduce a una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial alterando su actividad y disminuyendo la producción de ATP (Nasr et al., 2003; Rosenstock et al., 2004; Saulle et al., 2004), la disminución en la producción de ATP lleva a la despolarización de la membrana citoplasmática provocando la apertura de los receptores a glutamato dependientes de voltaje (NMDA) y la activación de canales iónicos permitiendo la entrada masiva de Ca^{2+} ; también la entrada masiva de calcio está involucrada en la liberación del citocromo c, Smac/DIABLO del espacio intermembranal de la mitocondria, responsables de la activación de caspasas que pueden producir apoptosis, la Figura 5 ejemplifica este proceso (Rosenstock et al., 2004; Saulle et al., 2004; Duran-Vilaregut et al., 2010, Rodríguez et al., 2010). También hay producción anormal de especies reactivas de oxígeno (ERO) como radicales hidroxilo y superóxido (Bacsi et al., 2006, Rodriguez et al., 2010), genera NO directamente como donador e indirectamente al aumentar la expresión de NOS (Deshpande et al., 2006) que pueden conducir a la destrucción de receptores de la membrana celular y el citoesqueleto (Nishino et al., 1997; Brouillet et al., 2005).

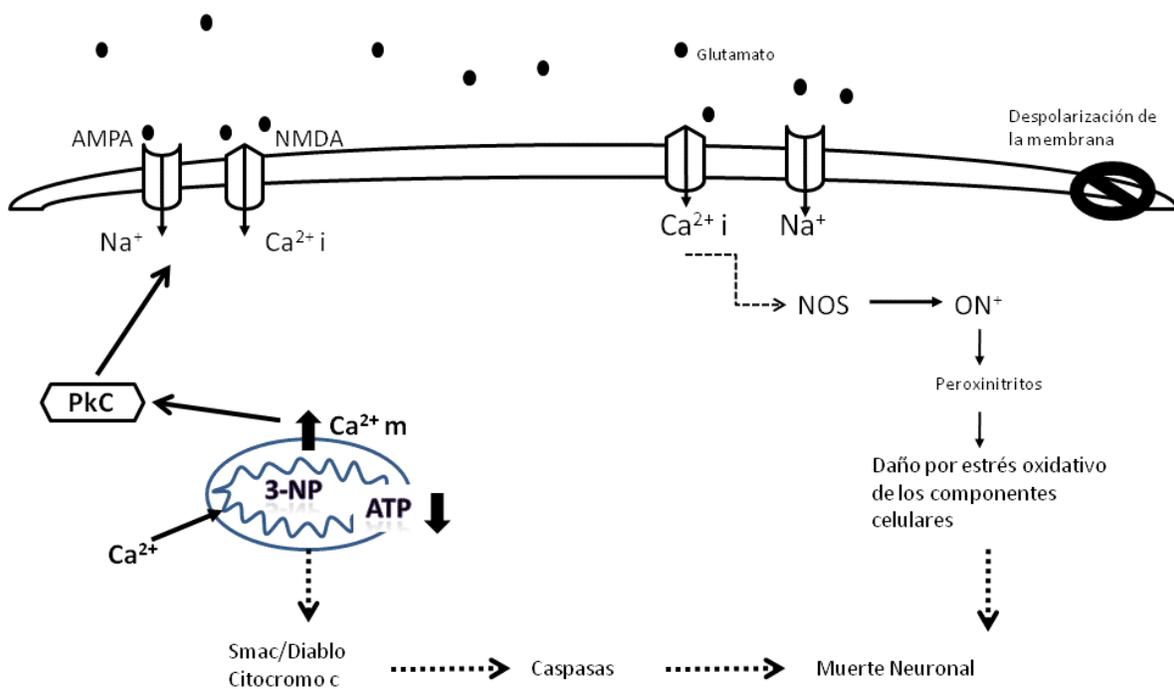


Figura 5. Daño excitotóxico provocado por la administración del ácido 3-nitropropiónico (3-NP). La administración de 3-NP produce daño mitocondrial liberándose calcio al citosol, este calcio provoca la liberación de proteínas responsables de la activación de caspasas que conducen a la muerte neuronal. El calcio activa a PKC que fosforila a los receptores AMPA y NMDA incrementando su conductancia, hay más flujo iónico de sodio y calcio, esto conduce a una despolarización de la membrana sobreactivando los receptores AMPA y NMDA. La entrada masiva de calcio induce producción de especies reactivas de nitrógeno, que conduce a daño por estrés oxidativo provocando muerte neuronal.

El potencial de membrana es mantenido gracias a la actividad de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, el cual puede colapsar durante las condiciones limitadas de ATP, despolarizando la membrana y provocando la activación de los receptores NMDA, que son activados por glutamato. Algunas características producidas por la administración del 3-NP son cambios en las espinas de las dendritas, el grosor de la dendrita y sus ramificaciones (Brouillet et al., 1993; Beal et al., 1993), muerte de astrocitos (involucrados en la recaptura de glutamato), y disfunción de la barrera hematoencefálica (Nishino et al., 1997). También se observa vulnerabilidad dependiente de la edad, conducida por un estrés oxidativo que induce apoptosis (Kim y Chan, 2001), fragmentación del DNA, necrosis y apoptosis provocadas por las

concentraciones de calcio mitocondrial y citosólico y por la activación de calpaina (Nasr et al., 2003).

En el laboratorio hemos observado que el 3-NP además de producir muerte celular de tipo apoptótica, genera necrosis e incluso autofagia en el núcleo estriado (Rodríguez et al., 2010), también hemos documentado que estas alteraciones se acompañan de daño estructural en el músculo esquelético debido a un incremento de NO y oxidación de lípidos (Hernández-Echeagaray et al., 2010).

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que los factores tróficos modulan la transmisión sináptica en los circuitos neuronales; por ejemplo, el BDNF modula la transmisión sináptica en hipocampo, corteza visual y cerebelo (mencionado anteriormente). No existen trabajos en los que se evalúe la modulación que ejerce ésta neurotrofina sobre las corrientes sinápticas GABAérgicas de las neuronas espinosas medianas en el estriado, por lo que en este trabajo se evaluó *in vitro* la modulación de la plasticidad sináptica GABAérgica estriatal de corto plazo inducida por el BDNF en condiciones normales y en el modelo de la enfermedad de Huntington inducido por la administración de 3-NP. Así mismo, para tener un correlato conductual e histológico de las posibles alteraciones electrofisiológicas, se evaluaron algunos parámetros de la conducta motora espontánea y la expresión inmunocitoquímica del factor trófico y de su receptor TrkB en animales experimentales, quienes se compararon con su grupo control.

HIPÓTESIS

Conociendo que existen alteraciones en la población neuronal del estriado debido a la administración de la toxina 3-NP, es posible que exista una modificación en la modulación de la plasticidad sináptica GABAérgica inducida por el BDNF comparada con aquella proveniente de rebanadas de cerebro de ratones control.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la modulación de la plasticidad sináptica de corto plazo GABAérgica estriatal inducida por el BDNF en condiciones control y en un modelo murino de la Enfermedad de Huntington.

Objetivos particulares

- Estudiar la modulación del BDNF en la plasticidad sináptica GABAérgica estriatal en condiciones control.
- Estudiar la modulación del BDNF en la plasticidad sináptica GABAérgica estriatal en el modelo farmacológico de la EH.
- Estudiar los cambios en la expresión de la neurotrofina BDNF y su receptor TrkB en condiciones control y en el modelo farmacológico de la EH en el estriado
- Evaluar la conducta motora espontánea en campo abierto de los ratones en condiciones control y con el tratamiento farmacológico.

METODOLOGÍA

Tratamiento de ratones con 3-NP

Se usaron ratones macho de la cepa C57/BL6 de 30 días de nacidos al inicio del experimento. El grupo control se le administró el vehículo del fármaco (PBS) y a los ratones experimentales se les administró la toxina 3-NP a una concentración de 15 mg/Kg de peso durante cinco días, los registros electrofisiológicos y la evaluación de conducta se realizaron 48 horas después de la administración de la última dosis.

Registros electrofisiológicos

Para realizar los registros electrofisiológicos los ratones se anestesiaron con éter, se decapitaron y sus cerebros se disectaron rápidamente y se colocaron en un vaso de precipitados que contenía solución salina isotónica fría (4°C) compuesta de: 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM Glucosa, saturada con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ con una osmolaridad de 300 mOms por litro y un pH de 7.4. Posteriormente el cerebro se transfirió a una cámara de un vibratomo (vibroslicer Pelco, TedPella) que contenía la solución previamente descrita. Se obtuvieron cortes sagitales (300 µm de espesor) y se colectaron en un vaso de precipitados que contenía la solución previamente descrita; la cual se mantuvo siempre oxigenada con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂.

Registro Celular

Las neuronas espinosas medianas del estriado se visualizaron con la ayuda de un microscopio de contraste diferencial e iluminación infrarroja (BX51, Olympus, Inc). Las corrientes sinápticas GABAérgicas estriatales de las neuronas espinosas medianas se registraron utilizando la técnica de registro de célula única con la configuración de fijación de voltaje (-70mV). Se emplearon electrodos de borosilicato (4-5 Ω de resistencia) que se llenaron con la siguiente solución: 72 mM KH₂PO₄, 36

mM KCL, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1.1 mM EGTA, 0.2 mM Na₂ATP, 0.2 mM Na₂GTP. La señal electrofisiológica GABAérgica se amplificó (Axopatch 200B; Axon Instruments / Molecular Devices Corp.) y se adquirió en línea, filtrada a 1-5 KHz con ayuda del programa de análisis de adquisición pClamp 9.1 con una interfase en serie Digidata 1322A (Axon instruments/ Molecular Devices Corp.).

Para estudiar las corrientes sinápticas GABAérgicas provenientes de los axones de las interneuronas, las neuronas espinosas medianas que se registraron en la configuración de célula única en fijación de voltaje, se estimularon con un electrodo bipolar concéntrico de 25 μ de diámetro colocado dentro del estriado aplicando el protocolo de pulso pareado, con una separación entre estímulos de 70ms. Para registrar únicamente la actividad GABAérgica se administraron los bloqueadores glutamatérgicos 2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) a una concentración de 50 μ M y 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX) a una concentración de 10 μ M.

Una vez aislada la respuesta sináptica GABAérgica, ésta se grabó por 10 minutos aproximadamente como control, al término de este tiempo se añadió BDNF a una concentración de 50 ng/ml a flujo constante de la solución previamente descrita de 1- 1.5 ml/min. El BDNF fue reconstituido en agua destilada (10 μ g/ml) y mantenida en refrigeración a -20°C de acuerdo a las indicaciones del vendedor PeproTech México (ver Anexo 1). Durante el registro la solución stock de BDNF fue diluida en la solución ringer para obtener una concentración final de 50 ng/ml.

Protocolo de Pulso Pareado

La Facilitación por Pulso Pareado (FPP) es una forma de plasticidad sináptica de corto plazo resultado de la probabilidad de liberación del transmisor en respuesta a dos estímulos dados muy cercanos en el tiempo (Katz y Miledi, 1968). Este fenómeno se da como consecuencia de la sumación de la entrada de Ca²⁺ por la estimulación de la terminal sináptica con dos estímulos de la misma intensidad pero

separados por algunos milisegundos entre ellos. De esta forma el primer estímulo produce la liberación de una determinada cantidad de neurotransmisor por la entrada de calcio a la terminal presináptica; si el segundo estímulo se da en una ventana de tiempo en la que el calcio que entró por la primera estimulación no se ha amortiguado, se genera un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} por sumación con el calcio residual del primer estímulo, como consecuencia, hay un aumento en la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Katz y Miledi, 1968). Si la estimulación inicial fue demasiado grande el calcio que entra con el primer estímulo agota el contenido de vesículas que contienen al neurotransmisor, de tal manera que cuando viene el segundo estímulo no hay más neurotransmisor que liberar y se genera depresión por pulso pareado. Un cambio en la relación de la respuesta sináptica evocada por el pulso pareado es generalmente aceptado como una indicación de modificaciones presinápticas de la transmisión sináptica (como crecimiento o disminución de la liberación del neurotransmisor) (Katz y Miledi, 1968).

Evaluación conductual

Para documentar posibles alteraciones conductuales en nuestro modelo de EH se usaron dos grupos de ratones, uno control y otro al que se les administró 3-NP; al séptimo día se les evaluó la conducta. Al grupo control se les administró solución salina durante cinco días y se les sacrificó a los 7 días, el mismo día en que se les evaluó la conducta motora. Al grupo experimental se le inyectó 3-NP a una concentración de 15mg/kg de peso durante cinco días y se le sacrificó al séptimo, el mismo día en que se evaluó la conducta.

La evaluación de la conducta se realizó utilizando una caja de acrílico con superficie cuadrada de 50 cm y paredes de 30 cm de altura aproximadamente, con sensores infrarrojos. La medición de variables se realizó de manera simultánea. Se

utilizó el software VERSADAT versión 3.02-1E7E (ACCUSCAN INSTRUMENTS INC.).

El software colecta y analiza inmediatamente después de colocar al ratón en la caja los datos obtenidos por los sensores infrarrojos. El software está programado para coleccionar datos en intervalos de cinco minutos durante 30 minutos, los resultados se muestran como el promedio de los seis intervalos. Los datos coleccionados de la actividad locomotora del ratón durante este tiempo fueron: actividad horizontal, actividad vertical, distancia total recorrida, distancia recorrida en el margen, distancia recorrida en el centro, tiempo en descanso, tiempo en movimiento, tiempo ocupado en realizar actividad vertical, tiempo de permanencia en el margen, tiempo de permanencia en el centro, tiempo ocupado en realizar movimientos estereotipados, número de movimientos totales.

Inmunohistoquímica

Los cerebros de los animales evaluados conductualmente se utilizaron para evaluar inmunocitoquímicamente la expresión del BDNF y su receptor (TrkB). Para la obtención del tejido los animales fueron anestesiados con pentobarbital (45mg/kg de peso) y profundidos con solución salina (NaCl 0.15 M) seguida de una solución de paraformaldehído (4%) en amortiguador de fosfatos (pH 7.4, 0.1M). Los cerebros se extrajeron y postfijaron en el mismo fijador durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se trasladaron a una solución de sacarosa (30%) para crioprotección. Los cerebros fueron congelados en 2-metilbutano frío para su corte posterior.

En un criostato se obtuvieron rebanadas coronales de 35 μm , manteniendo temperatura de congelación de -21°C , las rebanadas se coleccionaron de forma secuencial en buffer con 3% de albúmina de suero bovino, 0.1% de Triton X-100 y 0.025% de azida sódica (suero de bloqueo). Posteriormente se llevó a cabo el protocolo de

inmunohistoquímica para observar los cambios en la expresión de receptor a neurotrofina TrkB, también se observó el cambio en la expresión de la neurotrofina BDNF.

Los cortes obtenidos en el criostato se incubaron con el suero de bloqueo toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios contra BDNF diluido 5:500; TrkB diluido 1:1000 en suero de bloqueo, se incubaron durante 24 horas a 4°C en agitación. Se realizaron tres lavados con suero de bloqueo (15 minutos cada uno), después fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario biotinilado (anticonejo) diluido en suero de bloqueo (1:500). Posteriormente se realizaron tres lavados con solución PB. La actividad fue revelada con el Kit DAB (Vector). Para el control de tinción IHC, el anticuerpo primario se omitió y el tejido fue procesado con el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las rebanadas fueron montadas en portaobjetos con gelatina y cubiertas con Permount.

Las imágenes de las secciones dorsal del estriado de los animales control y tratados fueron capturadas y cuantificadas utilizando un sistema de análisis de imagen (Image J 1.41^o del NIH). Las células inmunopositivas se contaron en cuatro campos seleccionados aleatoriamente. El número de células contadas por campo fueron promediadas por animal y después por grupo.

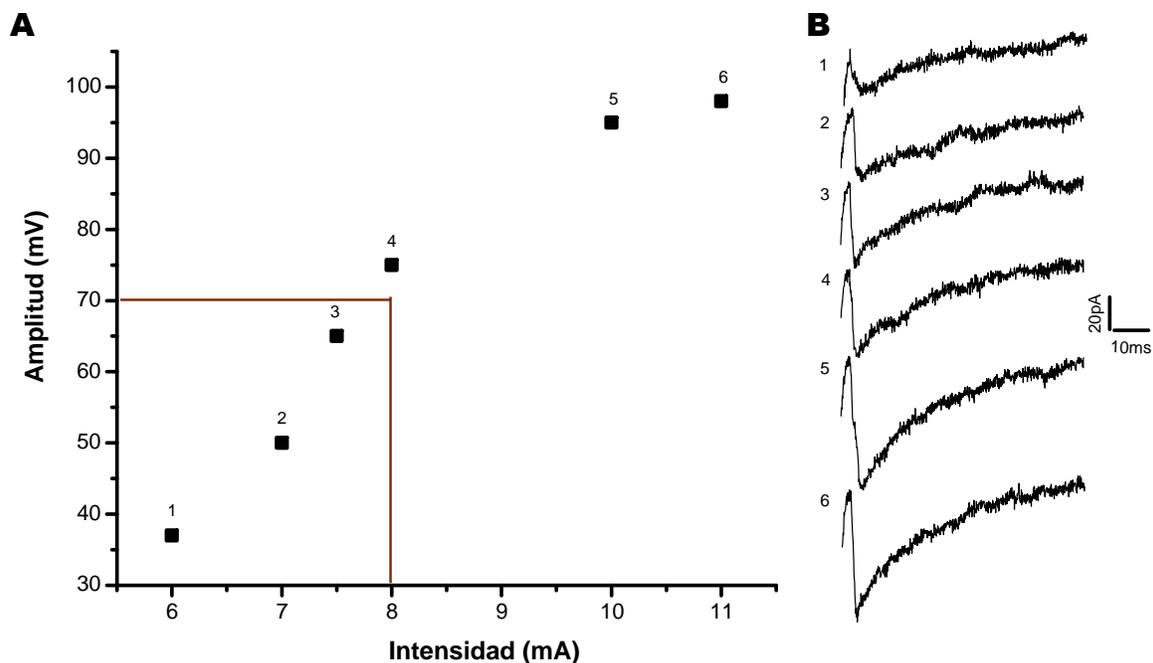
Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre medias de los grupos control y tratados con 3-NP se determinaron mediante la prueba t de student no paramétrica. Los datos son expresados en Media \pm SEM. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativamente diferente. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 5 para Windows (versión 5.02) y Sigma Stat 2.03, Inc.

RESULTADOS

Registros Electrofisiológicos de la Actividad GABAérgica Estriatal

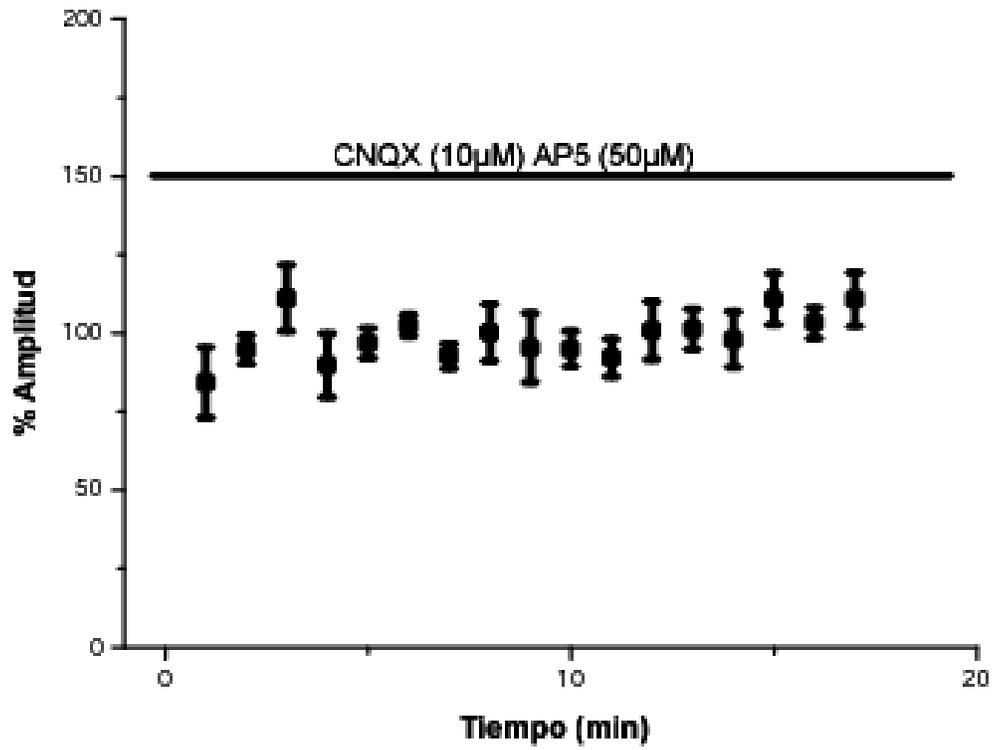
Los registros de las corrientes sinápticas GABAérgicas se obtuvieron estimulando zonas dentro del estriado, y registrando con fijación de voltaje en célula completa. Todos los registros se realizaron en presencia de los inhibidores glutamatérgicos específicos CNQX ($10\mu\text{M}$) y AP5 ($50\mu\text{M}$) para poder aislar la actividad GABAérgica. En la Gráfica 1 se muestra una curva representativa intensidad amplitud de un registro. Esta se obtuvo con el fin de conocer la estimulación necesaria para obtener la mitad de la amplitud máxima de la respuesta poblacional del estriado, y de esta manera no saturar la respuesta y poder observar los cambios en la amplitud de la respuesta debidos a la administración de BDNF.



Gráfica 1. Curva intensidad-amplitud (voltaje vs. amplitud de la espiga poblacional S_1). En A se muestra la gráfica correspondiente a la curva intensidad-amplitud, donde se graficaron las amplitudes obtenidas con cada estímulo dado. El cuadro rojo representa la intensidad a la cual se obtuvo la amplitud media de la respuesta sináptica gabaérgica. En B se muestran los trazos representativos de las amplitudes obtenidas con cada estímulo.

Una vez obtenida la estimulación para obtener la mitad de la amplitud máxima se procedió a realizar un registro utilizando esta estimulación, en este caso se graban 10 minutos de tiempo control para observar que la respuesta de la población se mantiene estable y posteriormente se le aplicó el tratamiento farmacológico (BDNF 50ng/ml).

En la gráfica 2 se muestra el curso temporal de la respuesta sináptica GABAérgica grabada durante 20 minutos aproximadamente, en donde no se le administró el BDNF, ésta gráfica representa un control de duración larga donde observamos que la amplitud de la respuesta GABAérgica se mantiene estable a lo largo del tiempo, de esta manera se constata que los registros se hicieron con células sanas que no presentaban variabilidad a lo largo del tiempo. Todos los registros se realizaron en presencia de los inhibidores glutamatérgicos específicos CNQX (10 μ M) y AP5 (50 μ M).

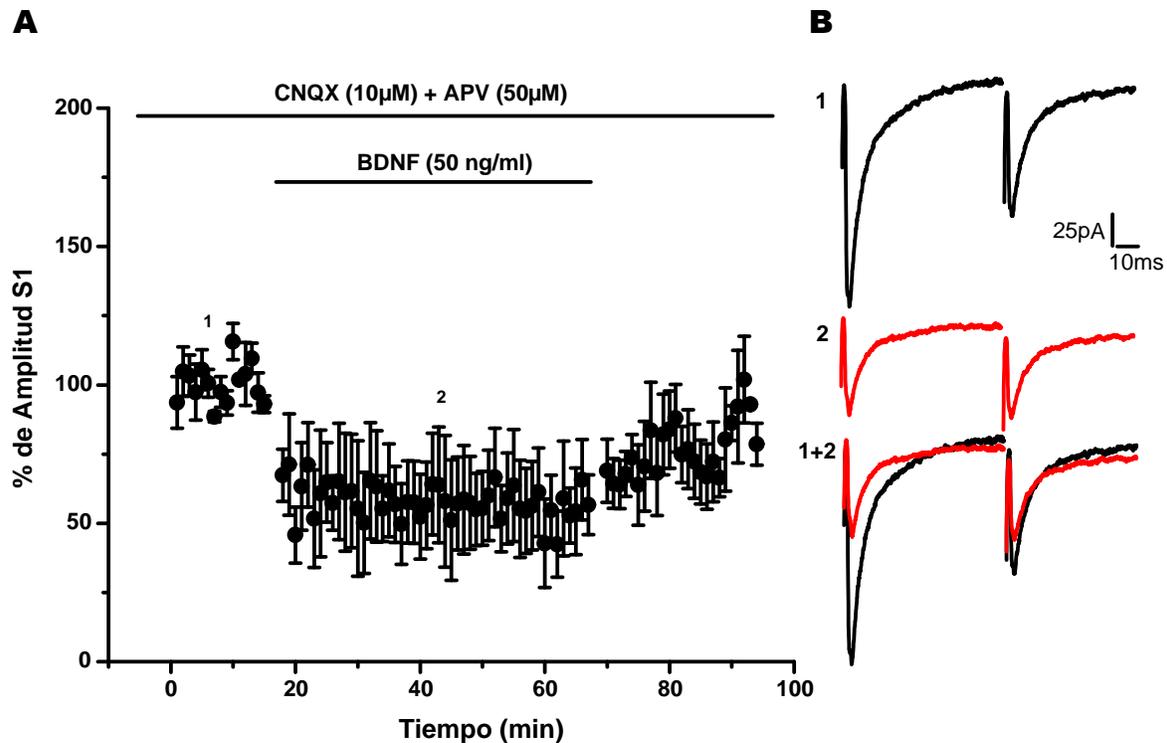


Gráfica 2. Porcentaje de cambio de la respuesta poblacional a lo largo del tiempo (promedio \pm SEM). Los registros fueron hechos en presencia de los inhibidores glutamatérgicos específicos CNQX (10µM) y AP5 (50µM).

Efecto del BDNF en las corrientes sinápticas GABAérgicas en condiciones control

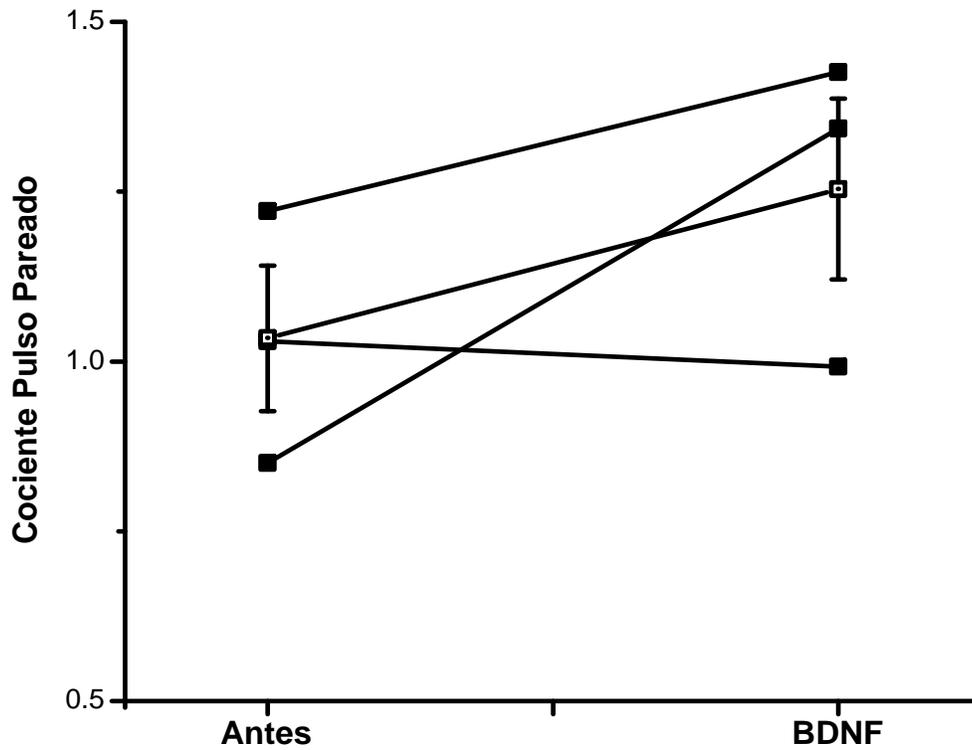
En la Gráfica 3 se muestra la respuesta de las corrientes sinápticas GABAérgicas antes, durante y después de la administración del BDNF (n=3) en condiciones control. Los primeros 15 minutos corresponden a tiempo control, que fue normalizado al 100 por ciento, durante el cual se observa que la respuesta poblacional se mantuvo estable, posteriormente se agregó al baño de la cámara de registro el BDNF (50ng/ml). Durante todo el registro se aplicó continuamente al baño inhibidores glutamatérgicos CNQX (10 μ M) y APV (50 μ M) para poder aislar las corrientes sinápticas GABAérgicas.

La amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas disminuyó $44 \pm 14\%$ respecto al control; como observamos en la Gráfica 3 el efecto del BDNF es reversible al término de su administración. La disminución en la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas fue estadísticamente significativa ($P= 0.03$), por lo tanto el BDNF en condiciones control disminuye la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas (Gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto del BDNF sobre la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas estriatales en condiciones control. (A) Disminución de la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas en la primera espiga (S_1), la disminución fue del $44 \pm 14\%$. (B) Trazos representativos de las corrientes inhibitorias: 1 antes y 2 después de administrar el BDNF. 1+2 es la sobreposición de los trazos 1 y 2. El BDNF se administró a una concentración de 50 ng/ml.

Se evaluó el cociente de la amplitud de la segunda espiga y la amplitud de la primera espiga (S_2/S_1) producidas por el protocolo de pulso pareado (aplicando dos estímulos dados cercanos en el tiempo de 70 ms), encontramos que hubo incremento en el cociente después de haber administrado el BDNF (antes 1.034 ± 0.107 vs. después 1.253 ± 0.133); este incremento es reflejo de la disminución en la eficacia sináptica GABAérgica después de haber administrado el BDNF (Gráfica 4); sin embargo el incremento no fue estadísticamente significativo ($p=0.268$) con respecto al control. Como ambas corrientes cambiaron pero no se modificó la relación del pulso pareado, sugiriendo que la disminución de las corrientes sinápticas GABAérgicas es mediada por mecanismos postsinápticos.

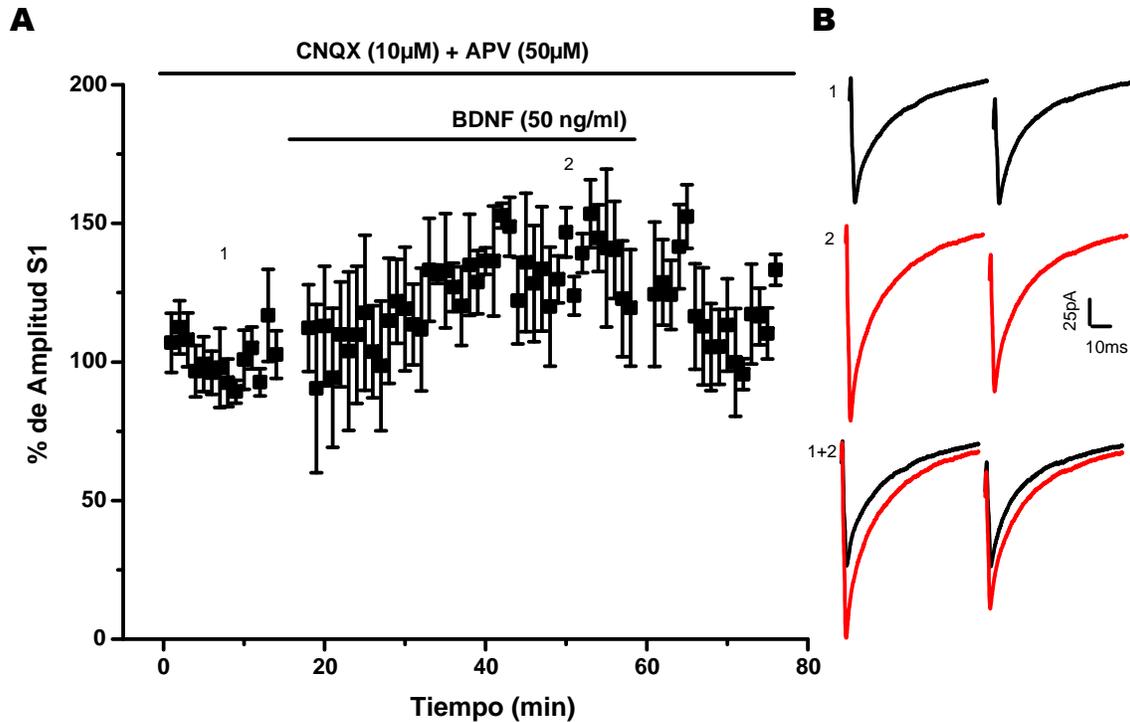


Gráfica 4. Facilitación (S_2/S_1) antes y después de la administración del BDNF, de registro unicelular proveniente de rebanadas de ratones control. Los cuadros negros representan cada uno de los registros obtenidos; mientras que los cuadrados blancos representan el promedio del cociente del pulso pareado antes y después de agregar el BDNF a la cámara de registro.

Efecto del BDNF sobre las corrientes sinápticas GABAérgicas en rebanadas de cerebro provenientes de ratones a los que se les administró la toxina mitocondrial 3-NP

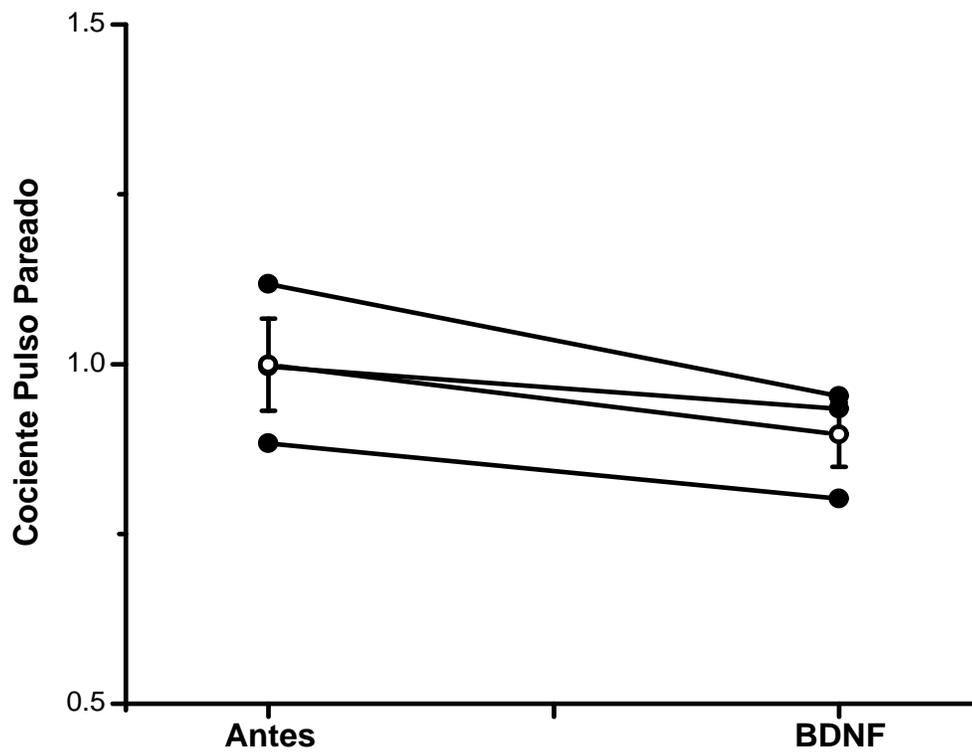
En la Gráfica 5 se muestra la respuesta de la corriente sináptica GABAérgica proveniente de rebanadas de ratones a los que se les administró el 3-NP (15mg/kg) durante 5 días y fueron sacrificados al séptimo. Los primeros 15 minutos corresponden al curso temporal en condiciones control, que fueron normalizados al 100%, posteriormente se administró el BDNF (50ng/ml). Se observa que la neurotrofina incrementa la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas en rebanadas de cerebro provenientes de animales tratados con 3-NP, este incremento fue del $38 \pm 7\%$.

Los cambios observados en la amplitud de la corriente sináptica GABAérgica de la espiga S1 después de administrar el BDNF son estadísticamente significativos ($p=0.006$) respecto a la amplitud S1 antes de administrar la neurotrofina; también el cambio en la amplitud de la espiga S2 es estadísticamente significativa ($p=0.023$).



Gráfica 5. Efecto del BDNF sobre la respuesta sináptica GABAérgica S_1 en células del estriado en condiciones de 3-NP. (A) Cambio de la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas en la primera espiga (S_1), el incremento fue del $38 \pm 7\%$. (B) Trazos representativos de las corrientes inhibitorias: 1 antes y 2 después de administrar el BDNF. 1+2 es la superposición de los trazos 1 y 2. El BDNF se administró a una concentración de 50 ng/ml.

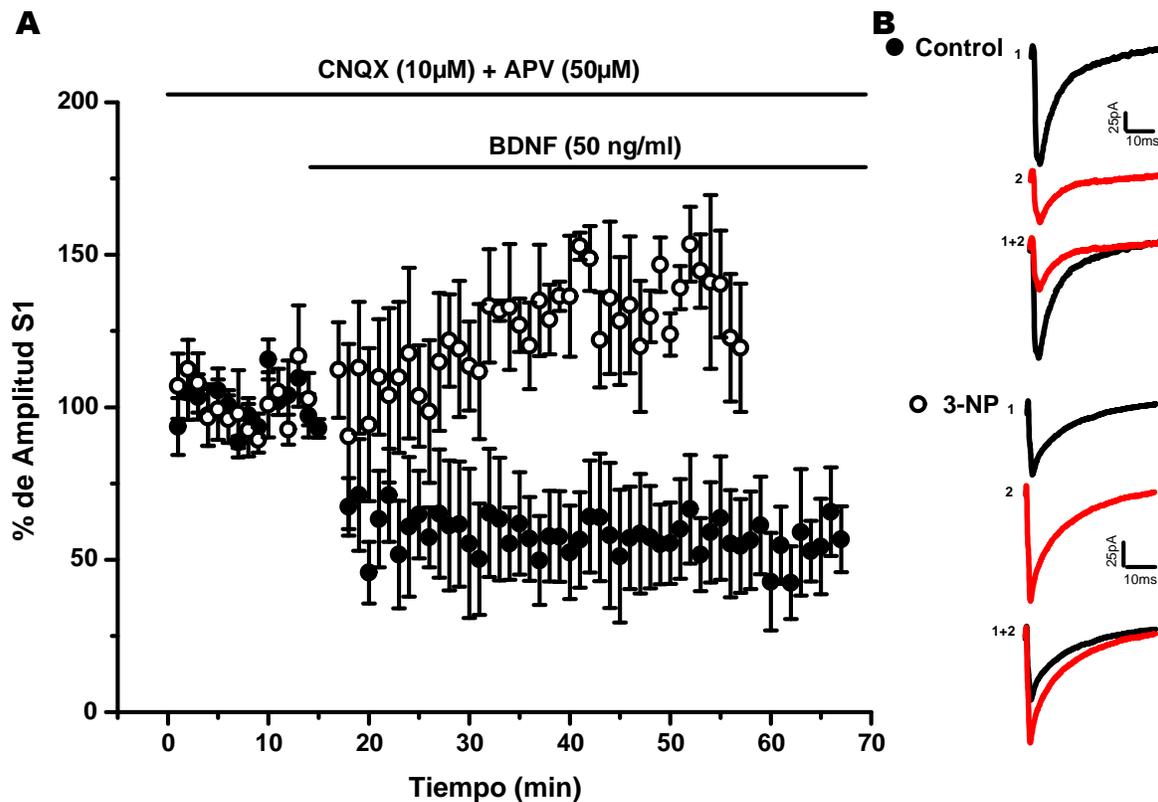
El cociente de las amplitudes de las corrientes S_2/S_1 muestran una disminución después de administrar el BDNF; antes 0.989 ± 0.0686 y después de administrar el BDNF 0.896 ± 0.0475 (Gráfica 6). La disminución del cociente no es estadísticamente significativa por lo que pueden estar involucrados mecanismos postsinápticos en la modulación de las corrientes sinápticas GABAérgicas en respuesta al BDNF.



Gráfica 6. Cociente del Pulso Pareado (S_2/S_1) en registros de célula única provenientes de rebanadas de cerebro de ratón a los que se les administro 3-NP. Los círculos negros representan el cociente S_2/S_1 de cada uno de los registros obtenidos. En círculos blancos se muestra el promedio del cociente antes y después de administrar el BDNF.

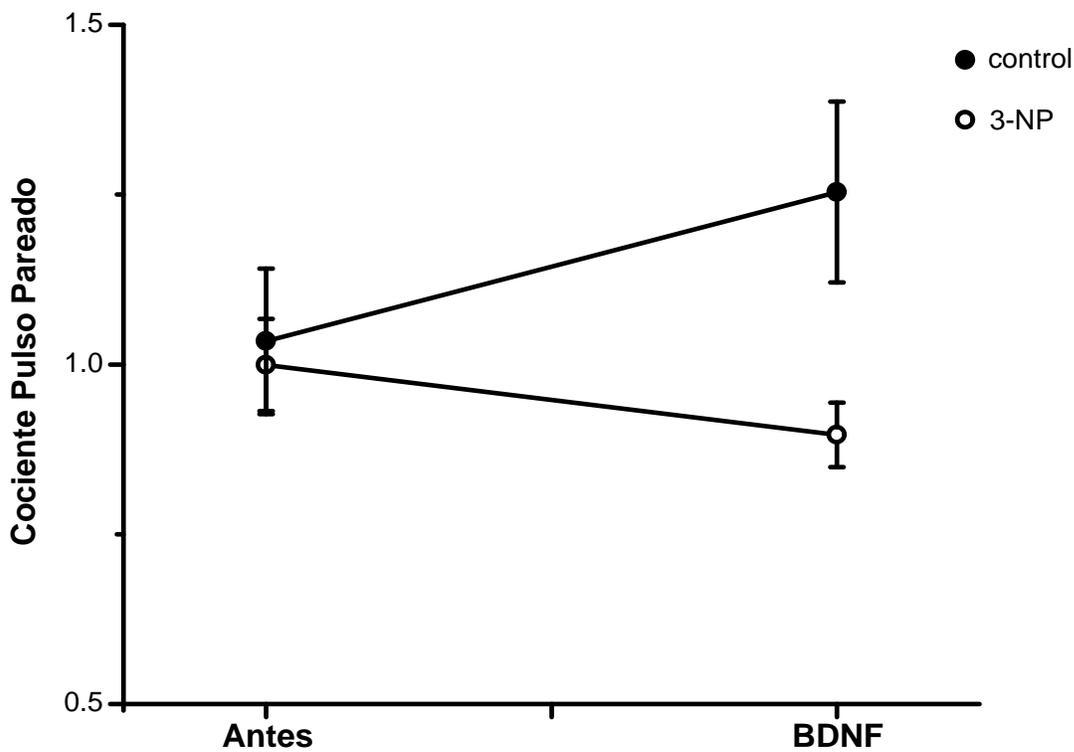
Comparación de la modulación de las corrientes sinápticas GABAérgicas del BDNF en condiciones control vs. 3-NP

Al comparar el efecto del BDNF sobre la amplitud S_1 en ambas condiciones, se observa una diferencia significativa entre el grupo control y el tratado con 3-NP (Gráfica 7). En el grupo control observamos disminución en la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas del $44 \pm 14\%$, mientras que en el grupo tratado con 3-NP se observa incremento del $38 \pm 7\%$ en la amplitud de la corriente sináptica GABAérgica; la diferencia entre condiciones fue estadísticamente significativa ($p=0.007$).



Gráfica 7. Comparación de la modulación del BDNF en las corrientes sinápticas GABAérgicas estriatales de rebanadas de cerebro de ratones control (●) y de ratones tratados con 3-NP (○). (A) Comparación de los cursos temporales de la primera espiga (S_1). (B) Trazos representativos de las corrientes inhibitorias: 1 antes y 2 después de administrar el BDNF. 1+2 es la superposición de los trazos 1 y 2. El BDNF se administró a una concentración de 50 ng/ml.

En cuanto al cociente S_2/S_1 observamos que en condiciones control éste incrementa después de administrar el BDNF (disminuyó la amplitud de la corriente sináptica GABAérgica), mientras que en la condición en la que se administró 3-NP a los ratones, se observa una disminución del cociente S_2/S_1 (incrementó la respuesta). La diferencia observada en el cociente del pulso pareado una vez que se administró el BDNF no fue estadísticamente significativa ($p=0.433$) (Gráfica 8).



Gráfica 8. Comparación del cambio en el cociente de pulso pareado inducido por la administración de la neurotrofina en condiciones control (●) y en condiciones experimentales de 3-NP (○). El cambio en el cociente entre condiciones no es estadísticamente significativo ($p=0.433$).

Evaluación conductual

Otros dos grupos de animales (control y 3-NP) fueron evaluados durante 30 minutos antes de su sacrificio para la posterior evaluación inmunocitoquímica de la neurotrofina BDNF y su receptor TrkB.

En los parámetros referidos a la actividad horizontal y actividad vertical no hubo cambios significativos del grupo tratado con 3-NP respecto a su control actividad horizontal $p=0.5428$; actividad vertical $p=0.4595$. (Figura 6).

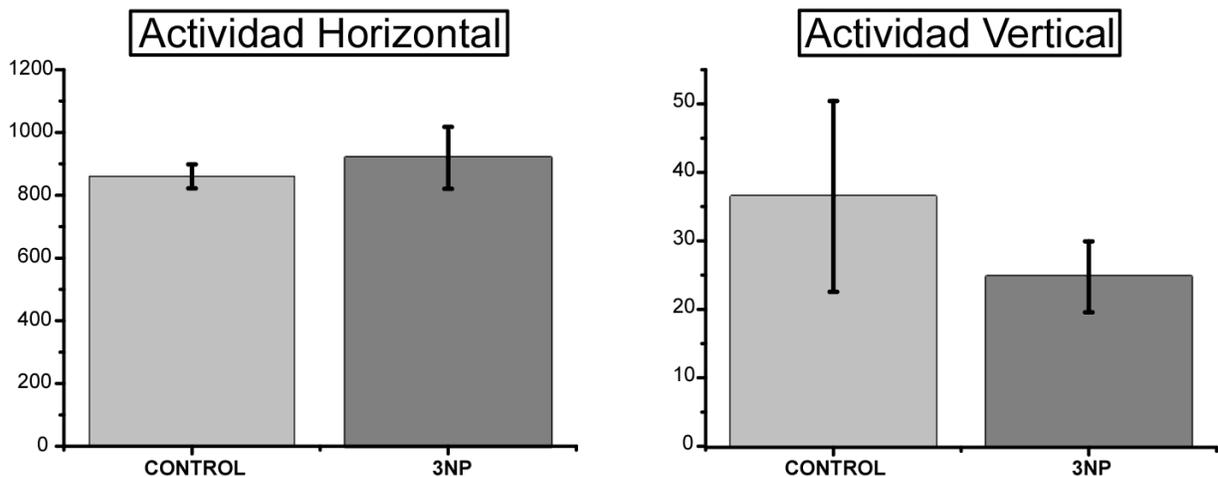


Figura 6. Actividad Horizontal y Actividad Vertical, tomada durante 30 minutos. En cada gráfica se muestran los dos grupos: control y 3NP. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. Actividad Horizontal $p=0.5428$; Actividad Vertical $p=0.4595$.

Otro parámetro evaluado fue la distancia total recorrida (en centímetros), que a su vez fue medida en: distancia recorrida en el margen y distancia recorrida en el centro. Como podemos observar en la Figura 7, hay un incremento en las distancias recorridas en el grupo tratado con 3-NP: distancia total recorrida fue de 347.54 ± 45.5 vs. 206.45 ± 2.99 en condiciones control; $p=0.0213$. La distancia recorrida en el margen fue de 162.75 ± 6.07 cm; en el grupo experimental de 3-NP mientras que el control la distancia fue de 225.83 ± 43 cm. La distancia recorrida en el centro del grupo tratado es significativamente mayor que el grupo control ($p= 0.0066$) 43.62 ± 3.78 vs. 127.79 ± 18.86 . Como reflejo al incremento en la actividad horizontal existe un incremento en la distancia desplazada dentro de la caja en el grupo tratado con 3-NP (Figura 7).

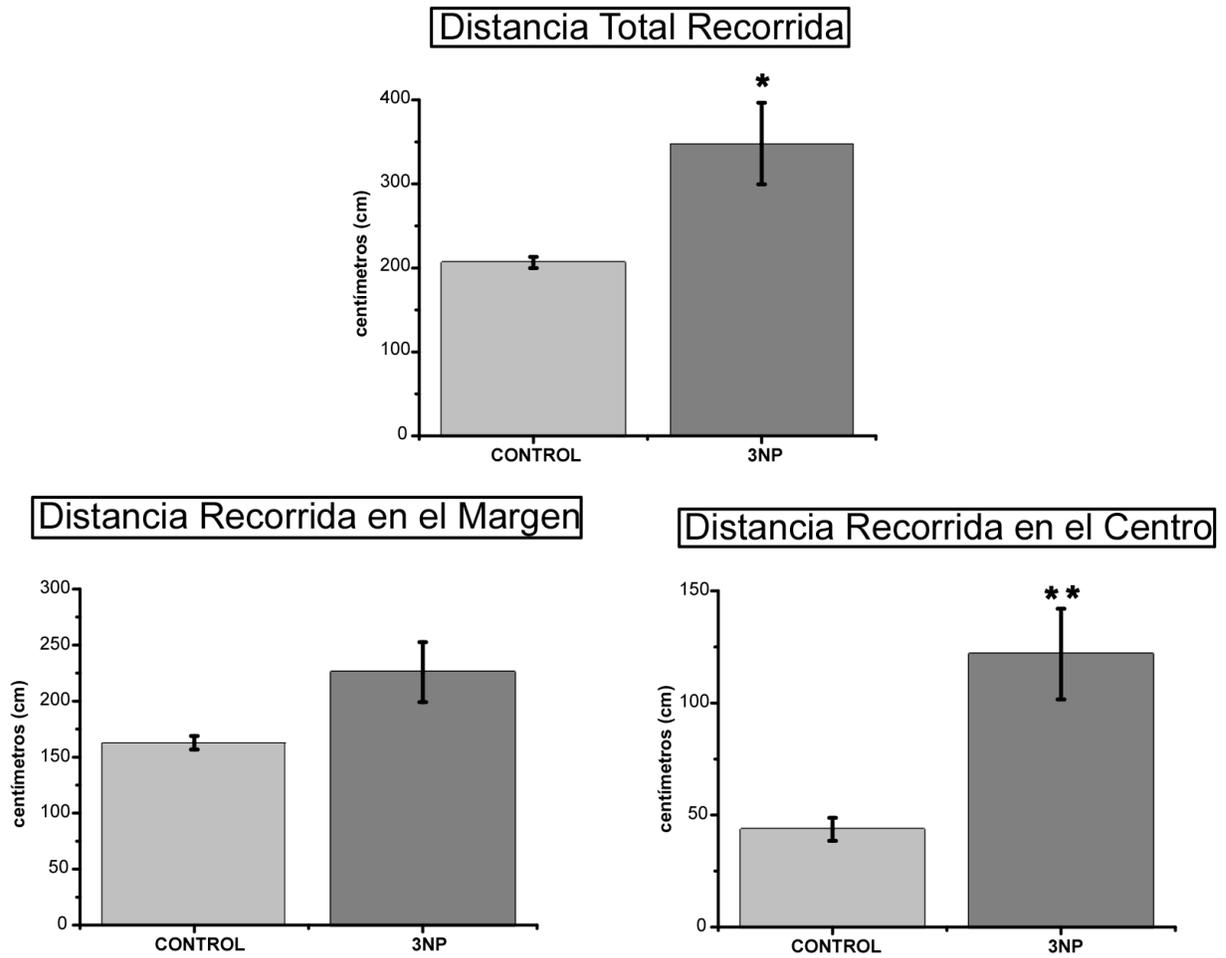


Figura 7. Distancia Recorrida durante 30 minutos. En cada gráfica se muestran los grupos: control y 3NP. Los resultados se expresan en promedio \pm SEM. Distancia total recorrida $p=0.0213$; Distancia recorrida en el margen $p=0.0608$; Distancia recorrida en el centro $p=0.0066$.

Se midió el tiempo (en segundos) que el ratón se mantuvo en movimiento y el tiempo que se mantuvo en reposo. Como observamos en la Figura 8 en la gráfica correspondiente al tiempo que permanecieron en descanso, existe disminución en el tiempo del grupo tratado con 3-NP, así como incremento en el tiempo que pasaron en movimiento; para ambos casos la diferencia con respecto al grupo control es significativa. Tiempo en descanso: 279.6 ± 0.85 control vs. 258.03 ± 5.47 3-NP; $p=0.0079$. Tiempo que se mantuvieron en movimiento: 20.27 ± 0.89 control vs. 41.96 ± 5.47 3-NP, $p=0.0078$.

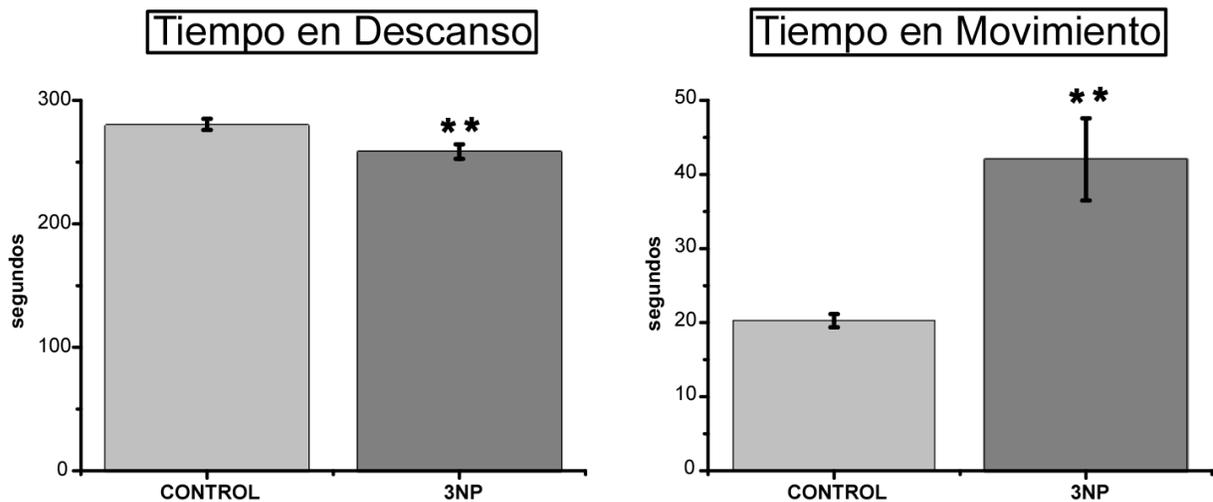


Figura 8. Tiempo (en segundos) que los ratones permanecieron en descanso o en movimiento promediados durante 6 intervalos de 5 minutos cada uno. En cada gráfica se muestran los dos grupos: control y 3NP. Los resultados se expresan en promedio \pm SEM. Tiempo en descanso $p=0.0079$; Tiempo en movimiento $p=0.0078$.

El tiempo que los animales pasaron en movimiento fue dividido en: tiempo ocupado para realizar actividad vertical, tiempo que permanecieron en el margen de la caja, tiempo que ocuparon en la realización de movimientos estereotipados y tiempo que permanecieron en el centro de la caja (Figura 9).

Como podemos observar en la figura 9, en la gráfica correspondiente al tiempo ocupado en actividad vertical hay disminución del tiempo en el grupo tratado con 3-NP respecto a su control (5.12 ± 1.01 3-NP vs. 8.33 ± 3.20 control), sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.3777$). Como hay un incremento de la actividad horizontal, esta correlaciona con la disminución de la actividad vertical.

Mientras que el incremento de tiempo ocupado en realizar movimientos estereotipados en el grupo de 3-NP no es significativo (27.14 ± 0.64 control vs. 31.82 ± 8 3-NP; $p=0.5822$). El tiempo que permanecieron en el margen disminuyó respecto a su control (262.3 ± 8.58 vs. 229.64 ± 11.15), este cambio no es significativo $p=0.0594$. Para el tiempo que permanecieron en el centro hay incremento en el grupo 3-NP (37.7 ± 8.58 vs 70.35 ± 11.15) sin embargo no es significativo $p=0.0594$.

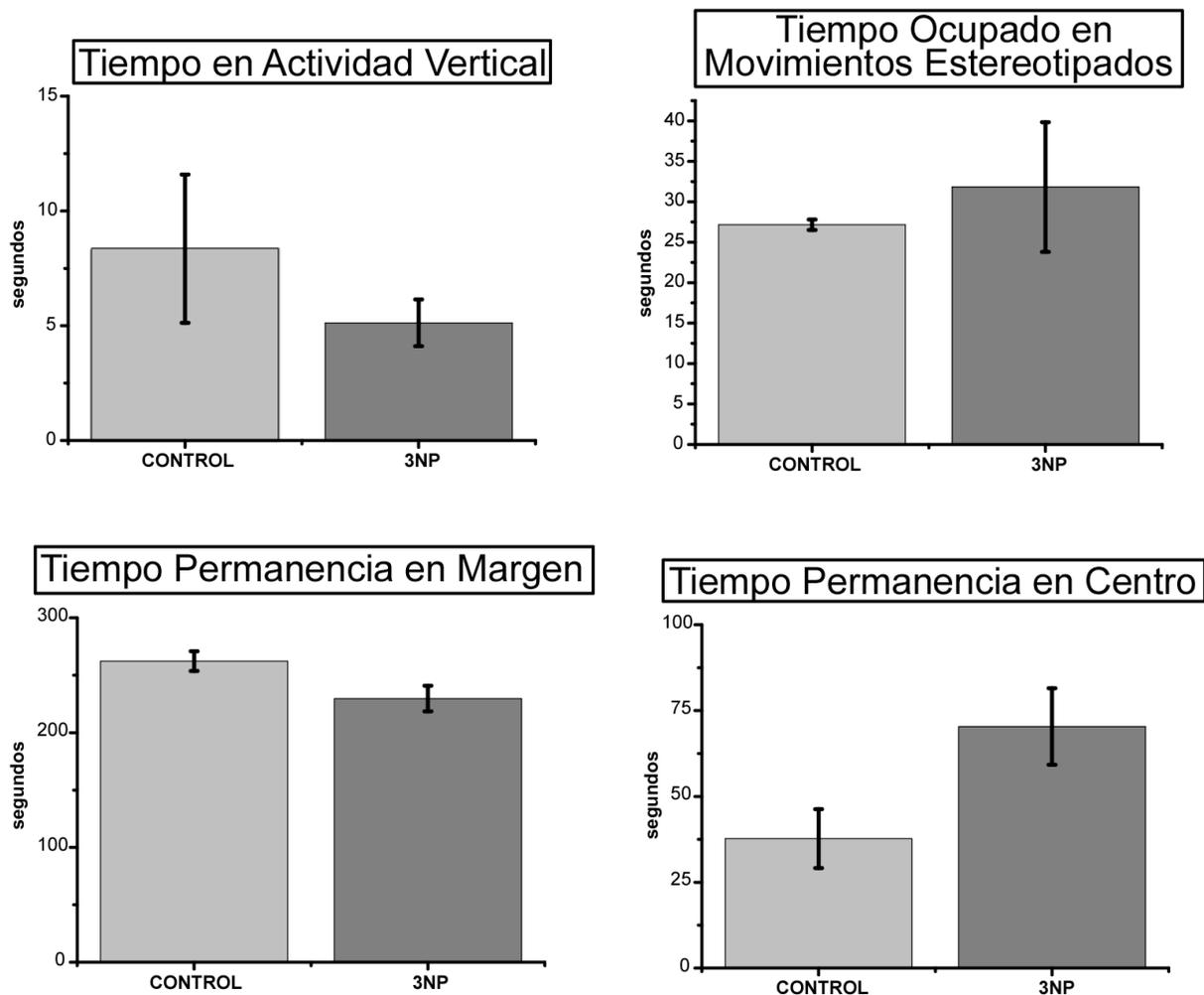


Figura 9. Tiempo (en segundos) que los ratones emplearon en hacer Actividad Vertical, Movimientos estereotipados, permanecieron en el margen de la caja o en el centro de la caja durante el periodo en que duró la evaluación conductual en campo abierto (30 minutos). En cada gráfica se muestran los dos grupos: control y 3NP. Los resultados se expresan en promedio \pm SEM. Actividad Vertical $p=0.3777$; Movimientos estereotipados $p=0.5822$; permanencia en el margen $p=0.0594$; tiempo en el centro $p=0.0594$.

Por último se obtuvo el conteo de todos los movimientos realizados (53 ± 0.57 control vs. 64.5 ± 4.78 3-NP; $p=0.0544$), vemos un incremento en el grupo tratado pero no es significativo estadísticamente respecto a su control. El número de movimientos fueron divididos en: número de movimientos verticales y número de movimientos estereotipados (Figura 10). El número de movimientos verticales (11.75 ± 1.25 3-NP vs. 14.7 ± 4.11 control; $p=0.5111$) y el número de movimientos estereotipados (31.75 ± 0.62

control vs. 33.5 ± 4.19 -NP; $p=0.6941$) no mostraron cambios significativos entre los grupos.

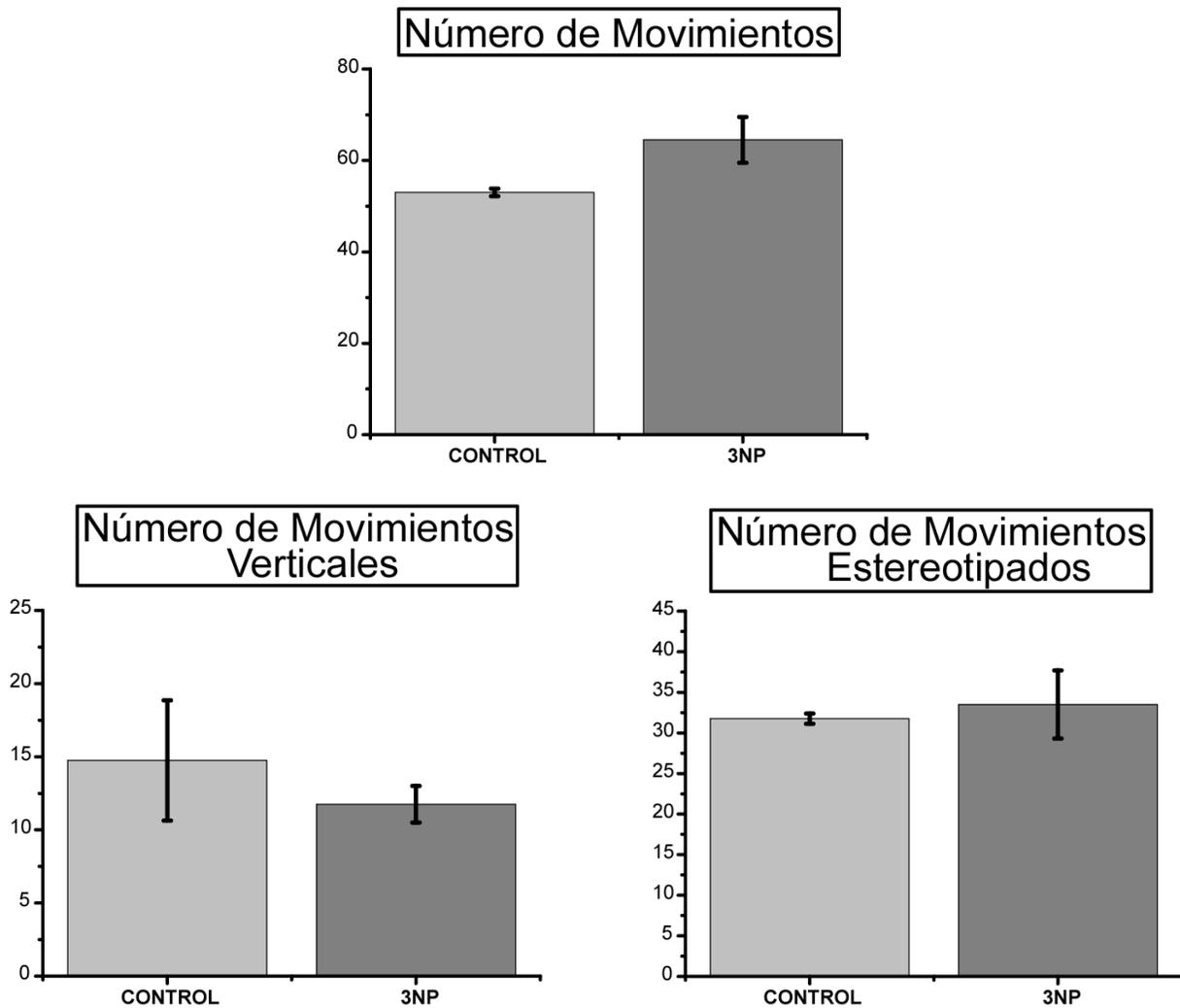


Figura 10. Número de movimientos hechos durante la evaluación conductual en campo abierto (30 minutos). En cada gráfica se muestran los grupos control y 3NP. Los resultados se expresan en promedio \pm SEM. Número de movimientos $p=0.0544$; Número de movimientos verticales $p=0.5111$; Número de movimientos estereotipados $p=0.6941$.

En la figura 11 se muestran los parámetros distancia total recorrida, distancia recorrida en el centro, tiempo en descanso y tiempo en movimiento. Como se puede observar hay un incremento en la actividad, como lo es la distancia total recorrida ($p=0.0213$) y por tanto un incremento en la distancia recorrida en el centro ($p=0.0066$); también existe incremento en el tiempo de actividad del ratón ($p=0.0078$) y por tanto disminución en el tiempo que permaneció inactivo el ratón ($p=0.0079$).

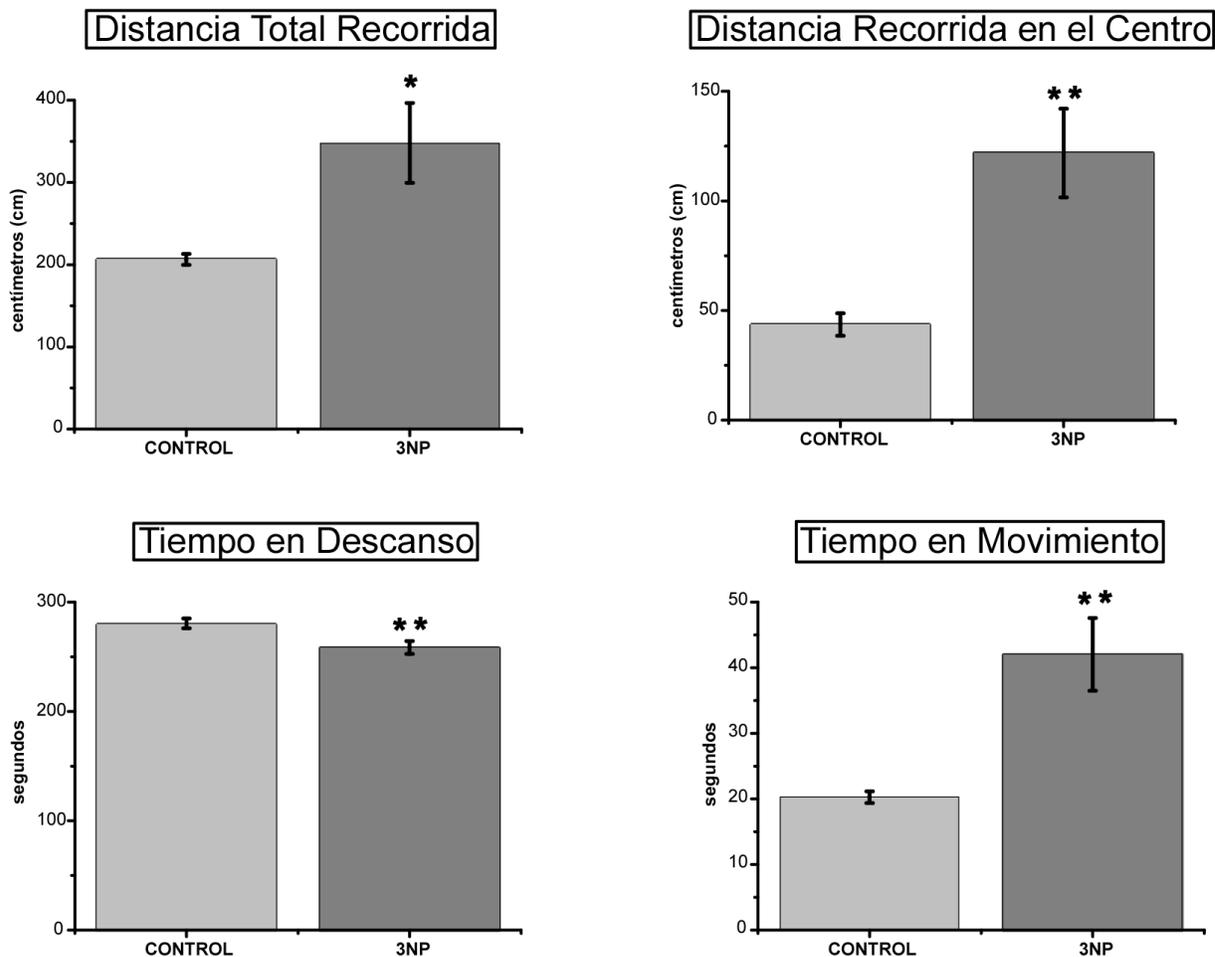


Figura 11. Resumen del efecto de la administración sistémica del 3-NP sobre la actividad espontánea en campo abierto en ratones C57/BL6 y en condiciones control. Distancia total recorrida ($p=0.0213$); Distancia recorrida en el centro ($p=0.0066$); Tiempo de actividad del ratón ($p=0.0078$); Tiempo inactivo ($p=0.0079$).

En la figura 12 se muestran los parámetros de tiempo de permanencia en el margen, tiempo de permanencia en el centro y número de movimientos, donde se no observan cambios significativos entre los grupos.

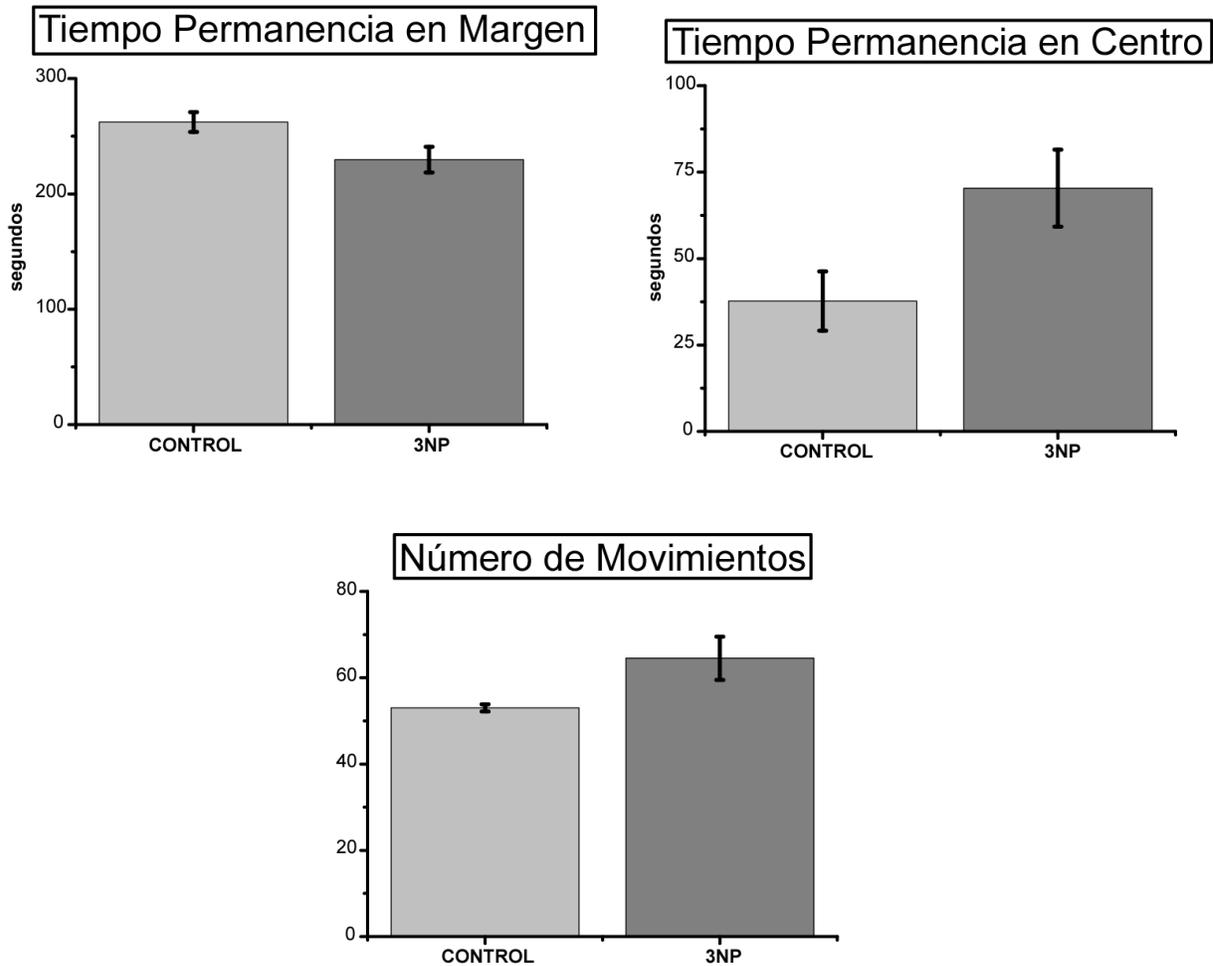


Figura 12. Resumen del efecto de la administración sistémica del 3-NP sobre la actividad espontánea en campo abierto en ratones C57/BL6, donde se muestran cambios en el grupo experimental de 3-NP.

Inmunohistoquímica

Células inmunoreactivas a BDNF

En las rebanadas de estriado se evaluó el número de células inmunoreactivas a BDNF en condiciones control y de 3-NP (Figura 13). No se observó cambio significativo entre los grupos 164.33 ± 16.42 y 3-NP 134.66 ± 22.19 ; $p=0.3430$.

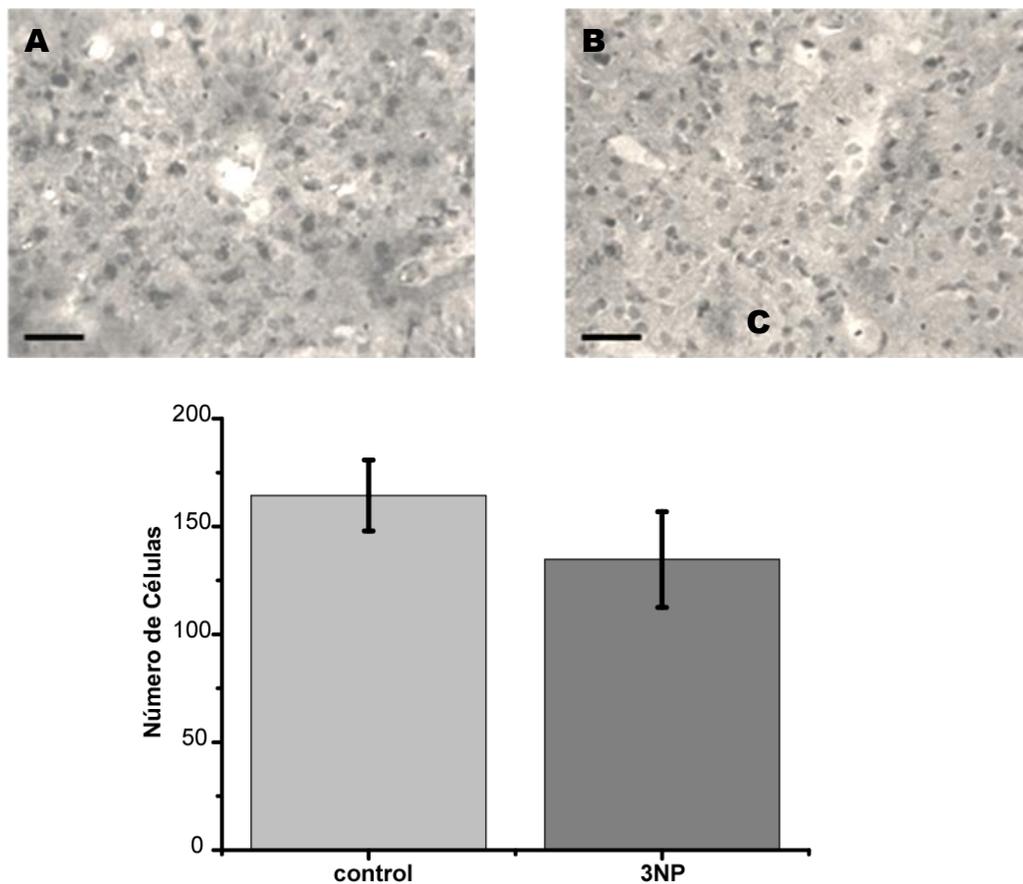


Figura 13. Localización inmunohistoquímica de BDNF en condiciones control (A) y con 3-NP (B); fotografías tomadas con magnificación 40X, barra de escala a $40\mu\text{m}$. (C) Cambios en las células que fueron positivas a la neurotrofina BDNF en condiciones control y de 3-NP. Los valores son expresados en promedio \pm SEM, $p=0.3430$.

Células inmunoreactivas a TrkB

Se evaluó el número de células inmunoreactivas al receptor TrkB. En el conteo de células que fueron positivas al anticuerpo contra el receptor no se observa cambios significativos entre los grupos (Figura 14; 75.33 ± 2.02 control vs. 82 ± 16.25 3-NP; $p=0.7049$).

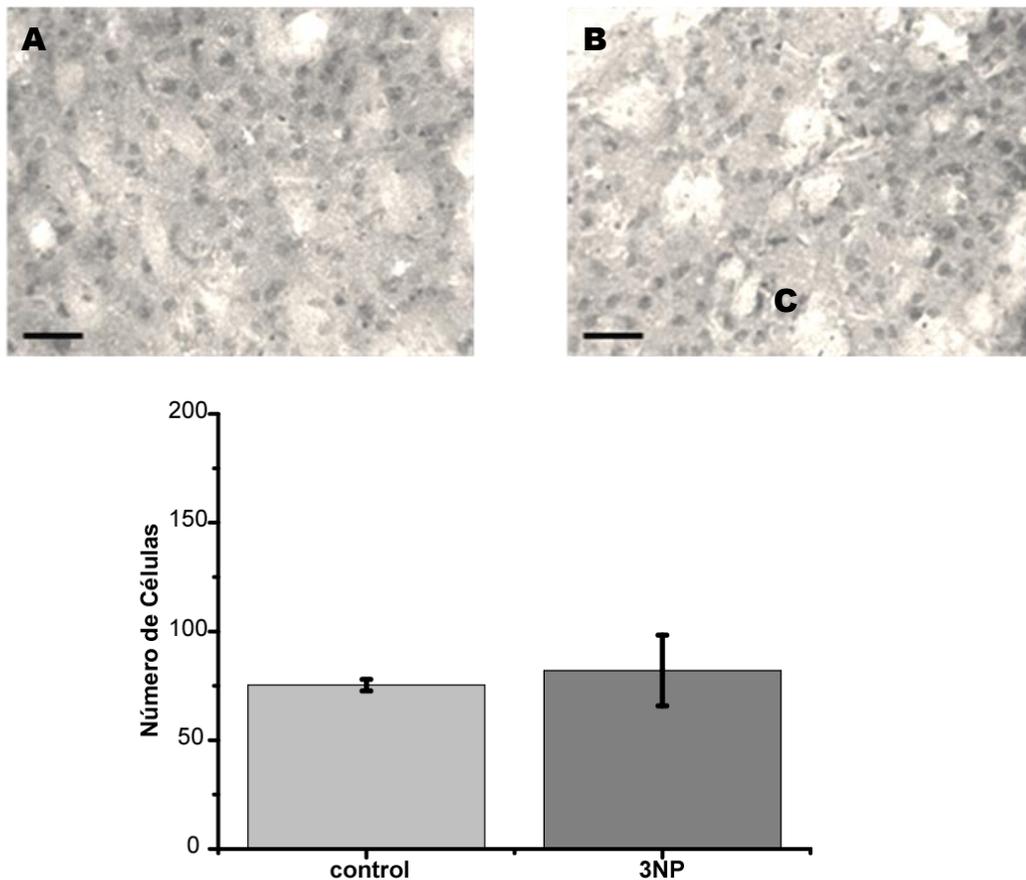


Figura 14. Localización inmunohistoquímica del receptor TrkB en condiciones control (A) y con 3-NP (B); fotografías tomadas con magnificación 40X, barra de escala 40 μ m. (C) Número de células que fueron positivas al receptor TrkB en condiciones control y 3NP. Los resultados están expresados en promedio \pm SEM, $p=0.70492$.

DISCUSIÓN

El BDNF disminuye la amplitud de las corrientes GABAérgicas.

En el presente trabajo se evaluó la modulación de la plasticidad sináptica de corto plazo por el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en corrientes sinápticas GABAérgicas utilizando el registro de fijación de voltaje en célula única. En condiciones control se observó que el BDNF disminuye significativamente la amplitud de las corrientes inhibitorias en un $44 \pm 14\%$, la amplitud se restablece después del lavado.

La amplitud de las corrientes sinápticas puede modificarse por los cambios en la liberación presináptica del transmisor o por cambios en la sensibilidad postsináptica a éste; así como cambios en la expresión de su receptor. Para saber si la disminución de la amplitud de la corriente sináptica fue debida a modificaciones pre o postsinápticas se analizó el cociente de las amplitudes S_2 sobre S_1 antes y después de administrar el BDNF; observamos incremento no significativo en el cociente S_2 / S_1 (antes 1.034 ± 0.107 vs. después 1.253 ± 0.133), lo que nos puede estar indicando que la disminución en la amplitud de las corrientes inhibitorias es debida a un cambio en la postsinapsis. Wardle y colaboradores (2003) mostraron que la modulación del BDNF en las corrientes inhibitorias era atribuible a efectos postsinápticos por los cambios en el transporte de Cl^- . Frerking y colaboradores (1998) y Tanaka y cols. (1997) atribuyeron la reducción de la transmisión inhibitoria del BDNF a efectos postsinápticos y que ésta dependía de la actividad de los receptores TrkB.

A este respecto, en la membrana postsináptica podrían estar ocurriendo cambios como una desregulación en la expresión de los receptores de GABA (Brünig et al., 2001), modificaciones en la apertura de los receptores de GABA por la movilización de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Tanaka et al., 1997). Se sabe que la función de los receptores de GABA es mantenida por su fosforilación (Kittler et

al., 2003); quizás alguna fosfatasa dependiente de calcio activada por la transducción de señales activadas por el BDNF esté involucrada en la desfosforilación de los receptores de GABA disminuyendo la amplitud de las corrientes.

Se ha descrito que los receptores Trk activan PKC y esta a su vez activa PKC β II y el receptor de la cinasa C activada (RACK-1). Además las vías de señalización PKA también están implicadas como proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAPs) y puede asociarse con algunos subtipos de los receptores GABA_A (Brandon et al., 1999, 2000, 2000a, b, 2003). También se ha visto que la modulación de las corrientes sinápticas GABAérgicas ocurre por la fosforilación de PKC seguida de la fosforilación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), estos eventos desfosforilan los receptores GABA. (Jovanovic et al., 2004). Kanematsu y colaboradores (2006) demostraron que la fosfolipasa c- asociada a proteína inactiva (PRIP-1, PRIP-2) juega un papel importante en la regulación de los receptores GABA mediando la asociación entre las diferentes subunidades del receptor con proteínas fosfatasas.

También hay que considerar que el BDNF reduce la respuesta GABAérgica mediante la reducción de la expresión de los receptores GABA_A en la superficie postsináptica a través de la activación de los receptores TrkB, este mecanismo de endocitosis de los receptores es mediado por dinamina (Hewitt y Bains, 2006).

Por lo que podríamos suponer que un mecanismo postsináptico involucrado en la disminución en la amplitud de las corrientes GABAérgicas sea el estado de fosforilación de los receptores GABA. Otro que podría estar ocurriendo sería la disminución de los receptores GABA mediada por mecanismos de dinamina, ambos mecanismos activados por los receptores TrkB, los cuales se encuentran altamente expresados en las espinas de las neuronas espinosas medianas.

En experimentos futuros habrá que inhibir a los receptores TrkB o inhibir la dinamina para observar si es posible bloquear la corriente inhibitoria; así como medir

la conductancia de los receptores de GABA y observar los cambios en la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas; y de esta manera dilucidar el o los mecanismos que participan en la disminución de la amplitud de las corrientes GABAérgicas en neuronas espinosas medianas en presencia de BDNF.

Modulación del BDNF en las corrientes GABAérgicas en el modelo de 3-NP de la EH.

Una vez evaluada la modulación que ejercía el BDNF sobre las corrientes sinápticas GABAérgicas en condiciones control, también se evaluó en el modelo de 3-NP de la EH. Se observó que la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas incrementó $38 \pm 7\%$, este aumento fue estadísticamente significativo respecto a las condiciones antes de administrar el BDNF. Analizando el cociente del pulso pareado, no se observaron diferencias significativas antes 0.989 ± 0.0686 respecto a la aplicación de BDNF 0.896 ± 0.0475 ; por lo que el aumento de la amplitud de las corrientes sinápticas GABAérgicas puede deberse a mecanismos postsinápticos.

Se ha visto que el daño excitotóxico producido por la administración de varios aminoácidos excitadores provoca incremento en los niveles de RNAm del receptor TrkB (Canals et al., 1999). Los cambios en la expresión de los receptores pueden modificar los procesos de plasticidad neuronal; aunque en nuestros resultados no existió un cambio significativo en la marca de los receptores, significa que los cambios en la amplitud de las corrientes GABAérgicas no dependen de cambios en el número de receptores y quizá signifique cambios a otro nivel, como en las vías de señalización involucradas en la activación de los receptores TrkB.

Por otra parte se sabe que el 3-NP induce una desregulación en la expresión del receptor D1 y de la proteína PKA, mientras que la expresión del receptor D2 se incrementa. También hay incremento de los niveles de calcio intracelular que induce modificaciones en la regulación de la actividad de CAM-KII, CDK5, incrementa la

fosforilación de DARPP-32-thr75 (Napolitano et al., 2004), induce despolarización de la membrana y ésta es asociada con un incremento en la liberación de GABA endógeno (Saulle et al., 2004); la estimulación de los receptores D2 favorece la liberación de calcio de los reservorios intracelulares. A estos niveles de calcio se les suman aquellos incrementos inducidos por el BDNF mediante la activación de los receptores TrkB, que activa PLC- γ 1 que genera IP3, el cual moviliza el calcio intracelular. El aumento de las concentraciones de calcio puede activar otras proteínas cinasas que fosforilen a los receptores de GABA incrementando su conductancia, permaneciendo más tiempo abierto, elevando las concentraciones de cloro y de esta manera aumentando la amplitud de las corrientes inhibitorias.

Podemos suponer que en el modelo farmacológico de la EH hay modificaciones membranales y en la transducción de las vías de señalización activadas por BDNF que se ven reflejadas en el aumento de la amplitud de la corriente sináptica GABAérgica al administrarse el BDNF. El BDNF podría estar incrementando la conductancia de cloro en las sinapsis GABAérgicas en condiciones de 3-NP, este puede ser un mecanismo compensatorio al exceso de actividad excitatoria, el aumento de la amplitud de cloro significa más inhibición y por tanto involucraría un freno en la excitabilidad celular inducida por la administración de 3-NP.

Comparación de la modulación de las corrientes GABAérgicas del BDNF en condiciones control vs. 3-NP.

Los mecanismos que pudieran estar participando en la disminución de la amplitud de la respuesta GABAérgica por el BDNF podrían verse menos favorecidos en condiciones de 3-NP, de manera que ante el daño excitotóxico las corrientes inhibitorias incrementen su amplitud compensando el exceso de actividad excitatoria. En condiciones control el mecanismo que podría estar participando en la disminución

de la amplitud de las corrientes GABA pudiera ser el siguiente: El BDNF activa a sus receptores TrkB, que actúa sobre la vía PLC- γ 1 que hidroliza a PIP2 generando PI3 y DAG, este último estimula las isoformas de PKC; Connolly y colaboradores (1999) observaron que la actividad de PKC está involucrada en la desregulación de los receptores de GABA ($GABA_A$); la PKC pudiera estar activando alguna fosfatasa que desfosforile los receptores GABA o bien que active los mecanismos dependientes de dinamina para inducir la endocitosis de los receptores y de esta manera ver una disminución en la amplitud de las corrientes GABAérgicas. En cambio, en condiciones donde se administró a los ratones 3-NP observamos un aumento en la amplitud de las corrientes GABAérgicas, de manera que el BDNF pudiera estar afectando la vía antes descrita y junto con el incremento en las concentraciones de calcio se estén activando cinasas que permitan una mayor fosforilación de los receptores de GABA ($GABA_A$) provocando un incremento en la amplitud de las corrientes inhibitorias GABAérgicas; este sería un mecanismo neuroprotector ante la excitabilidad a la que está expuesta las neuronas del estriado por el 3-NP.

Efecto del 3-NP en la conducta espontánea en campo abierto.

Para tener un correlato conductual de las posibles alteraciones electrofisiológicas ante la administración del 3-NP, se evaluó los cambios en la conducta espontánea en campo abierto y observamos cambios significativos en los siguientes parámetros: distancia total recorrida: 206.45 ± 2.99 control vs. 347.54 ± 45.5 3-NP ($p = 0.0213$), distancia recorrida en el centro: 43.62 ± 3.78 control vs. 127.79 ± 18.86 3-NP ($p = 0.0066$), tiempo en descanso: 279.6 ± 0.85 control vs. 258.03 ± 5.47 3-NP ($p = 0.0079$) y tiempo en movimiento: 20.27 ± 0.89 control vs. 41.96 ± 5.47 3-NP ($p = 0.0078$). Los ratones incrementaron la distancia recorrida dentro de la caja, que aumento dado que recorrieron mayor distancia en el centro de la caja. Así mismo se amplió el tiempo que pasaron en movimiento los ratones a los que se les administró 3-NP y por

tanto hubo disminución en el tiempo que pasaron inactivos. Estos resultados reflejan la hiperactividad que presentan los ratones al administrarles 3-NP, como ya se ha observado en otros trabajos (Borlongan et al., 1997b; Dalbem et al., 2005). Podemos decir que la dosis y tiempo de administración de la toxina 3-NP es suficiente para poder observar cambios conductuales en algunos parámetros de la actividad espontánea en campo abierto.

Se sabe que la aparición de los síntomas y la severidad de estos dependen de la dosis, tiempo de administración de la toxina y sexo, edad y cepa utilizada (revisado en Brouillet et al., 2005; Túnez y Santamaría, 2009), sin embargo para la enfermedad de Huntington es posible ver alteraciones neuropatológicas aun sin observar deficiencias conductuales (Borlongan et al., 1995; 1997b). Con dosis bajas y la administración sistémica del 3-NP los síntomas pueden aparecer de manera progresiva, como reflejo del daño neuronal ocasionado por el daño metabólico debido a la administración de la toxina, el cual también ocurre de manera progresiva (Beal et al., 1993); tal y como ocurre en la degeneración de la enfermedad de Huntington (Brouillet et al., 2005).

La dosis de 15 mg/Kg administrada durante 5 días de 3-NP, está alterando los circuitos neuronales, provocando despolarización de la membrana y dada la susceptibilidad de las neuronas espinosas medianas a las aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza; el circuito se encuentra excitado, activando las sinapsis que participan en las funciones motoras promoviendo el movimiento.

Inmunohistoquímica

Al evaluar el número de células inmunoreactivas a BDNF y su receptor TrkB no existió cambio significativo con respecto al grupo control. Se sabe que la principal característica de la administración subaguda del 3-NP es la presencia de degeneración

estriatal y degeneración en otras áreas como corteza y GP (revisado en Brouillet et al., 1999 y 2005). La toxina afecta a las neuronas espinosas medianas (NEM) de proyección produciendo cambios en las ramificaciones dendríticas (Brouillet et al., 1999). Al parecer estas anormalidades morfológicas son consecuencia de mecanismos compensatorios que toman lugar después de la degeneración de las neuronas de alrededor o resultado de una respuesta intrínseca de las neuronas a deficiencias energéticas crónicas (Brouillet et al., 1999). En estudios previos del laboratorio (Rodríguez et al., 2010, Hernández Echeagaray et al., 2010) hemos demostrado que las dosis empleadas en este estudio producen degeneración de tipo apoptótica que pudieran ser responsables en parte de las alteraciones conductuales que hemos observado en el presente trabajo de tesis.

Si bien no observamos cambios significativos en el número de células inmunoreactivas a BDNF y su receptor muy probablemente porque la dosis utilizada y el tiempo de administración no es suficiente como para poder observar mayores cambios en el número de células; sin embargo, si observamos cambios en la actividad eléctrica y en la actividad conductual; por lo que podemos decir que a la dosis que usamos de 15 mg/kg de peso administrada durante 5 días, es suficiente para producir cambios en las corrientes inhibitorias en el estriado y en la conducta motora de los ratones.

El BDNF modula la plasticidad sináptica GABAérgica estriatal disminuyendo la amplitud de las corrientes sinápticas en condiciones control; al parecer, esto es debido a modificaciones postsinápticas. Mientras que en el modelo murino de la enfermedad de Huntington, el BDNF incrementa la amplitud de las corrientes, aquí podría estar participando un mecanismo neuroprotector ante el exceso de actividad neuronal excitatoria debida a la administración del 3-NP.

CONCLUSIONES

- ❖ El BDNF disminuye la amplitud de la respuesta sináptica GABAérgica en el estriado en condiciones control, esta disminución parece ser debida a mecanismos postsinápticos.
- ❖ En el modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington se observa un incremento en la amplitud de la corriente sináptica que puede estar modulado por mecanismos compensatorios ante el aumento de la actividad excitatoria por la administración del 3-NP.
- ❖ En los ratones tratados con 3-NP se observa disminución en la actividad vertical, mientras que hay aumento en la distancia recorrida y en el tiempo que pasaron en movimiento.

ANEXO 1

Hoja Técnica del BDNF utilizado para los registros electrofisiológicos.



Product Information Recombinant Human BDNF

Synonyms: Brain Derived Neurotrophic Factor

Description: BDNF is a member of the NGF family of neurotrophic growth factors. Like other members of this family, BDNF supports neuron proliferation and survival. BDNF can bind to a low affinity cell surface receptor called LNGFR, which also binds other neurotrophins such as NGF, NT-3 and NT-4. However, BDNF mediates its neurotrophic properties by signaling through a high affinity cell surface receptor called gp145/trkB. BDNF is expressed as the C-terminal portion of a 247 amino acid polypeptide precursor, which also contains a signal sequence of 18 amino acid residue and a propeptide of 110 amino acid residues. Recombinant human BDNF is a 27.0 kDa homodimer of two 119 amino acid subunits linked by strong non-covalent interactions.

Catalog #: 450-02 **Lot #:** 120661

Source: *E.coli*

Purity: Greater than 98% by SDS-PAGE gel and HPLC analyses

Endotoxin level: Endotoxin level is less than 0.1 ng per µg (1EU/µg).

Formulation: Sterile filtered through a 0.2 micron filter. Lyophilized with no additives.

Reconstitution: Centrifuge the vial prior to opening. Reconstitute in water to a concentration of 0.1-1.0 mg/ml. This solution can then be diluted into other aqueous buffers and stored at 4°C for 1 week or -20°C for future use.

Storage/Stability: The lyophilized protein is stable for at least 2 years from date of receipt at -20°C. Reconstituted BDNF is stable for at least 3 months when stored in working aliquots with a carrier protein at -20°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

Biological Activity: **Assay #1:** Determined by the dose-dependent induction of choline acetyl transferase activity in rat basal forebrain primary septal cultures. The expected ED₅₀ for this effect is 25-50 ng/ml.
Assay #2: Determined by its ability to stimulate chick E8 neurite outgrowth. The expected ED₅₀ for this effect is 0.1-1.0 ng/ml.

For a list of references using this product please visit our website at www.peprotech.com

Usage: For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

Country of Origin: USA

Cascada 911, Local "A" Col. Banj
C.P. 09450 México,
Tel. (5255) 5672 0
Tel./Fax: 5672 0
pepromex@prodigy.net.mx www.peprotech.com

REFERENCIAS

Acheson A., Conover J., Fandl J., DeChiara T., Russell M., Thadani A., Squinto S., Yancopoulos G., Lindsay R. (1995). A BDNF Autocrine Loop in Adult Sensory Neurons Prevents Cell Death. *Nature*, 374: 450-453.

Akaneya Y., Tsumoto T., Kinoshita S., Hatanaka H. (1997). Brain-Derived Neurotrophic Factor Enhances Long-Term Potentiation in Rat Visual Cortex. *The Journal of Neurosciences*, 17: 6707-6716.

Alberch J., Pérez-Navarro E., Canals J. (2004). Neurotrophic Factors in Huntington's disease. *Progress in Brain Research*, 164: 195-229.

Almeida R., Manadas B., Melo C., Gomes J., Mendes C., Grãos M., Carvalho R., Carvalho A., Duarte C. (2005). Neuroprotection by BDNF Against Glutamate-induced Apoptotic Cell Death is Mediated by ERK and PI3-kinase Pathways. *Cell Death and Differentiation*, 12: 1329-1343.

Almeida S., Laço M., Cunha-Oliveira T., Oliveira C., Rego C. (2009). BDNF Regulates BIM Expression Levels in 3-Nitropropionic Acid-treated Cortical Neurons. *Neurobiology of Disease*, 35: 448-456.

Altar C., Cai, N., Bliven T., Juhasz M., Conner J., Acheson A., Lindsay R., Wiegand S. (1997) Anterograde Transport of Brain-Derived Neurotrophic Factor and its Role in the Brain. *Nature*, 389: 856-860.

Bacsi A., Woodberry M., Widger W., Papaconstantinou J., Mitra S., Peterson J., Boldog I. (2006). Localization of Superoxide Anion Production to Mitochondrial Electron Transport Chain in 3-NPA-treated Cells. *Mitochondrion* 6: 235-244.

Beal M., Brouillet E., Jenkins B., Ferrante R., Kowal N., Miller J., Storey E., Srivastava R., Rosen B., Hyman B. (1993). Neurochemical and Histologic Characterization of Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid. *The Journal of Neuroscience*, 13: 4181-4192.

Binder D. K., Scharfman H. E. (2004). Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*, 22: 123-131.

Bolam J., Hanley J., Booth P., Bevan M. (2000). Synaptic Organization of the Basal Ganglia. *Journal of Anatomy*, 196: 527-542.

Borlongan C., Koutouzis T., Freeman T., Cahill D., Sanberg P. (1995). Behavioral Pathology Induced by Repeated Systemic Injections of 3-Nitropropionic Acid Mimics the Motoric Symptoms of Huntington's disease. *Brain Research*, 697: 254-257.

Borlongan C., Nishino H., Sanberg P. (1997a). Systemic, but not Intraparenchymal, Administration of 3-Nitropropionic Acid Mimics the Neuropathology of Huntington's disease: a Speculative Explanation. *Neuroscience Research*, 28: 185-189.

Borlongan C., Koutouzis T., Sanberg P. (1997b). 3-Nitropropionic Acid Animal Model and Huntington's Disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21: 289-293.

Brandon N., Uren J., Kittler J., Wang H., Olsen R., Parker P., Moss S. (1999). Subunit Specific Association of Protein Kinase C and the Receptor for Activated C Kinase with GABA type A Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 19: 9228-9234.

Brandon N., Delmas P., Kittler J., McDonnald B., Sieghart W., Brown D., Smart T., Moss S. (2000). GABA_A Receptor Phosphorylation and Functional Modulation in Cortical Neurons by a Protein Kinase C-dependent Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 38856-38862.

Brandon N., Jovanovic J., Moss S. (2002a). Multiple Roles of Protein Kinases in the Modulation of GABA (A) Receptor Function and Cell Surface Expression. *Pharmacology and Therapeutics*, 94: 113-122.

Brandon N., Jovanovic J., Smart T., Moss S. (2002b). Receptor for Activated C Kinase-1 Facilitates Protein Kinase C-dependent Phosphorylation and Functional Modulation of GABA_A Receptors with the Activation of G-protein-coupled Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 22:6353-6361.

Brandon N., Jovanovic J., Colledge M., Kittler J., Brandon J., Scott J., Moss S. (2003) A-kinase Anchoring Protein 79/150 Facilitates the Phosphorylation of GABA(A) Receptors by cAMP-dependent Protein Kinase Via Selective Interaction with Receptor Beta Subunits. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 22:87-97.

Brodal, P. (1992). *The Central Nervous System. Structure and Function*. United States of America: Oxford University Press. Inc.

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

Brouillet E., Conde F., Beal M.F., Hantraye P. (1999) Replicating Huntington's Disease Phenotype in Experimental Animals. *Progress in Neurobiology*, 59:427-468.

Brouillet E., Jacquard C., Bizat N., Blum D. (2005). 3-Nitropropionic Acid: A Mitochondrial Toxin to Uncover Physiopathological Mechanism Underlying Striatal Degeneration in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 95: 1521-1540.

Brünig I., Penschuck S., Berninger B., Benson J., Fritschy J. (2001). BDNF Reduces Miniature Inhibitory Postsynaptic Currents by Rapid Downregulation of GABA (A) Receptor Surface Expression. *European Journal of Neuroscience*, 13: 1320-1328.

Canals J., Marco S., Checa N., Michels A., Pérez-Navarro E., Arenas E., Alberch J. (1998). Differential Regulation of the Expression of NGF, BDNF and NT-3 After Excitotoxicity in a Rat Model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 5: 357-364.

Canals J., Checa N., Marco S., Michels A., Pérez-Navarro E., Alberch J. (1999). The Neurotrophin Receptors *trkA*, *trkB* and *trkC* are Differentially Regulated After Excitotoxic Lesion in Rat Striatum. *Molecular Brain Research*, 69: 242-248.

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

Carmignoto G., Pizzorusso T., Tia S., Vicini S. (1997). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor Potentiate Excitatory Synaptic Transmission in the Rat Visual Cortex. *The Journal of Physiology*, 498: 153-164.

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

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

Connolly C., Kittler J., Thomas P., Uren J., Brandon N., Smart T., Moss S. (1999) Cell Surface Stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on Protein Kinase C activity and Subunit Composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 36565-72.

Curtis R., Adryan K., Stark J., Park J., Compton D., Weskamp G., Huber L., Chao M., Jaenisch R., Lee K., Lindsay R., DiStefano P. (1995). Differential Role of the Low Affinity Neurotrophin Receptor (p75) in Retrograde Axonal Transport of the Neurotrophins. *Neuron*, 14: 1201-1211.

Dalbem A., Volkweis C., Franzen M., Vaz R., Von Werne C., Bartmann A., Costa da Costa J. (2005). Altered Distribution of Striatal Activity-Dependent Synaptic Plasticity in the 3-nitropropionic Acid Model of Huntington's disease. *Brain Research*, 1047: 148-158.

Deshpande S., Hida H., Takei-Io N., Masuda T., Baba H., Nishino H. (2006). Involvement of Nitric Oxide in 3-Nitropropionic Acid-Induced Striatal Toxicity in Rats. *Brain Research*, 1108: 205-215.

Duran-Vilaregut J., del Valle J., Manich G., Junyent F., Camins A., Pallàs M., Pelegrí C., Vilaplana J. (2010). Systemic Administration of 3-Nitropropionic Acid Points out a Different Role for Active Caspase-3 in Neurons and Astrocytes. *Neurochemistry International*, 56: 443-450.

Estrada A., Mejía-Toiber J., Massieu L. (2008). Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of Medical Research*, 39: 265-276.

Frerking M., Malenka R., Nicoll R. (1998). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Modulates Inhibitory, but not Excitatory, Transmission in the CA1 Region of the Hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 80: 3383-3386.

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

Fusco F., Zuccato C., Tartari M., Martorana A., De March Z., Giampa C., Cattaneo E., Bernardi, G. (2003). Co-localization of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Wild-type huntingtin in Normal and Quinolinic Acid-lesioned Rat Brain. *European Journal of Neuroscience*, 18: 1093-1102.

García J., Hernández J., Cantarero S. (2002) *Enfermedades Neurodegenerativas*. Capítulo 7 Progresos en la Enfermedad de Huntington. Madrid: Serie Científica.

Garcia M., Vanhoutte P., Pages C., Besson M., Brouillet E., Caboche J. (2002). The Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid Induces Striatal Neurodegeneration Via a c-Jun N-Terminal Kinase/c-Jun Module. *The Journal of Neuroscience*, 22: 2174-2184

García-Ramos R., Val-Fernández J., Catalán-Alonso M., Barcia-Albacar J., Matías-Guiu J. (2007). Modelos Experimentales de la Enfermedad de Huntington. *Reviews in Neurobiology*, 45: 437-441.

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

Gerfen Ch. (1992). The Neostriatal Mosaic: Multiple Levels of Compartmental Organization. *Trends in Neuroscience*, 15: 133-139.

Gil J., Rego C. (2008). Mechanisms of Neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 27: 2803-2820.

Gustafson N., Gireesh-Dharmaraj E., Czubayko U., Blackwell K., Plenz D. (2006). A Comparative Voltage and Current-Clamp Analysis of Feed-Back and Feedforward Synaptic Transmission in the Striatal Microcircuit in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 95: 737-752.

Hernández-Echeagaray, E. (2004). Avances sobre la Neurobiología de la Enfermedad de Huntington. En Velásquez MJ. *Temas Selectos de Neurociencias II*, (33-41), Cd de México: UAM.

Hernández-Echeagaray E., González N., Ruelas A., Mendoza E., Rodríguez-Martínez E., Antuna-Bizarro R. (2010). Low Doses of 3-nitropropionic Acid in Vivo Induce Damage in Mouse Skeletal Muscle. *Journal of the Neurological Sciences*, DOI 10.1007/S10072-010-0394-2.

Hewitt S. y Bains J. (2006) Brain-Derived Neurotrophic Factor Silences GABA Synapses onto Hypothalamic Neuroendocrine Cells through a Postsynaptic Dynamin-Mediated Mechanism. *Journal of Neurophysiology*, 95: 2193-2198.

Herkenham M., Pert C. (1982). Light Microscopic Localization of Brain Opiate Receptors: a General Autoradiographic Method which Preserves Tissue Quality. *The Journal of Neuroscience*, 2: 1129-1149.

Huang E., Reichardt L. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience*, 24: 677-736.

Huang E., Reichardt L. (2003). Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 609-642.

Huang L., Sun G., Cobessi D., Wang A., Shen J., Tung E., Anderson V., Berry E. (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. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 5965-5972.

Jain M., Armstrong R., Barker R., Rosser A. (2001). Cellular and Molecular Aspects of Striatal Development. *Brain Research Bulletin*, 55: 533-540.

Johnston J., Gerfen C., Haber S., van del Kooy D. (1990). Mechanism of Striatal Pattern Formation: Conservation of Mammalian Compartmentalization. *Developmental Brain Research*, 57: 93-102.

Jovanovic J., Thomas P., Kittler J., Smart T., Moss S. (2004). Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Fast Synaptic Inhibition by Regulating GABA_A Receptor Phosphorylation, Activity, and Cell-Surface Stability. *The Journal of Neuroscience*, 24: 522-530.

Kanematsu T., Yasunaga A., Mozoguchi Y., Kuratani A., Kittler J., Jovanovic J., Takenaka K., Nakayama K., Fukami K., Takenawa T., Moss S., Nabekura J., Hirata M. (2006). Modulation of GABA_A Receptor Phosphorylation and Membrane Trafficking by Phospholipase C-related Inactive Protein/Protein Phosphatase 1 and 2A Signaling Complex Underlying Brain-Derived Neurotrophic Factor-dependent Regulation of GABAergic Inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 22180-22189.

Katz B., Miledi R. (1968). The Role of Calcium in Neuromuscular Facilitation. *Journal of Neurophysiology*, 195: 481-492.

Kawaguchi Y., Wilson Ch., Augood S., Emson P. (1995). Striatal Interneurons: Chemical, Physiological and Morphological Characterization. *Trends Neuroscience*, 18: 527-535.

Kawaguchi, Y. (1997). Neostriatal Cell Subtypes and Their Functional Roles. *Neuroscience Research*, 27: 1-8.

Kim G., Chan P. (2001). Oxidative Stress and Neuronal DNA Fragmentation Mediate Age-Dependent Vulnerability to the Mitochondrial Toxin, 3-Nitropropionic Acid, in the Mouse Striatum. *Neurobiology of Disease*, 8: 114-126.

Kita H. (1993). GABAergic Circuits of the striatum. *Progress in Brain Research*, 99: 51-72.

Kittler J. y Moss S. (2003). Modulation of GABA_A Receptor Activity by Phosphorylation and Receptor Trafficking: Implications for the Efficacy of Synaptic Inhibition. *Current Opinion in Neurobiology*, 13: 341-347.

Koos T., Tepper J. (1999). Inhibitory Control of Neostriatal Projection Neurons by GABAergic Interneurons. *Nature Neuroscience*, 2: 467-472.

Koyama R., Yamada M., Fujisawa S., Katoh-Semba R., Matsuki N., Ikegaya Y. (2004). Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Hyperexcitable Reentrant Circuits in the Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 24: 7215-7224.

Kreitzer A., Malenka R. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, 60: 543-554.

Lee R., Kermani P., Teng K., Hempstead B. (2001). Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science*, 294: 1945-1948.

Leegwater-Kim J., Cha J. (2004). The Paradigm of Huntington's disease: Therapeutic Opportunities in Neurodegeneration. *The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics*, 1: 128-138.

Lessman V. (1998). Neurotrophin-Dependent Modulation of Glutamatergic Synaptic Transmission in the Mammalian CNS. *General Pharmacology*, 31: 667-674.

Lessmann V., Heumann R. (1998). Modulation of Unitary Glutamatergic Synapses by Neurotrophin-4/5 or Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hippocampal Microcultures: Presynaptic Enhancement Depends on Pre-Established Paired-Pulse Facilitation. *Neuroscience*, 86: 399-413.

Lessmann V., Gottmann K., Malcangio M. (2003). Neurotrophin Secretion: Current Facts and Future Prospects. *Progress in Neurobiology*, 69: 341-374.

Lessmann V., Brigadiski T. (2009). Mechanism, Locations, and Kinetics of Synaptic BDNF Secretion: An Update. *Neuroscience Research*, 65: 11-22.

Levine E., Crosier R., Black J., Plummer M. (1998). Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Hippocampal Synaptic Transmission by Increasing N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 10235-10239.

Lu B. (2006). BDNF and Activity-Dependent Synaptic Modulation. *Learning and Memory*, 10: 86-98.

Ludolph A., Spencer P., Hammerstrad J., Sabri M. (1991). 3-Nitropropionic acid-exogenous Animal Neurotoxin and Possible Human Striatal Toxin. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 18: 492-498.

Miranda Barrientos J. (2009). 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 (QFB)*. UNAM-FES Cuautitlán.

Napolitano M., Centonze D., Gubellini P., Rossi S., Spiezia S., Bernardi G., Gulino A., Calabresi P. (2004). Inhibition of Mitochondrial Complex II Alters Striatal Expression of Genes Involved in Glutamatergic and Dopaminergic Signaling: Possible Implications for Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 15: 407-414.

Nasr P., Gursahani H., Pang Z., Bondada V., Lee J., Hadley R., Geddes J. (2003). Influence of Cytosolic and Mitochondrial Ca²⁺, ATP, Mitochondrial Membrane Potential, and Calpain Activity of the Mechanism of Neuron Death Induced by 3-Nitropropionic Acid. *Neurochemistry International*, 43: 89-99.

Nguyen N., Bae Lee S., Song Lee Y., Lee K., Ahn J. (2009). Neuroprotection by NGF and BDNF Against Neurotoxin-Exerted Apoptotic Death in Neural Stem Cells Are Mediated Through Trk Receptors, Activating PI3-Kinase and MAPK Pathways. *Neurochemistry Research*, 34: 942-951.

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

Poo M. (2001). Neurotrophins as Synaptic Modulators. *Nature Reviews Neuroscience*, 2: 24-32.

Purves D. (1998). *Body and Brain. A Trophic Theory of Neuronal Connections*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Robinson M., Buj-Bello A., Davies A. (1996). Paracrine Interactions of BDNF Involving NGF-Dependent Embryonic Sensory Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 7: 143-151.

Rodríguez E., Rivera I., Astroga S., Medoza E., García F., Hernández-Echeagaray E. (2010). Uncoupling Oxidative/Energy Metabolism with Low sub Chronic Doses of 3-Nitropropionic acid or Iodoacetate in vivo Produces Striatal Cell Damage. *International Journal of Biological Sciences*, 6: 199-212.

Rosenstock T., Carvalho A., Jurkiewicz A., Frussa-Filho R., Smaili S. (2004). Mitochondrial Calcium, Oxidative Stress and Apoptosis in a Neurodegenerative Disease Induced by 3-Nitropropionic acid. *Journal of Neurochemistry*, 88: 1220-1228.

Ruelas Callejas A. (2008). Modulación del BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) en la Excitabilidad Neuronal Estriatal en un Modelo Murino de la Enfermedad de Huntington. *Tesis de Licenciatura (Biología)*. UNAM, FES-Iztacala.

Saulle E., Gubellini P., Picconi B., Centonze D., Tropepi D., Pisani A., Morari M., Marti M., Rossi L., Papa M., Bernardi G., Calabresi P. (2004). Neuronal Vulnerability Following Inhibition of Mitochondrial Complex II: a Possible Ionic Mechanism for Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25: 9-20.

Skaper S. (2008). The Biology of Neurotrophins, Signaling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors. *CNS and Neurological Disorders-Drug Targets*, 7: 46-62.

Stephens R., Loeb D., Copeland T., Pawson T., Greene L., Kaplan D. (1994). Trk Receptors use Redundant Signal Transduction Pathways Involving SHC and PLC-gamma 1 to Mediate NGF Responses. *Neuron*, 12: 691-705.

Tanaka T., Saito H., Matsuki N. (1997). Inhibition of GABA_A Synaptic Responses by Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 17: 2959-2966.

Tao X., Finkbeiner S., Arnold D., Shaywitz A., Greenberg M. (1998). Ca²⁺ Influx Regulates BDNF Transcription by a CREB Family Transcription Factor-Dependent Mechanism. *Neuron*, 20: 709-26.

Tecuapetla F., Carrillo-Reid L., Guzmán J., Galárraga E., Bargas J. (2005). Different Inhibitory Inputs onto Neostriatal Projection Neurons as Revealed by Field Stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 93: 1119-1126.

Tepper J., Koos T., Wilson C. (2004). GABAergic Microcircuits in the Neostriatum. *Trends in Neuroscience*, 27: 662-669.

Túnez I., Santamaría A. (2009). Modelo de Enfermedad de Huntington Inducido con Ácido 3-Nitropropiónico. *Reviews in Neurobiology*, 48: 430-434.

Wardle R., Mu-ming Poo. (2003). Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulation of GABAergic Synapses by Postsynaptic Regulation of Chloride Transport. *The Journal of Neuroscience*, 23: 8722-8732.

Wei D., Chang S., Lin S., Doong M., Jong S. (1994). Production of 3-Nitropropionic Acid by *Arthrinium* Species. *Current Microbiology*, 28: 1-5.

Wu C., Chen S., Hwang Ch., Yang D. (2009). Sonic Hedgehog Mediates BDNF-Induced Neuroprotection against Mitochondrial Inhibitor 3-Nitropropionic Acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385: 112-117.

Wu C., Hwang Ch., Chen S., Yin J., Yang D. (2010). Neuroprotective Mechanisms of Brain-derived Neurotrophic Factor Against 3-Nitropropionic Acid Toxicity: Therapeutic Implications for Huntington's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201: 8-12.

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

Zermeño V. (2009). Expresión espacio-temporal de las neurotrofinas en el desarrollo postnatal del núcleo estriado de ratón. *Tesis de Licenciatura (Bióloga)*. UNAM, Facultad de Ciencias.

Zhang X., Mu-ming Poo. (2002). Localized Synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron*, 36: 675-688

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

Zuccato C., Liber D., Ramos C., Tarditi A. (2005). Progressive Loss of BDNF in a Mouse Model of Huntington's disease and Rescue by BDNF Delivery. *Pharmacological Research*, 52: 133-139.

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