



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**PARTICIPACIÓN DE LAS NEUROTROFINAS NT-4/5 y
BDNF EN LA MODULACIÓN SINÁPTICA A TRAVÉS DE
LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE PLC- γ 1 EN UN MODELO
ANIMAL DE HUNTINGTON INDUCIDO CON LA TOXINA
3-NP**

T E S I S

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Israel César Vivar Cortés

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray
Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2016





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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por permitirme formar parte de su laboratorio e integrarme a este proyecto, su amistad, su atención y los consejos para mejorar tanto profesional como académicamente.

Al Mtro. en Ciencias Ernesto Mendoza Duarte por la asesoría técnica

A Liz, Jorge, Víctor y Edmundo por su amistad y los consejos que me permitieron mejorar mi destreza con los experimentos.

Dedicatorias

A mis padres, por su apoyo y esfuerzos, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A los amigos que me acompañaron en este proceso y por temor a omitir a alguno porqué mi memoria falle no escribo nombres.

“Lectores”

*De aquel hidalgo de cetrina y seca
tez y de heroico afán se conjetura
que, en víspera perpetua de aventura,
no salió nunca de su biblioteca.*

*La crónica puntual que sus empeños
narra y sus tragicómicos desplantes
fue soñada por él, no por Cervantes,
y no es más que una crónica de sueños.*

*Tal es también mi suerte. Sé que hay algo
inmortal y esencial que he sepultado
en esa biblioteca del pasado
en que leí la historia del hidalgo.
Las lentas hojas vuelve un niño y grave
sueña con vagas cosas que no sabe.*

Jorge Luis Borges

Índice General	
Resumen	1
Introducción	2
Ganglios Basales.....	2
Estriado.....	4
Transmisión sináptica y modulación	6
Enfermedad de Huntington	9
Modelos de la EH	9
Factores neurotróficos y neurotrofinas	12
Fosfolipasa C gamma 1	19
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	22
Material y Métodos	23
Obtención y preservación in vitro de rebanadas cerebrales.....	23
Parámetros de estimulación y registro electrofisiológico	23
Western Blot.....	26
Análisis y Estadísticos	27
Resultados	27
El DMSO no afecta la transmisión sináptica en rebanadas de ratón control ni en 3-NP	29
El bloqueador U73122 en una solución de bajo calcio no incrementa la amplitud de la espiga poblacional en rebanadas cerebrales de ratones tratados con 3NP.....	32
El bloqueador U73122 no modifica la respuesta de BDNF mientras que la NT-4/5 disminuye la respuesta poblacional en presencia de este.....	33
El efecto de las neurotrofinas depende del orden de aplicación	36
La respuesta a la coadministración de neurotrofinas en presencia del bloqueador es similar a la observada en el modelo de 3-NP	38
Expresión diferencial de los residuos de tirosina en PLC- γ 1 y 2 en presencia de la NT-4/5 y BDNF en control.....	41
Discusión	42
El 3-NP modifica la respuesta poblacional sináptica S1	43
El DMSO no afecta a la comunicación sináptica en rebanadas cerebrales control y en tratadas con 3NP	44
El bloqueador de PLC es calcio dependiente e interviene en la modulación de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 en rebanadas cerebrales de ratones 3NP	44
BDNF y NT-4/5 presentan efectos diferenciales que dependen del orden de aplicación en el modelo de 3-NP	46

Conclusiones	51
Bibliografía	52

Abreviaturas

3-NP: Ácido 3 nitropropiónico

ACh: Acetilcolina

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ATP: Adenosín trifosfato

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro, siglas en inglés de Brain Derived Neurotrophic Factor

CaMKII: Ca²⁺/Calmodulina proteína cinasa II

DA: Dopamina

DAG: Diacilglicerol

DSMO: Dimetilsulfóxido

EH: Enfermedad de Huntington

EP: Enfermedad de Parkinson

FPP: Facilitación por pulso pareado

GB: Ganglios basales

GPe: Globo palido externo

GPi: Globo palido interno

htt: huntingtina

IP3: Inositol 1, 4, 5-trisfosfato

IT15: Interesting transcript 15

KA: Kainato

LTD: Long Term Depression

LTP: Long Term Potentiation

MAPK: Mutagen Activated Protein Kinase

MSNs: Medium Spiny Neurons

NE: Núcleo estriado

NGF: Nerve Growth Factor

NMDA: N-metil-D-aspartato

NT-3: Neurotrofina -3

NT-4/5: Neurotrofina 4/5

NTS: Núcleo subtálmico

p75NTR: Neurotrofin Receptor p 75

PI3K: Protein Inositol 3 Kinase

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKC: Proteína cinasa C

PLC- γ 1: Fosfolipasa C

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDH: Deshidrogenasa Succínica

SN: Sistema nervioso

SNpc: Sustancia nigra pars compacta

SNpr: Sustancia nigra pars reticulata

SP: Sustancia P

TNF: Factor de necrosis tumoral

Trk: Tropomiosina relacionada a cinasa

U73122: (1-[6-(((17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl) amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione

Resumen

Como miembros de la familia de los factores tróficos: las neurotrofinas son necesarias para la supervivencia neuronal, el desarrollo, la diferenciación, la regulación de procesos en el SNC y la modulación de la transmisión sináptica, sin embargo, se sabe que los niveles de neurotrofinas se ven afectados en ratones tratados con la neurotoxina 3-NP; inhibidor irreversible del complejo II mitocondrial y modelo excitotóxico de la EH utilizado en el laboratorio. En este trabajo se evaluó el efecto de la coadministración de las neurotrofinas en la modulación sináptica glutamatérgica de las aferentes cortico-estriatales a través de la vía de PLC- γ 1 en registros electrofisiológicos con rebanadas cerebrales de ratones tratados con la toxina 3-NP, para ello se evaluó el efecto de las neurotrofinas BDNF y NT -4/5 por separado en presencia del bloqueador (U73122) y finalmente se evaluó el sitio de fosforilación que activan las neurotrofinas en esta vía, con la técnica de Western Blot.

Introducción

Las funciones normales del organismo dependen de la recepción de estímulos desde el ambiente externo, interno, y de la generación de reacciones integradas dirigidas en respuesta a esa estimulación. Esta actividad requiere un eslabón coordinador entre el estímulo y la respuesta, entre el órgano receptor y el órgano efector. Uno de estos sistemas coordinadores o integradores es el sistema nervioso (SN) el cual representa la base estructural para las reacciones precisas y rápidas (Revisado en Mattson, 2014).

Asimismo, para comprender el funcionamiento del SN, se divide en: sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El primero comprende el encéfalo, encerrado en el cráneo, y su continuación hacia abajo, la médula espinal, mientras que el segundo comprende los nervios que salen de la médula espinal hacia los blancos que inervan; glándulas, músculo liso y estriado, que incluye al sistema nervioso autónomo en su parte simpática y parasimpática (Revisado en Purves, 2004).

El cerebro o encéfalo a su vez está conformado por distintas estructuras que se relacionan con distintas funciones en el SNC, las cuales durante el desarrollo embriológico se forman a partir de tres regiones cerebrales primitivas denominadas: posterior o rombencéfalo, media o mesencéfalo y anterior o prosencéfalo (Revisado en Ruiz, 2012). En este último se encuentran los núcleos de la base o como se les conoce comúnmente ganglios basales (GB), estructuras de suma importancia debido a la función que desempeñan en la coordinación e integración de la actividad motora, es decir, suprimen los movimientos no deseados y preparan los circuitos de las neuronas motoras superiores para dar inicio al movimiento fino (Ávila & Bueno, 2014). Además, regulan procesos involucrados con la homeostasis. Sin embargo, cuando la integridad de los ganglios basales se compromete, se manifiestan movimientos no deseados, tanto hipocinéticos como los observados en la enfermedad de Parkinson (EP) o hiperkinéticos característicos de las etapas tempranas de la enfermedad de Huntington (EH; Revisado en Kandel, 1997).

Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB; Fig. 1) son estructuras cerebrales conservadas de grupos animales que aparecieron de manera temprana en la escala filogenética (Hallböök,

1999); están conformados por el núcleo caudado y el núcleo lenticular (formado por el putamen, el globo pálido medial o interno (GPi) y el globo pálido lateral o externo (GPe) que a su vez conforman el neostriado (NE), el núcleo subtálamico (NST) así como la sustancia nigra en sus porciones pars compacta (SNpc) y pars reticulata (SNpr; Vergara & Fonk, 1995; Wilson, 1998). El GPi recibe aferencias del neostriado, del GPe y del NST; por lo que es un núcleo de salida de los GB y estas eferencias son dirigidas al tálamo. El GPe por otro lado, es una estructura con eferencias intrínsecas dirigidas sólo a los GB. El NST recibe aferencias de la corteza cerebral, del GPe, del tálamo, así como de la SNpc (Bargas, 1990; Revisado en Bargas *et al.*, 1998; Schlösser *et al.*, 1999) y la GABAérgica palidal (Galarraga *et al.*, 1997).

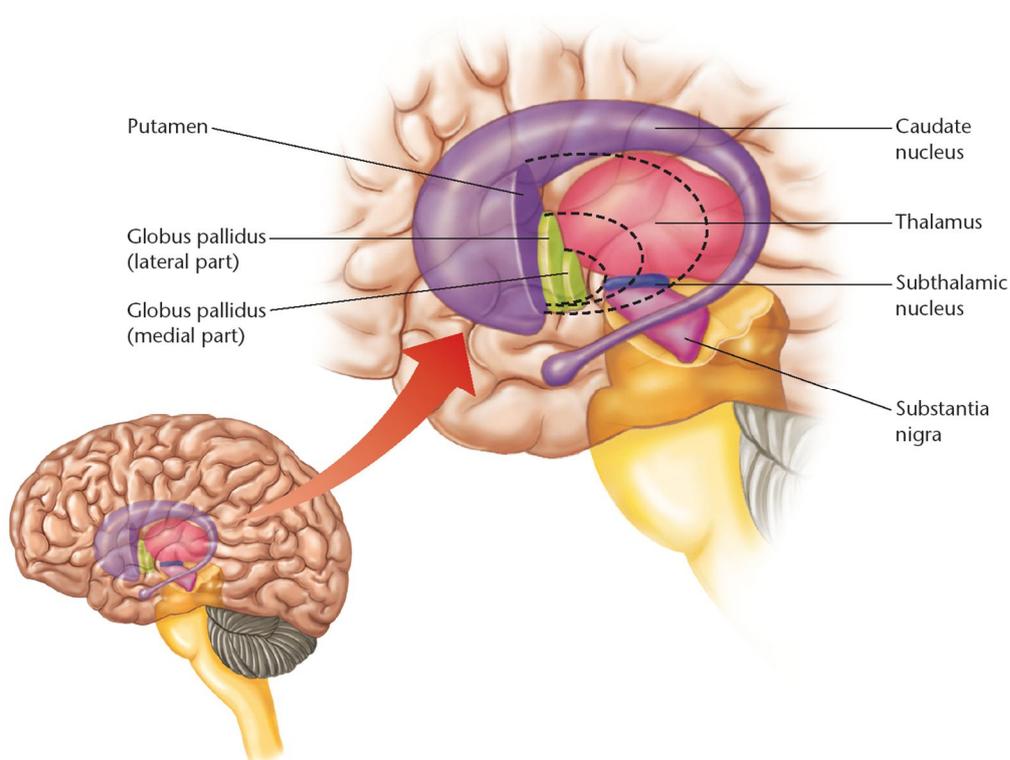


Figura 1. Esquema de los ganglios basales de humano. En ella se muestra como están interconectados entre sí, se muestran el núcleo caudado, el putamen, globo pálido interno (GPi), globo pálido externo (GPe), núcleo subtálamico (NST) y la sustancia nigra (SN). Tomado de Vergara & Fonk, 1995.

En la SNpc están localizados los somas de las neuronas dopaminérgicas que proyectan sus axones por la vía nigroestriatal al NE y la SNpr se considera como un núcleo de salida de los GB, que recibe axones por la vía estriadonigral del NE y proyecta axones de naturaleza GABAérgica al tálamo (Wilson, 1998; Bolam *et al.*, 2009; Ávila & Bueno, 2014).

Estriado

El neostriado o estriado (NE) es la estructura más grande de los GB y recibe una inervación importante de todas las áreas de la corteza cerebral (tanto sensorial como motora), del tallo cerebral y del tálamo. Está compuesto principalmente de neuronas GABAérgicas denominadas neuronas espinosas medianas por su soma de tamaño mediano y su gran cantidad de espinas dendríticas (MSNs del inglés Medium Spiny Neurons) (Wilson, 1998). Las MSNs se les clasifica en: aquellas que conforman la vía directa e indirecta, estas se encuentran en compartimentos denominados estriosomas y la matriz (Johnston et al., 1990). Estas neuronas generan pocos potenciales de acción espontáneos por lo que se les considera silentes en condiciones basales, se activan cuando reciben alguna estimulación de la corteza o del tálamo. Conforman el 90% de las células en el neostriado, el otro 10% está conformado por las interneuronas sin espinas. La interneuronas se clasifican en: las interneuronas colinérgicas gigantes, y las GABAérgicas de tamaño medio que contienen proteínas fijadoras de calcio (parvoalbúmina o calretinina). Todas estas interneuronas establecen contactos dentro del estriado, formando los circuitos locales (Fig. 2) y encargándose de modular la actividad de las MSNs o de otras interneuronas (Revisado en Fernández-Chacón, 2007).

En el estriado existen varios tipos de receptores neuroquímicos asociados a los circuitos que derivan en la comunicación sináptica que dará paso a diversas funciones en el cerebro. Por ejemplo, la información que procesan los ganglios basales fluye a través de dos vías que se dirigen hacia el tálamo: una vía directa, formada por los axones de las MSNs que expresan receptores dopaminérgicos tipo D1 y a sustancia P (SP). Esta vía manda sus axones principalmente al GPi y a la SNpr. La SNpr y el GPi a su vez envían sus conexiones al tronco cerebral y componentes motores del tálamo, que excitan las áreas corticales relacionadas con el control motor (Crittenden & Graybiel, 2011; DeLong & Wichman, 2007). El otro sistema, conocido como la vía indirecta, formado por los axones de las MSNs que expresan receptores dopaminérgicos tipo D2 y a encefalinas, proyectan al GPe que inhibe la actividad del NST, en el cuál sus conexiones glutamatérgicas activan al GPi y a la SNpr para de esta forma inhibir los circuitos tálamo-corticales impidiendo así el inicio de los comandos motores.

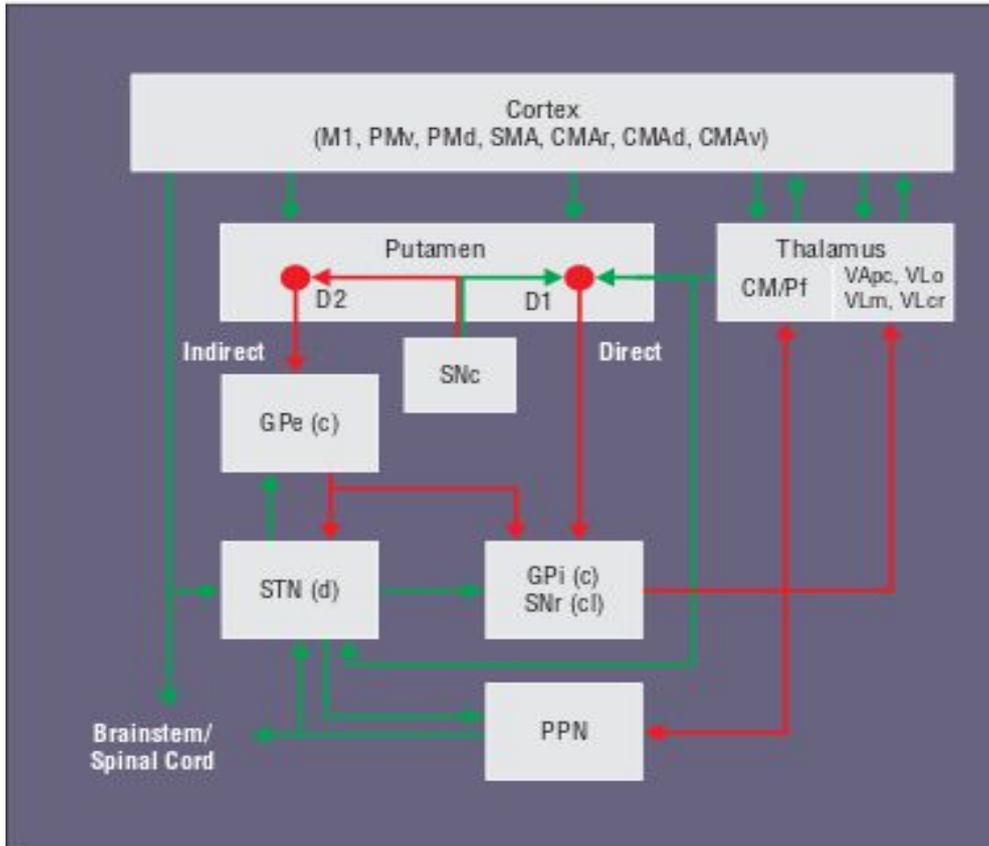


Figura 2. Descripción de la funcionalidad de los GB, las flechas rojas indican las conexiones inhibitorias (GABAérgicas); las flechas verdes representan las conexiones excitatorias (glutamatérgicas); las flechas rojo con verde indican la dopamina (DA). Tomado de DeLong & Wichman, 2007.

La activación de una vía antagoniza la función de la otra, es decir, cuando la actividad de las neuronas de la vía directa incrementa, las neuronas de los núcleos de salida se inhiben tónicamente, disminuyendo así la inhibición de las neuronas de la vía indirecta. Estas acciones antagónicas permiten que el comando motor sea más fino, aunque las vías pueden también trabajar a la par. Cuando la actividad de las neuronas de la vía indirecta incrementa, la actividad del GPe se ve inhibida. Esto conlleva a la desinhibición de las neuronas del NST, lo que incrementa la actividad de los núcleos de salida, inhibiendo las neuronas del tálamo para impedir los comandos que dan acceso al movimiento. Sin embargo, cuando las conexiones se ven afectadas ya sea por una afección o accidente, estas estructuras se dañan, llevando al deterioro de las funciones motoras. Ejemplo de ello se ve en la degeneración de las neuronas estriatales, con mayor precisión la pérdida selectiva de MSNs (GABAérgicas; Brouillet *et al.*, 1999) y degeneración de las capas más profundas de la corteza (principalmente la corteza frontal) son alteraciones características de la enfermedad de Huntington (EH) que conduce a cambios en el tono muscular y movimientos involuntarios (corea). Pero antes de entrar a detalle en la EH haremos una explicación breve del proceso

que utilizan las neuronas para comunicarse entre sí, además de los mecanismos que subyacen a esta comunicación, esto nos permitirá comprender algunas de las explicaciones fisiológicas que se observan en condiciones patológicas.

Transmisión sináptica y modulación

Como se mencionó en el párrafo anterior el proceso mediante el cual se comunican las neuronas es denominado sinapsis, término acuñado por el inglés Charles S. Sherrington. Esta comunicación implica que hay una señal eléctrica o química que debe pasar entre una célula y otra. Cuando dos neuronas se juntan mediante una sinapsis se dice que la neurona que manda la señal es presináptica. Por otro lado, la neurona que recibe la señal enviada de la célula presináptica se denomina postsináptica.

En una sinapsis química hay un espacio denominado hendidura sináptica. La comunicación a lo largo de este espacio se lleva a cabo a través de un mensajero denominado neurotransmisor, éste cruza dicha hendidura por difusión simple, llega a los receptores de la célula postsináptica, lugar donde llevará a cabo su función, dicha función ocurre en un tiempo determinado y el tiempo que tarda el proceso desde la liberación del transmisor hasta el momento en que origina la acción (se denomina como retraso sináptico; Luján, 2004). Las sinapsis de este tipo son las más utilizadas por las neuronas del SN de los mamíferos (Revisado en Bargas & Galarraga, 2008).

Los receptores a mensajeros sinápticos pueden mediar eventos rápidos o lentos, así se habla de dos tipos de neurotransmisión: la rápida y la lenta (Luján, 2004).

La primera hace referencia a la acción inmediata, en ella el neurotransmisor liberado interacciona con estructuras en la membrana de la célula postsináptica conocidos como canales iónicos activados por ligando o receptores ionotrópicos (estructuras proteicas de la membrana plasmática neuronal que funcionan como canales iónicos específicos para determinados iones). Según sea el tipo de ion involucrado es la naturaleza del efecto que se produce cuando estos receptores canal se abren. Al tener acoplado un canal iónico, este tipo de receptores participan en las respuestas rápidas, excitatorias o inhibitorias, en las neuronas. Por ahora nos referiremos sólo a los receptores ionotrópicos excitadores los cuales, al permitir el paso de iones como el sodio o el calcio, producen una disminución del potencial de membrana (despolarización). Ello aumenta la probabilidad de generar potenciales de acción en la

neurona. Pero también se encuentran en ellos sitios de unión a otras moléculas, que sin provocar su apertura modifican el efecto del neurotransmisor, es decir, los receptores pueden modularse por otras moléculas. Como el receptor que al activarse produce directamente la acción, esta es inmediata en contraste con lo que denominamos sinapsis lenta.

En la sinapsis lenta, su efecto toma más tiempo debido a que el transmisor liberado no activa directamente a los canales activados por ligando, sino que activa a receptores metabotrópicos los que al activarse alteran rutas metabólicas específicas al interior de la célula teniendo como consecuencia la activación de un canal iónico y la modificación del potencial de membrana a largo plazo. El cambio metabólico que se produce al activarse un receptor postsináptico metabotrópico es resultado de la activación de una vía o cascada de señalización intracelular. A través de la movilización de segundos mensajeros y activación enzimática. A la activación de los receptores metabotrópicos se le da el nombre de neuromodulación, dado que la acción no crea un potencial de acción en la célula postsináptica, pero puede modificar su sensibilidad frente a otras acciones sinápticas de corta duración mediadas por la transmisión sináptica rápida (Ejemplo Fig. 3). Esta habilidad de poder modificar la sensibilidad frente a otras acciones sinápticas permite a las neuronas alterar sus propiedades eléctricas, en respuesta a los cambios bioquímicos intracelulares activados por las cascadas de señalización que mencionamos con anterioridad, esto como resultado de la estimulación sináptica (Revisado en Bargas et al., 1998).

La neuromodulación es una de las propiedades intrínsecas más importantes de las neuronas, dado que no solo permite al SN adaptar el control de sus funciones fisiológicas ante los estímulos ambientales, sino que además es considerada la base para cambios de larga duración en el comportamiento animal. Se considera que debe existir uno o varios requisitos que deben cumplir estas sustancias para que puedan modificar el código neuronal. Entre los más importantes encontramos: modular las propiedades específicas neuronales (umbrales de activación), modular la síntesis, la cantidad de liberación de neurotransmisor, modular la unión de ligando a su receptor o influir en los mecanismos de transducción del receptor involucrado a través de autoreceptores.

Un ejemplo de estructuras que cumplen dichas funciones son los receptores a glutamato los cuales se dividen en tres grandes familias como se muestra en la Fig. 3, los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), Kainato (KA) y NMDA (N-metil-D-aspartato). Los receptores AMPA y Kainato son activados al

unirseles el glutamato, son canales activados por ligando como los descritos previamente, su canal iónico es permeable a los iones sodio y potasio lo que favorece a potenciales de acción excitatorios. Por otro lado, los receptores NMDA, aunque son permeables a sodio, permiten el paso de calcio al interior de la célula y generan potenciales sinápticos excitatorios, éstos son también dependientes de voltaje, porque dentro de su poro tienen un sitio en donde se acoplan los iones Mg^{2+} de modo que la membrana tiene que alcanzar cierto potencial para que el poro del canal libere el magnesio. Debido a esta característica, la desregulación de los receptores NMDA se asocian a procesos patológicos en donde se observa la entrada excesiva de calcio (Cherubini, 2010).

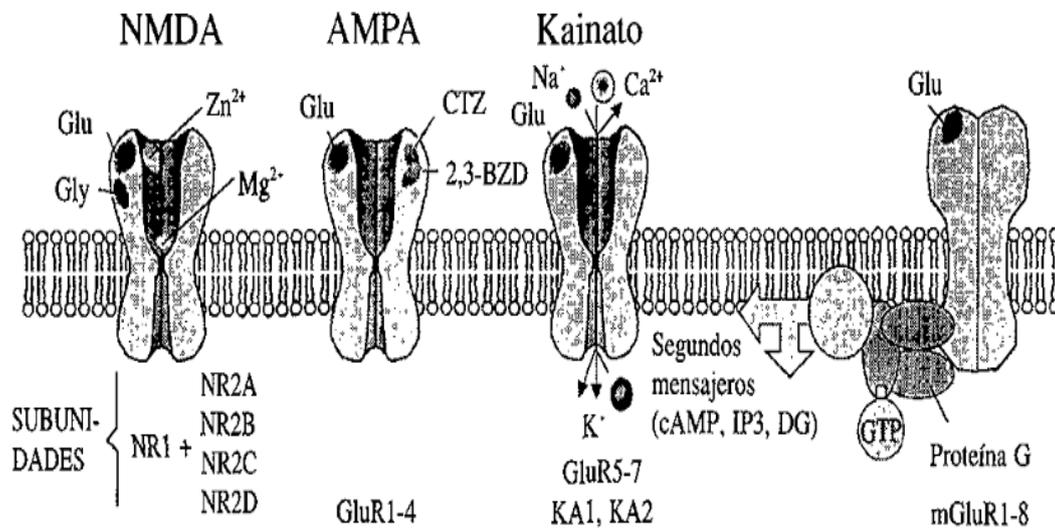


Figura 3. Esquema de canal iónico y metabotrópico para el glutamato. En el lado derecho se muestra un receptor-canal de glutamato. Cuando este neurotransmisor se une a su sitio de unión en el receptor, se abre el canal iónico debido a una serie de modificaciones estructurales en las subunidades que lo conforman. Además, se puede unir a los receptores metabotrópicos en el que se produce una serie de cambios conformacionales. Como resultado de esos cambios, el receptor puede influenciar a la proteína G, ubicada en su vecindad, lo cual provoca la activación de esa proteína. Tomado de Bargas et al., 1998.

Los receptores AMPA, KA y NMDA se pueden encontrar en la misma sinapsis lo que indica que los potenciales sinápticos generados por glutamato, presenten componentes de cada uno de estos receptores. Este trabajo se enfoca en la transmisión química de tipo glutamatérgica, que ocurre entre la corteza cerebral y el núcleo estriado. El glutamato en el SN es el transmisor excitador de mayor relevancia, se encuentra involucrado en procesos de comunicación, proliferación, supervivencia celular, el aprendizaje, la memoria, así como en la muerte (apoptosis o necrosis; Cherubini, 2010). Alteraciones en la transmisión glutamatérgica y la relación con este proceso complejo de la modificación neuronal sensible a cambios metabólicos o

disfunciones que se presenten en la maquinaria celular es asociado a patologías como la epilepsia, lesiones cerebrales o en enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedad de Huntington

Esta enfermedad se define como un trastorno neurodegenerativo progresivo de transmisión autosómica dominante (Walker, 2007). Se denomina autosómica porque produce una mutación en el exón 1 del gen IT15 (Interesting transcript 15; Azzarelli, 2000) en un cromosoma somático, es decir, no en el X o el Y, sino en el brazo corto del cromosoma 4. Este gen traduce una proteína de 348 kDa llamada huntingtina (htt). En presencia de la mutación que da origen a la EH, la htt presenta la expansión excesiva del triplete CAG (citosina-adenina-guanina) que codifica para el aminoácido glutamina (Velázquez & Rodríguez, 2012) mostrándose como una proteína con un segmento poli Q a partir del residuo 17, cerca del extremo N-terminal.

La htt presenta una expresión ubicua ya sea en el núcleo o citoplasma de las células de diversos tejidos, entre ellas las neuronas del cerebro. La función normal de la htt no ha sido bien dilucidada, algunos estudios reportan que se encuentra involucrada en regular los niveles de ATP en la célula, en la comunicación interneuronal en la degradación celular y en la regulación transcripcional (Tasset *et al.*, 2009; Bard *et al.*, 2014). De la proteína modificada con estos repetidos de poli Q, se sabe que se acumula en el citoplasma y el núcleo, por lo que altera el funcionamiento celular, el proceso que más ha sido descrito es que altera la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés brain derived neurotrophic factor; BDNF), aunque los mecanismos del proceso de neurodegeneración no están establecidos con claridad (Landless & Bates, 2004; Tasset, 2009; Velázquez & Rodríguez, 2012) se han detectado niveles reducidos de BDNF en suero de pacientes con EH (Brouillet *et al.*, 1999). Estudios bioquímico-moleculares muestran alteraciones en la función mitocondrial de pacientes con EH. Una de estas alteraciones afecta a la cadena de transporte de electrones concretamente a los complejos II y III, razón por la cual origina un descenso significativo en la oxidación del succinato en su transformación a fumarato por acción de la deshidrogenasa succínica (SDH), así como una reducción en la producción de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) a nivel celular (Coles *et al.*, 1979; Gu *et al.*, 1995; Browne *et al.*, 1999).

Modelos de la EH

Para la comprensión de los procesos de neurodegeneración que acontecen en el ser humano, como en la EH, son de gran utilidad y apoyo los modelos experimentales, tanto los que se usan animales transgénicos como: los BAC (en los que el transgen se inserta con el uso de un cromosoma artificial bacteriano), los YAC (cromosoma artificial de levaduras), los R6/2 (uno de los modelos más utilizados al manifestar una forma muy agresiva y similar a la variante joven, inserta solo el exón 1 del gene HD) o aquellos que son inducidos por neurotoxicidad, sin olvidarnos de los cultivos celulares.

Aquellos que forman parte de los modelos de neurotoxicidad regularmente son provocados farmacológicamente. Entre ellos encontramos a los modelos excitotóxicos directos (Lucas & Ortega, 2009), en los cuales se emplean agonistas de glutamato como el ácido quinolínico o el kainato (ácido kaínico) y los modelos excitotóxicos indirectos, que, a diferencia de los anteriores, no son agonistas del glutamato, sino que actúan sobre otros blancos para inducir la degeneración como es el caso de las toxinas mitocondriales. En este grupo de fármacos destaca el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) por emular los procesos patológicos que presenta la enfermedad de Huntington (Beal *et al.*, 1993; Deshpande *et al.*, 2006).

El 3-NP actúa como inhibidor irreversible de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) del complejo respiratorio II del sistema de transporte de electrones, localizado en la membrana interna de la mitocondria y responsable de la oxidación de succinato a fumarato (Alston *et al.*, 1977). Otros inhibidores que actúan sobre la SDH son el metilmalonato o el malonato (Roehrs *et al.*, 2004), sin embargo, estos actúan como bloqueadores reversibles de la enzima, por lo que al quitarlos la SDH recupera su actividad, contrario a lo que sucede con el 3-NP.

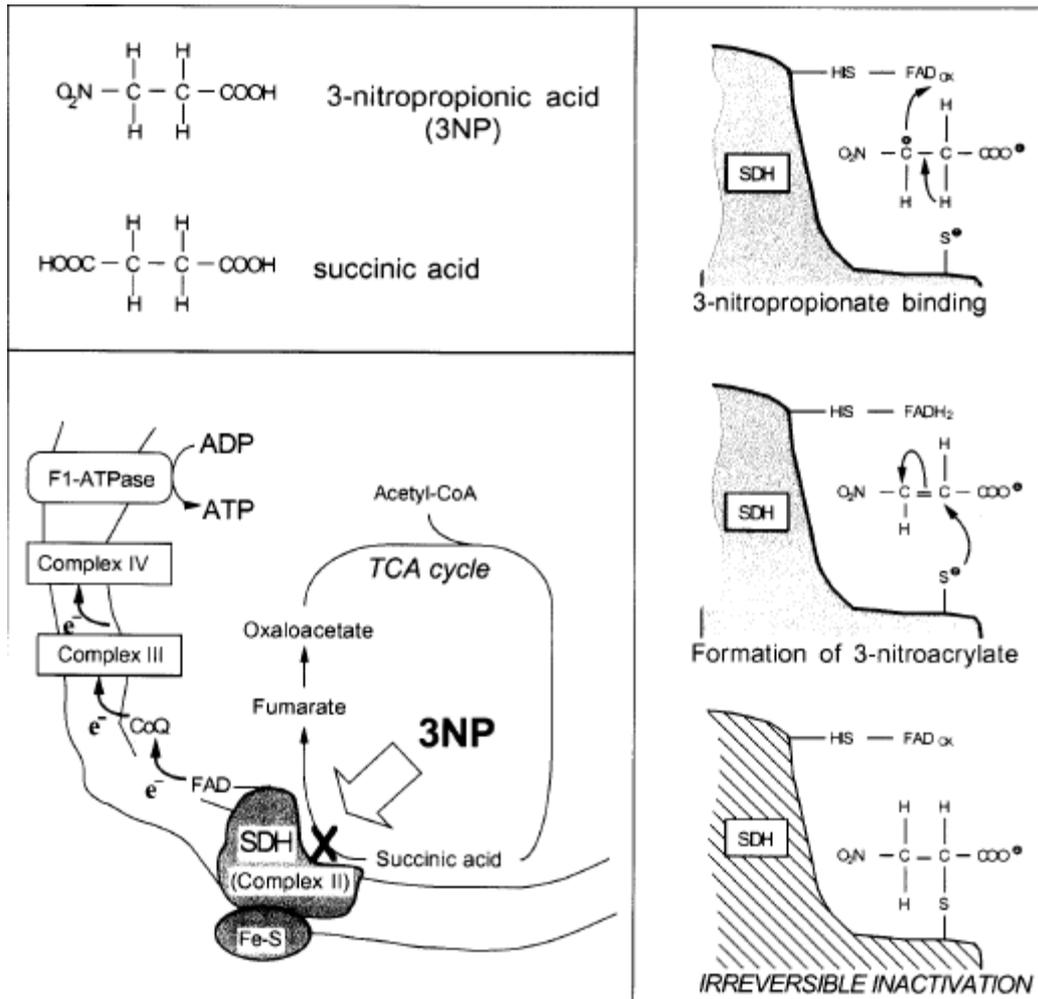


Figura 4. 3-NP Inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa (SDH). La figura superior izquierda muestra la similitud en la estructura del 3-NP y el sustrato de la SDH, el ácido succínico, lo cual explica porque el 3-NP puede ocupar el sitio catalítico de la enzima. La figura de la derecha se muestra el esquema de cómo el 3-NP al metabolizarse se convierte en 3 nitropropionato, para después oxidarse e interactuar como 3-nitroacrilato unido a la SDH, el cual reacciona con un grupo tiol de la misma permaneciendo unido covalentemente de manera irreversible. En la figura inferior izquierda se muestra que la inhibición de la SDH inducida con el 3-NP afecta la cadena transportadora de electrones y a la conversión de succinato a fumarato (ciclo de Krebs); por lo tanto, se presenta una disminución en la producción de energía. Tomado de Brouillet et al., 2009.

El 3-NP es estructuralmente similar a la molécula del ácido succínico por lo que se une al sitio del succinato en la succinato deshidrogenasa (SDH). Como se explica en la Fig. 4 (Coles et al., 1979; Brouillet et al., 2009).

La interrupción de la actividad mitocondrial está asociada a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como: radicales superóxido, radicales hidroxilo y peróxidos de hidrógeno que dañan la membrana celular y el ADN (Browne et al., 1999).

La falla mitocondrial activa mecanismos de estrés oxidante en las espinas dendríticas

de las MSNs, por lo que el metabolismo de la célula se afecta. Tal es el caso del ciclo de Krebs cuya consecuencia es el descenso del aporte energético y que a su vez genera, modificaciones en las propiedades de la membrana celular, haciendo que ésta

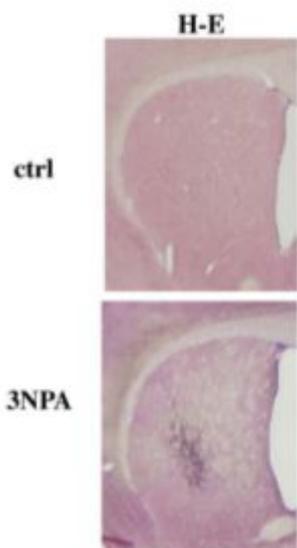


Figura 5. Daño estriatal selectivo inducido con 3-NP.

La figura muestra una tinción Hematoxilina-Eosina en un corte sagital del estriado de rata. La figura superior muestra las condiciones control y se aprecia el estriado en buen estado. En la figura inferior se muestra el daño producido en un tratamiento crónico de 3-NP, el cual, si lo comparamos con un corte de paciente de EH, es muy similar la pérdida neuronal. Modificado de Deshpande et al., 2006.

sea más excitable y por lo tanto exista mayor probabilidad en la activación de enzimas involucradas con los procesos de muerte celular (caspasas, proteasas, cinasas, fosfolipasas y endonucleasas). De manera que el 3-NP reproduce diversas características anatómicas y conductuales de la EH (Beal et al., 1993). Estudios histopatológicos con el modelo de la EH mostraron lesiones estriatales selectivas (Fig. 5), además incrementa los niveles de nitritos en estriado, tálamo y cerebelo de los cuales los niveles basales de nitrato son mucho más altos en el estriado y los individuos experimentales que fueron tratados con 3-NP exhiben actividad muscular anormal (Deshpande et al., 2006; Hernández-Echeagaray, 2010).

En experimentos electrofisiológicos existen cambios en las propiedades de reposo de la membrana plasmática de MSNs (Beal et al., 1993). En experimentos realizados en el laboratorio con el modelo de 3-NP indicaron la pérdida de las conexiones de la corteza con el estriado debido a la reducción de la arborización dendrítica estriatal (Mendoza et al., 2014). Cabe destacar que en nuestro modelo farmacológico las modificaciones observables son las de las etapas tempranas de la enfermedad. Estas evidencias concuerdan con lo descrito previamente en el modelo transgénico de los R6/2 (Cepeda et al., 2003).

Otro de los efectos de la EH es la disminución de sustancias que permiten a las células sobrevivir ante los desajustes metabólicos que se sufren durante la misma (revisado por Cepeda et al., 2003). Estas sustancias que proporcionan el medio para la supervivencia se denominan factores tróficos y los que se encargan de la supervivencia en el SN los conocemos como factores neurotróficos (Barde, 1994).

Factores neurotróficos y neurotrofinas

Estas proteínas ejercen su función a través de receptores situados en órganos específicos. Las características de las neurotrofinas están relacionadas estructural y funcionalmente ya que emplean su acción biológica como dímeros no covalentes y comparten una secuencia homóloga cercana al 50% y una homología estructural aproximada al 60% (Lessman & Heumann, 1998; Travaglia et al., 2012).

Durante el desarrollo embrionario hasta la edad adulta, la secreción de estas proteínas es esencial para la diferenciación y estabilización de procesos del sistema nervioso central y periférico (Montalcini, 1987; Barde, 1989) que aseguran el mantenimiento neuronal en el organismo adulto y modulan la transmisión sináptica. Además de activar diferentes tipos de proteínas cinasas y segundos mensajeros intracelulares que modulan funciones celulares que intervienen en la síntesis de neurotransmisores, como la acetilcolina (ACh) y la dopamina (DA) (Camacho, 1997).

Las neurotrofinas actúan sobre el sistema nervioso central y periférico (Montalcini, 1987; Barde, 1989). Hasta el momento existen siete tipos de neurotrofinas descritas de las cuales al menos cuatro se presentan en mamíferos denominadas NGF (*Nerve Growth Factor*, siglas en inglés), BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, siglas en inglés), NT-3 (Neurotrophin-3, siglas en inglés) y NT-4/5 (Neurotrophin -4/5, siglas en inglés). A lo largo del desarrollo embrionario estas neurotrofinas son esenciales para la supervivencia de determinadas poblaciones neuronales, las cuales cuentan con receptores célula-específico y estas moléculas reconocen a aquellas que los presentan (Davies, 1994). En el adulto influyen también en la función y plasticidad sinápticas.

Las neurotrofinas son codificadas como precursores glicosilados de peso molecular entre 31 a 35 kDa, son sintetizados en el retículo endoplásmico como pre neurotrofinas y al plegarse el péptido de señalización son convertidas en pro-neurotrofinas. Posteriormente en el aparato de Golgi estas pro-neurotrofinas son dimerizadas y sufren un proceso proteolítico mediante convertasas como la furina y convertasas 1 y 2 (PC1 y PC2) formado así la neurotrofina madura con un peso molecular menor, de 13 a 15 kDa (Travaglia et al., 2012). La respuesta de las neuronas a las neurotrofinas está mediada por dos tipos de receptores de membrana: p75NTR y los receptores de la familia de tropomiosina relacionada a cinasa (Trk). El receptor p75NTR es un receptor de baja afinidad, pero reconoce con la misma intensidad a las distintas neurotrofinas, en cambio para los receptores Trk existen 3 tipos, de los cuales cada uno de ellos presenta distinta especificidad: TrkA es el

receptor para NGF, TrkB lo es para BDNF y NT-4/5 y TrkC para NT-3, esta última

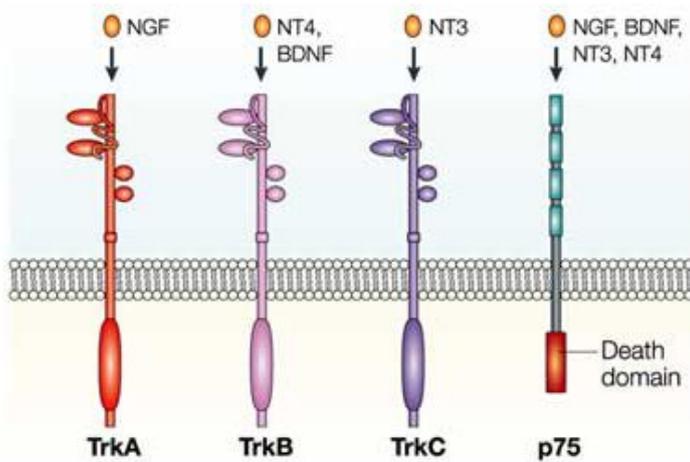


Figura 6. Especificidad selectiva de las neurotrofinas. Las neurotrofinas se unen selectivamente a receptores Trk específicos e interactúan con la misma especificidad con el receptor p75. Los receptores Trk tienen dominios inmunoglobulina G (IgG) extracelulares que median la interacción con el ligando y un dominio catalítico tirosina cinasa en la región intracelular. El dominio extracelular de p75 tiene cuatro repeticiones ricas en cisteína, y su parte intracelular contiene un dominio de muerte. Tomado de Chao, 2003.

presenta interacciones con TrkA, Fig. 6. La activación de los receptores Trk regula la expresión y actividad de los canales iónicos, receptores de neurotransmisores y otras cinasas receptoras. La activación del receptor también modula la exocitosis y endocitosis de las vesículas sinápticas (Chao, 2003).

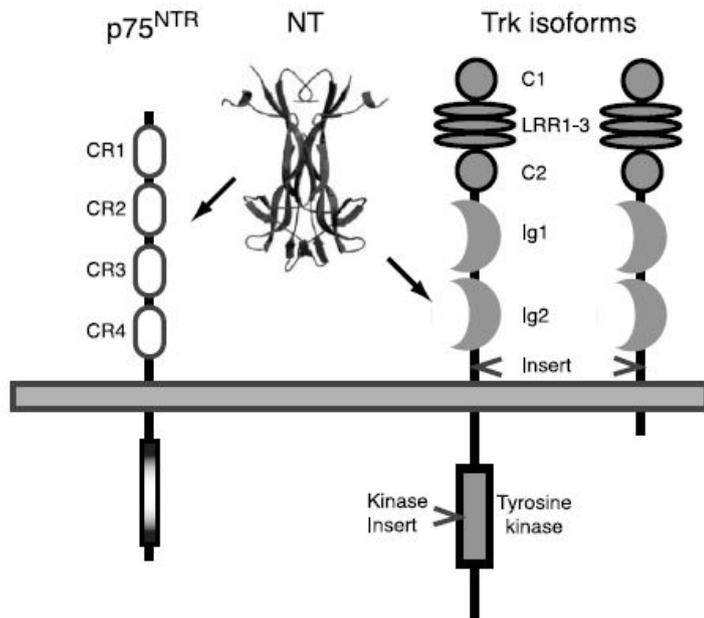
Las principales funciones de los receptores son: ensamble y remodelación del citoesqueleto, así

como el tráfico de membrana.

Aunque cada uno de estos mecanismos afecta a la función de la sinapsis, y estos mecanismos son candidatos atractivos para mediar las funciones que las neurotrofinas tienen en la regulación de la plasticidad sináptica, como en el hipocampo o en otras estructuras (Huang & Reichardt, 2003). Estudios recientes indican que los receptores Trk controlan propiedades en la membrana en escalas de tiempo similares a los de neurotransmisores clásicos. Por ejemplo, se ha demostrado que la velocidad de respuesta sináptica puede ser tan rápida con bajas concentraciones de BDNF y NT-4 como lo es con neurotransmisores, en rebanadas de hipocampo, la corteza y el cerebelo (Kafitz et al., 1999). Además, se han detectado altos niveles de ARNm y proteína de BDNF en el hipocampo, en la corteza cerebral, tanto en roedores como humanos.

El TrkB pertenece a la familia de receptores constituidos por una isoforma de tropomiosina y un dominio citoplasmático tirosina cinasa, es el receptor de alta afinidad para BDNF y NT-4. El gen de TrkB puede dar lugar a varios transcritos de ARNm en roedores, dos de ellos codifican la forma catalítica o forma completa de TrkB. Otros

dos transcritos dan lugar a dos isoformas de TrkB a las que les falta una gran parte del



dominio intracelular y no presentan actividad tirosina cinasa; estas isoformas son conocidas como receptores truncados de TrkB (Gupta et al., 2013; Fig. 7; Fig. 10).

Aunque la forma catalítica de TrkB es considerada como el receptor que media las principales acciones biológicas de BDNF, una de las formas truncadas de

Figura 7. Receptores principales asociados a neurotrofinas. En la izquierda se muestra el receptor asociado al factor necrosis tumoral. La figura de la derecha a su vez muestra el receptor Trk y una de las isoformas, como se aprecia el completo tiene el dominio cinasa. Modificado de Huang & Reichardt, 2003.

TrkB (T1) es la isoforma predominante en el cerebro adulto y se cree antagoniza los efectos del mismo (Minichiello et al., 1998). La interacción de la neurotrofina con el receptor TrkB se da a través de la activación de la tirosina cinasa con el dominio intracelular del receptor Trk, lo que conlleva la activación del mismo a través de un proceso de dimerización y autofosforilación del dominio intracelular tirosina cinasa dando lugar al reclutamiento de proteínas adaptadoras y activación de vías de señalización. El receptor activado es capaz de interactuar y fosforilar con distintos blancos intracelulares responsables de la activación de PLC- γ 1, MAP cinasas y PI 3-cinasa/Akt, y en algunos casos de la movilización de Ca^{2+} de los reservorios celulares internos (revisado por Chao, 2003).

Por su parte el receptor de baja afinidad p75^{NTR} posee una estructura relacionada con las proteínas de la super familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), caracterizadas por poseer una región intracelular no catalítica conocida como dominios de la muerte (Chao, 2003; Huang & Reichardt, 2003). La función de este receptor no está claramente establecida, sin embargo, se sabe que p75^{NTR} puede inducir muerte celular en ausencia de receptores Trk, a través de las vías que tiene asociadas a él

(RhoA, c-Jun y NF- κ B; Li et al., 2005). En el sistema nervioso, la activación de p75^{NTR} parece producir la muerte por apoptosis (Huang & Reichardt, 2003)

Los primeros en demostrar la actividad de las neurotrofinas en la transmisión sináptica excitadora fueron Lohof et al., en 1993, ellos mostraron como el BDNF potencia la actividad sináptica, espontánea y evocada en las sinapsis neuromusculares en cultivos de rana. A partir de este estudio el papel de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 se asoció como factores implicados en la potenciación de diferentes sinapsis como: las de corteza visual (Carmignoto *et al.*, 1997), de hipocampo: en cultivos (Lessman *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1995, 1996; Lessman & Heumann, 1998) y en rebanadas neuronales (Kang *et al.*, 1996). Incluso se ha encontrado que el BDNF no solo potencia la transmisión sináptica, sino que también puede disminuir su respuesta (Lessman & Heumann, 1998; Ruelas, 2008).

De igual forma, se ha investigado mucho acerca de su implicación en la generación de potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD respectivamente); fenómenos inmersos en la consolidación de memoria y aprendizaje (Poo, 2001). Se ha demostrado que el BDNF y la NT-4/5 actúan de manera directa en la eficacia de la comunicación sináptica, actuando en células presinápticas y en posinápticas de sinapsis excitadoras glutamatérgicas (Ruelas, 2008; Moran, 2013; Mendoza *et al.*, 2014). Se conoce que la participación pre y posináptica de estas neurotrofinas depende de la región del SN analizada, la fase temporal del fenómeno e incluso el estadio de madurez de los sujetos experimentales, se sabe que el BDNF y la NT-4/5, así como el receptor TrkB están presentes en el estriado (Freeman *et al.*, 2003; Zermeno *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2014). Además de que el BDNF participa en la modulación de la comunicación sináptica cortico-estriatal, pues incrementa los potenciales sinápticos poblacionales en estas conexiones (Fig. 8; Mendoza *et al.*, 2014).

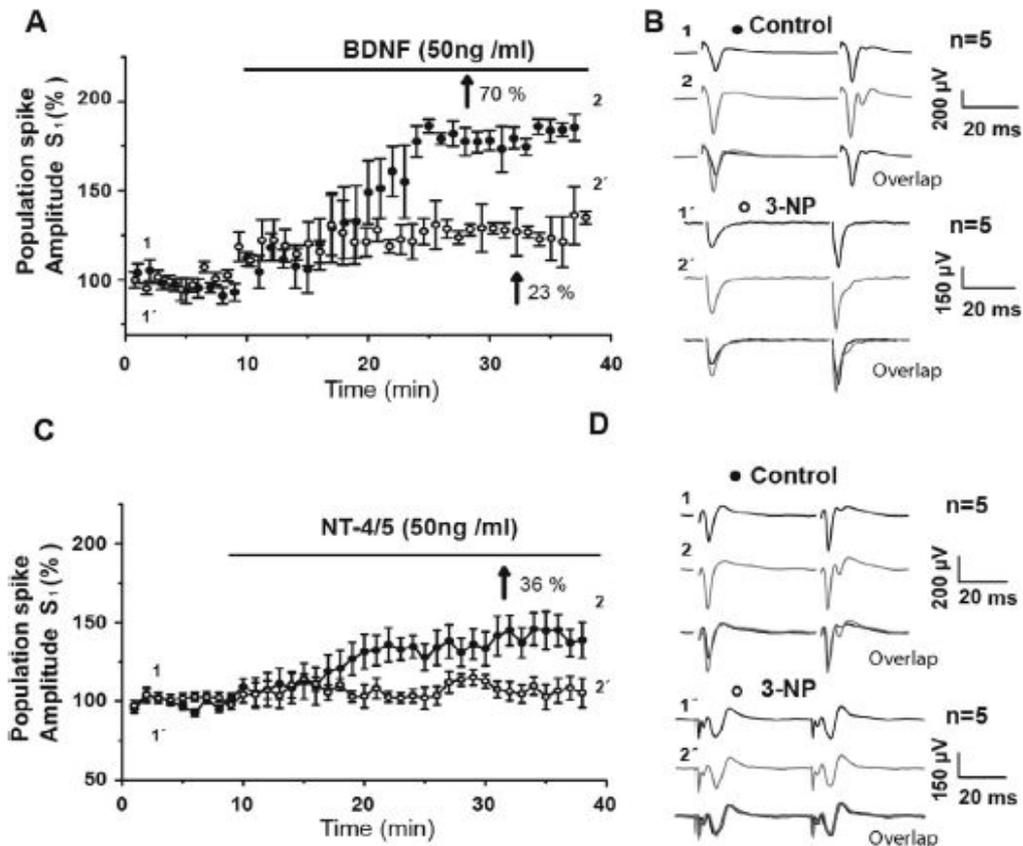


Figura 8. Incremento de amplitud en los potenciales poblacionales en control y 3-NP. En A se observa la gráfica del curso temporal de los potenciales de campo en control y en 3-NP. Se observa el incremento de amplitud de los potenciales poblacionales al aplicarse BDNF (línea superior, 50ng/ml) y se observan diferencias significativas evidentes de más de 70% en condiciones control (círculos negros) por otro lado en el modelo de 3-NP (círculos blancos) se observa también un incremento de más del 20%, significativo respecto del control. En B se muestran los trazos representativos de A. Los números a la izquierda de cada trazo representan los eventos señalados en el curso temporal. 1=Control, 2=BDNF, 1'=control, 2'=BDNF y en 1+2 se superponen ambos trazos para comparar su amplitud. En C se observa la gráfica del curso temporal de los potenciales de campo, en control (cuadros negros) y 3-NP (cuadros vacíos). Se observa el incremento de los potenciales poblacionales al aplicarse la NT-4/5 (línea superior; 50ng/ml). En los ratones no tratados se observa un incremento de la amplitud de más de un 30% respecto del trazo control, mientras que los ratones tratados con la neurotoxina no hay incremento. En D se muestran los trazos representativos de C. Los números a la izquierda de cada trazo representan los eventos señalados en el curso temporal. 1= control, 2= NT-4/5, 1'=control, 2'= NT-4/5 y en 1+2 se superponen los trazos para comparar la diferencia de amplitud. Modificado de Mendoza et al., 2014.

Sin embargo, existen pruebas de que el BDNF no es sintetizado en este núcleo, sino que se transporta de manera anterógrada desde la corteza cerebral y luego es liberado en el estriado (Fig. 9; Altar & DiStefano, 1998). En el laboratorio se demostró que el BDNF y la NT-4/5 se expresan de manera diferencial durante el desarrollo posnatal, disminuyendo la expresión de BDNF e incrementando la de NT-4/5 conforme transcurre el tiempo (Zermeño et al., 2009).

Esto podría deberse a que diferentes grupos celulares dependen de determinada neurotrofina en distintas etapas del desarrollo, o que todos los grupos celulares

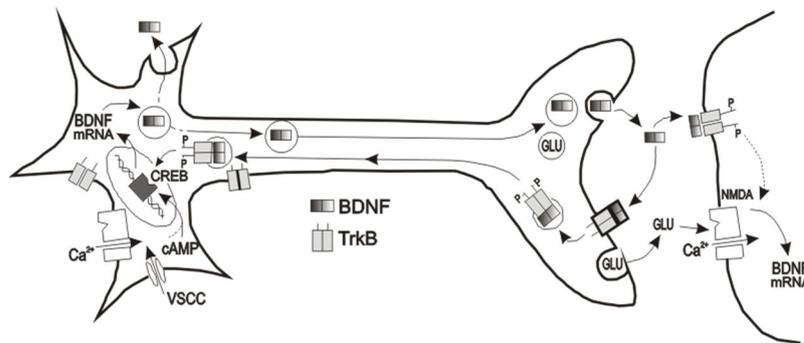


Figura 9. Transporte anterógrado del BDNF en la conexión cortico-estriatal. Conexión entre una neurona cortical glutamatérgica y una neurona GABAérgica estriatal. Abreviaciones: CREB, proteína de unión a elemento de respuesta al AMP cíclico; GLU, glutamato; NMDA, receptor de glutamato; y, TrkB, tropeomiosina relacionada a cinasa B. Modificado de: Altar & DiStefano, 1998.

dependen de

diferentes

neurotrofinas en

varios estadios del

desarrollo posnatal

(Zermeño *et al.*,

2009). Por otro lado,

se conoce que a

nivel presináptico, el

BDNF (Carmignoto

et al., 1997;

Boulanger & Poo,

1999; Tyler & Pozzo-

Miller, 2001) y la NT-

4/5 (Lessman *et al.*, 1994, 1998; Wang & Poo, 1997) incrementan la liberación de

neurotransmisor, mientras que sus acciones a nivel posináptico (Levine *et al.*, 1995)

incluyen la fosforilación de los receptores a glutamato, tanto de tipo NMDA (Suen *et*

al., 1997; Levine *et al.*, 1998) como de no NMDA (Carmignoto *et al.*, 1997; Lessman &

Heumann, 1998), por interacciones intracelulares con el receptor TrkB. En un inicio se

pensaba que los efectos de estas neurotrofinas debían atribuirse necesariamente a un

origen presináptico o postsináptico; sin embargo, Lessman & Heumann en 1998

sugieren que el incremento de la efectividad sináptica, inducida por BDNF y NT-4/5

presináptica o postsinápticamente, no son fenómenos aislados, sino que pueden

operar en paralelo o que aunque se reconozca que activan el mismo receptor dada la

diferencia estructural puedan activar regiones diferentes del mismo receptor y por lo

tanto generar una respuesta distinta (Minichiello *et al.*, 1998).

Los efectos de NT-4/5 y BDNF en la modulación de la comunicación sináptica están

relacionados con la estimulación del receptor TrkB (Lessman *et al.*, 1994; Levine *et al.*

1995, 1996; Kang *et al.* 1996), por lo que al activar el receptor se estimula una

cascada de señalización intracelular. Se ha reportado que el BDNF activa las rutas de

señalización MAPK y PI3K, pero no PLC- γ , en rebanadas de hipocampo (Gottschalk

et al., 1999). Otros estudios, sin embargo, han visto que PLC- γ es un componente

notable en la participación de la transmisión sináptica. Por ejemplo, Amaral & Pozzo-

Miller en 2007 encontraron que PLC- γ media la activación de corrientes espontáneas

en hipocampo inducidas por BDNF, a través de la disponibilidad de Ca^{2+} en reservorios intracelulares y de flujos extracelulares. La PLC- γ también está implicada, en la actividad conjunta de BDNF y NT-4/5, en la liberación de glutamato en neuronas de la corteza cerebral a través de un sistema de transporte inverso mediado por el transportador de glutamato (Numakawa *et al.*, 2002).

En un estudio en donde se sobre-expresó el receptor TrkB en su isoforma completa en neuronas de corteza e hipocampo, la PLC- γ incrementó su actividad en presencia de BDNF (Koponen *et al.*, 2004).

Estos trabajos muestran que la activación de las vías de señalización promovidas por TrkB son importantes para comprender la modulación de la transmisión sináptica mediada por BDNF y NT-4/5 (Fig. 10). En el laboratorio, Morán en 2013 observó los efectos sinápticos que ejecutan estas dos neurotrofinas en las conexiones cortico-estriatales en ratones control al aplicarse de manera conjunta y la participación que tienen las cascadas de señalización asociadas al receptor TrkB cuando es activado por BDNF o por NT-4/5 en presencia de los bloqueadores de las vías asociadas a TrkB. En estos procedimientos encontró que al aplicar BDNF y después NT-4/5, el NT-4/5, antagonizó el efecto producido por BDNF y redujo la respuesta del potencial poblacional. Pero cuando aplicó NT-4/5 y después BDNF, el incremento de los potenciales poblacionales evocado por la NT-4/5 se mantuvo al aplicar el BDNF. Posteriormente observó el efecto de la neurotrofina BDNF por un lado y NT4/5 por el otro en presencia del bloqueador de las vías; MAPK, IP3K y PLC- γ 1. De estos experimentos observó que MAPK e IP3K participan en la modulación de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5, notó también que, la administración del bloqueador de PLC- γ 1 por sí mismo incrementó la respuesta sináptica glutamatérgica.

De esta manera nos enfocamos en los efectos que son producidos a través de la activación de la vía de señalización PLC- γ 1.

Fosfolipasa C gamma 1

La vía de la fosfolipasa C (PLC- γ 1) muestra la tendencia a incrementar los niveles de Ca^{2+} citoplasmático a través del metabolismo de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) que genera Inositol Trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Estas moléculas entonces modulan la actividad de proteínas cascada abajo en la señalización celular, que

terminan alterando las respuestas celulares como: la proliferación, diferenciación celular, apoptosis, conformación del citoesqueleto, tráfico vesicular, activación de canales iónicos, funciones endocrinas, neurotransmisión y activando factores de transcripción. La fosforilación del residuo de tirosina Y816 o el Y783 de los receptores Trk se activa directamente por la fosforilación de la enzima PLC- γ 1. La PLC- γ hidroliza al fosfolípido PIP2 (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) para generar IP₃ (Inositol 1, 4, 5-trisfosfato) y DAG (Diacilglicerol). El IP₃ induce la liberación Ca²⁺ de los depósitos intracelulares aumentando la disponibilidad de Ca²⁺ citoplasmático, que a su vez activa otras vías de señalización, como las isoformas de PKC (Proteína cinasa C) y a la proteína CaMKII (Ca²⁺/Calmodulina proteína cinasa II). Por su parte, DAG activa algunas isoformas de la PKC reguladas por DAG (Figura 10). Esta vía es importante para el crecimiento neurítico y para la inducción y mantenimiento de la plasticidad sináptica en ciertas áreas cerebrales (Schuman, 1999; Reichardt, 2006). La activación de estas vías de señalización, mediadas por las neurotrofinas, ha sido relacionada con el papel que juegan en la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación y el mantenimiento trófico de las neuronas; no obstante, también se han implicado en la modulación de las propiedades neuronales inherentes a la comunicación sináptica. En este sentido, existen investigaciones que apuntan a las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 como candidatos para estudiar la modificación de la comunicación sináptica, la supervivencia neuronal y el rol de estas en las enfermedades neurodegenerativas.

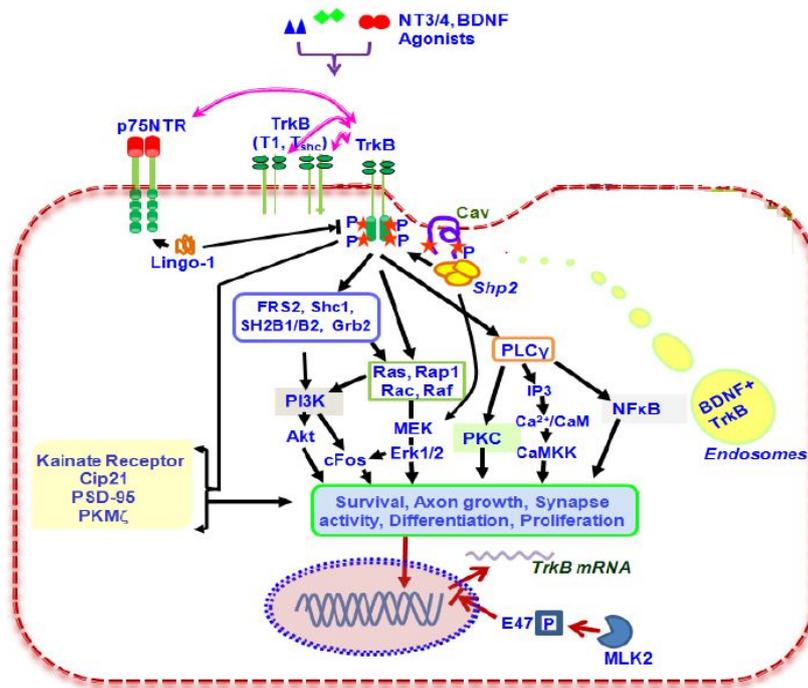


Figura 10. Los receptores Trk median señales de diferenciación y supervivencia mediante la activación de las vías de Ras MEK, PI 3-kinasa y PLC- γ 1. Los receptores Trk reclutan y fosforilan PLC- γ 1 y Shc, lo cual lleva a la activación de PI3K y PKC. Rap1 actúa desde su localización endosomal la cual activa a su vez a Mek. Akt por otro lado es activada por la previa activación de PI3K. Como se observa en la imagen una vez activadas las vías de señalización se activan diversos procesos de transcripción responsables de la supervivencia celular. Gab1, Grb2-associated binder-1; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; GIPC, GAIP interacting protein, C terminus; MEK, mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1; SH2B, Src homology 2-B. Modificado de Gupta et al., 2013.

Con base en los antecedentes expuestos en este trabajo planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Si BDNF y NT-4/5 activan el mismo receptor el cual activa la vía de transducción de señales mediada por la PLC- γ 1, quizás la coadministración de estas neurotrofinas posiblemente esté participando en la modulación de la transmisión sináptica de las aferentes cortico-estriatales en un modelo de 3-NP.

Objetivo general

Determinar si la coadministración de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 participan en la

modulación de la transmisión sináptica de las aferentes cortico-estriatales a través de la activación de la vía de transducción de señales mediada por la (PLC- γ 1) en un modelo farmacológico de la EH.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de BDNF y de NT-4/5 en la vía de señalización de PLC- γ 1 mediante el uso de U73122 (inhibidor específico de PLC- γ 1) en tejido estriatal de animales tratados con 3-NP.
- Evaluar el efecto de NT-4/5 sobre BDNF en tejido estriatal de animales tratados con 3-NP.
- Evaluar si la NT-4/5 incrementa el efecto del BDNF en tejido estriatal de animales tratados con 3-NP.
- Evaluar si la NT-4/5 activa una vía distinta al BDNF en tejido estriatal de animales control.
- Evaluar la participación de PLC midiendo el estado de fosforilación de sus residuos que son activados por las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 con la técnica de Western Blot

Material y Métodos

Obtención y preservación in vitro de rebanadas cerebrales

Se utilizaron ratones machos (Harlan, México) de la cepa C57BL/6 de alrededor de 4-5 semanas de vida al inicio del experimento. Los animales fueron separados en dos grupos uno control y uno en el que se les administró la neurotoxina 3-NP a una dosis intraperitoneal de [15 mg/Kg] durante cinco días, posterior al tratamiento se dejaron dos días y se sacrificaron para obtener el tejido cerebral. Los ratones fueron anestesiados con éter, se decapitaron y se extrajo el cerebro del cráneo del animal. Este fue depositado en una solución fisiológica artificial de líquido cerebro-espinal a 4°C, saturada con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a un pH de 7.4, la cual contiene CaCl₂ (2 mM), NaCl (125 mM), KCl (3 mM), MgCl₂ (1 mM), NaHCO₃ (26 mM), ácido ascórbico (0.2 mM), tiourea (0.2 mM) y glucosa (10 mM). Se separaron ambos hemisferios cerebrales y se colocaron en una cámara de un vibroslicer (Pelco® 1000, TedPella) que contenía la solución previamente descrita. Se realizaron cortes sagitales (400µm), las rebanadas fueron colectadas un vaso de precipitados sumergiéndolas e incubándolas en la solución fisiológica oxigenada por una hora a temperatura ambiente antes de transferirse a la cámara de registro. Una vez en la cámara de registro, se realizaron registros del potencial poblacional en rebanadas cerebrales que contuvieran el estriado (ver Fig. 11).

Parámetros de estimulación y registro electrofisiológico

Con la técnica de registro electrofisiológico de la actividad poblacional se evalúa el comportamiento de múltiples poblaciones celulares en las cuales es posible observar los cambios en la comunicación neuronal en condiciones experimentales prediseñadas. La espiga registrada extracelularmente es una onda trifásica, dada por el cambio en la localización de los pozos y las fuentes de corriente activa en la neurona durante el pico del potencial de acción, en la membrana del soma se genera una corriente activa (llamada pozo), y en las dendritas se genera una corriente pasiva (llamada fuente). Por convención, en un registro extracelular una onda hacia abajo es negativa (-) y representa una corriente entrante; mientras que una onda hacia arriba es positiva (+) y representa una corriente saliente.

Para realizar el registro poblacional, las rebanadas se perfundieron con un flujo

constante (1 ml/min) con la solución fisiológica oxigenada a una temperatura de $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Las espigas sinápticas poblacionales se obtuvieron estimulando las fibras aferentes al neocórtico con intensidad y duración variable; a una frecuencia de: 0.1 Hz, colocando electrodos bipolares concéntricos de 50 μm de diámetro en la punta usando el protocolo de pulso pareado el cual consiste en dar dos estímulos de la misma intensidad con un intervalo de entre 20-50 ms (Fig. 11B). Para analizar los cambios inducidos por este protocolo se usa el cociente, que resulta de la división de las amplitudes $S2 / S1 * 100$.

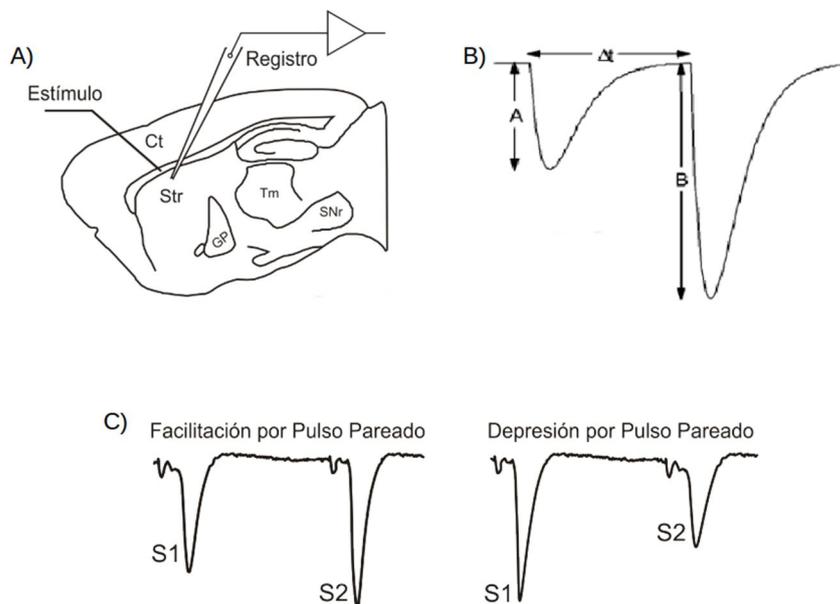


Figura 11: Método de registro y estimulación en campo con el protocolo de pulso pareado. En la siguiente imagen se muestra la forma en la que se obtuvieron los registros electrofisiológicos en A) del lado izquierdo se muestra el electrodo de estimulación, posicionado sobre el cuerpo calloso para estimular las aferencias provenientes de la corteza que llegan al estriado. A la derecha se muestra el electrodo que registra los potenciales ubicado en el estriado dorsal. En B) se muestra el protocolo de pulso pareado en el cual A y B pertenecen a las respuestas sinápticas separadas por un intervalo de estimulación de 20 a 50 ms. Por su parte en C) se observa la facilitación por pulso pareado se puede ver que la segunda respuesta tiene una amplitud mayor que la primera respuesta. En cambio, en la depresión por pulso pareado el primer potencial es mayor que el segundo. Abreviaturas: GP, Globo Pálido; Tm, Tálamo; y, SNr, Sustancia Nigra porción reticulata. Modificado de Morán, 2013.

Esta es una medida para analizar si existe cambio en la liberación de neurotransmisor indicando así si es pre- o postsináptica. Si incrementa la liberación del neurotransmisor; la facilitación por pulso pareado (FPP) disminuye, si decrementa la liberación de neurotransmisor la FPP aumenta (ver Fig. 11C). El protocolo de pulso pareado (PP) está basado en la teoría del calcio residual que establece que los

cambios en el PP son resultado de las modificaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular en la terminal sináptica. La concentración de Ca^{2+} puede aumentar o disminuir como respuesta a los estímulos de la misma intensidad dados cercanos en el tiempo, lo que modifica la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Katz & Miledi, 1968; Lessman & Heumann, 1998), si el cambio es presináptico el cociente $S2/S1 * 100$ se modifica. Si el cambio es postsináptico las amplitudes de ambas respuestas se modifican en la misma proporción y por lo tanto el cociente $S2/S1 * 100$ no cambia. Se emplearon electrodos de borosilicato y como conductor eran llenados con la solución descrita previamente (procedimiento descrito por Mendoza, 2001 revisado en Morán, 2013).

La señal electrofisiológica se amplificó (MP-P15, GRASS) y se guardó con la ayuda de un programa de adquisición casera generado en Labview. Una vez obtenida la respuesta poblacional, se guardó un tiempo control de 10 minutos por experimento, al cabo de los cuales se añadió el DMSO a una concentración final 0.01% en el total del volumen en condiciones control y en el modelo de 3-NP, posteriormente se evaluó el efecto del antagonista de PLC; U73122 (1-[6-(((17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione; 5 μm) en una solución con la concentración baja en calcio para evaluar si la dinámica del calcio extracelular intervenía con el bloqueador de la vía de PLC por lo que se descartó el calcio extracelular, está contenía: CaCl_2 (1 mM), NaCl (125 mM), KCl (3 mM), MgCl_2 (3 mM), NaHCO_3 (26 mM), ácido ascórbico (0.2 mM), tiourea (0.2 mM) y glucosa (10 mM). En el trabajo fue el único procedimiento experimental en el que se utilizó bajo calcio, los demás experimentos fueron hechos con concentraciones de calcio normal. Después de este procedimiento se evaluó el efecto de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 a una concentración de 50 ng/ml en un volumen de 50 ml en presencia del U73122, en un flujo constante de perfusión.

En otra serie de experimentos se observó el efecto de la coadministración de neurotrofinas BDNF [50 ng/ml] y NT-4/5 [50 ng/ml] o en orden de administración inversa. Finalmente se observó el efecto de las neurotrofinas en presencia del bloqueador en rebanadas cerebrales de ratones control para verificar que la vía estuviera bloqueada y el efecto de la neurotrofina se debía a una interacción distinta con su receptor.

En todos los registros, se agregó al medio bicuculina (10 μM) para bloquear los receptores GABA_A y aislar el componente glutamatérgico de las espigas poblacionales

proveniente de las aferentes corticales.

Western Blot

Obtención de proteínas

Para el análisis de la expresión de proteínas por Western Blot se obtuvieron proteínas de tejido estriatal el cual fue disgregado mecánicamente en buffer de lisis que contenía 26 mM Tris-HCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1.3 glicerol, 130mM NaCl y Complete® (protease inhibitor cocktail). Después de homogenizar el tejido mecánicamente, se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante el cual contenía la fracción proteica. Las proteínas se cuantificaron por la técnica de Bradford y congelaron a -70°C para los análisis posteriores.

Electroforesis y transferencia.

Para la electroforesis se utilizaron geles de acrilamida/bis-acrilamida al 10%, lo cuales se cargaron con 30µg de proteína en cada pozo. Para separar las proteínas por peso molecular, se realizó una electroforesis aplicando una corriente de 90 V y 15 A durante 1:40 hr a en una cámara de electroforesis Biorad (EEUU) que contenía buffer de corrida (Tris, Glicina, SDS). Al terminar la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF. Para la transferencia se utilizó la misma cámara de electroforesis que contenía buffer de transferencia (TRIS, Glicina, Metanol, frío (4 °C) y se aplicó una corriente eléctrica de 90 V y 400 A durante 2 horas.

Una vez que las proteínas fueron transferidas a la membrana de PVDF, esta se bloqueó con BSA al 5% en PBS durante toda la noche a 4°C.

Inmunodetección.

Para la detección de las proteínas de interés se incubaron las membranas, previamente bloqueadas con albumina de suero de bovino (BSA), al menos 12 horas a 4°C con anticuerpos primarios específicos contra PLC- γ para lo cual se utilizó el PLC- γ Antibody Sampler Kit 3060s (Cell Signaling Technology), los cuáles se utilizaron a una dilución de 1:1000 en PBS+BSA (5%).

Después de la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS + Tween 20 al (0.05%). Posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpo secundario durante 2hrs a temperatura ambiente y al finalizar la incubación se repitió el ciclo de tres lavados con PBS+Tween 20 al (0.05%). Para detectar las proteínas se utilizó un sistema de quimioluminiscencia y se reveló en

placas radiográficas marca Kodak. Las placas fueron escaneadas (BioSens Capture) y se realizó la densitometría de la señal obtenida de cada una de las proteínas con ayuda del software Image J. (NIH). Para obtener la densidad relativa se realizó el siguiente procedimiento:

$$\text{Densidad Relativa} = \frac{\text{Porcion Fosforilada}}{\text{Total de proteina}}$$

Al obtener el cociente lo que se hizo fue normalizar a 1 respecto del control (Bicuculina) para PLC- γ 1 y el control de PLC- γ 2 respectivamente.

Análisis y Estadísticos

Las gráficas fueron obtenidas normalizando el porcentaje al cien por ciento del número de experimentos, los datos se analizaron estadísticamente con los programas Origin 9.1 y SigmaPlot 12.3 (USA), y de acuerdo a la naturaleza de los datos, estos se analizaron con la prueba de t de dos colas, un Análisis de varianza y el test de Kolmogorov-Smirnov, para datos paramétricos si los datos no se distribuían normalmente y sus varianzas no eran homogéneas se emplearon análisis no paramétricos, Kruskall Wallis y sus respectivas comparaciones múltiples en los casos con significancia estadística, la cual se estableció en $p < 0.05$.

Resultados

Al principio de cada registro electrofisiológico se realizó una curva de intensidad-amplitud, con el fin de conocer la intensidad mínima de corriente requerida para obtener una respuesta biológica, conocido como umbral. Ruelas, 2008 y Mendoza *et al.*, 2014 reportaron que el 3-NP modifica la respuesta sináptica poblacional por lo que para cada experimento fue necesario realizar esta curva ya que indicó la intensidad aceptable para no saturar la respuesta y observar los cambios en amplitud de la respuesta sináptica poblacional (positivos o negativos). Todos los experimentos fueron hechos en presencia de bicuculina y siempre se grabó la actividad control previa a las manipulaciones farmacológicas.

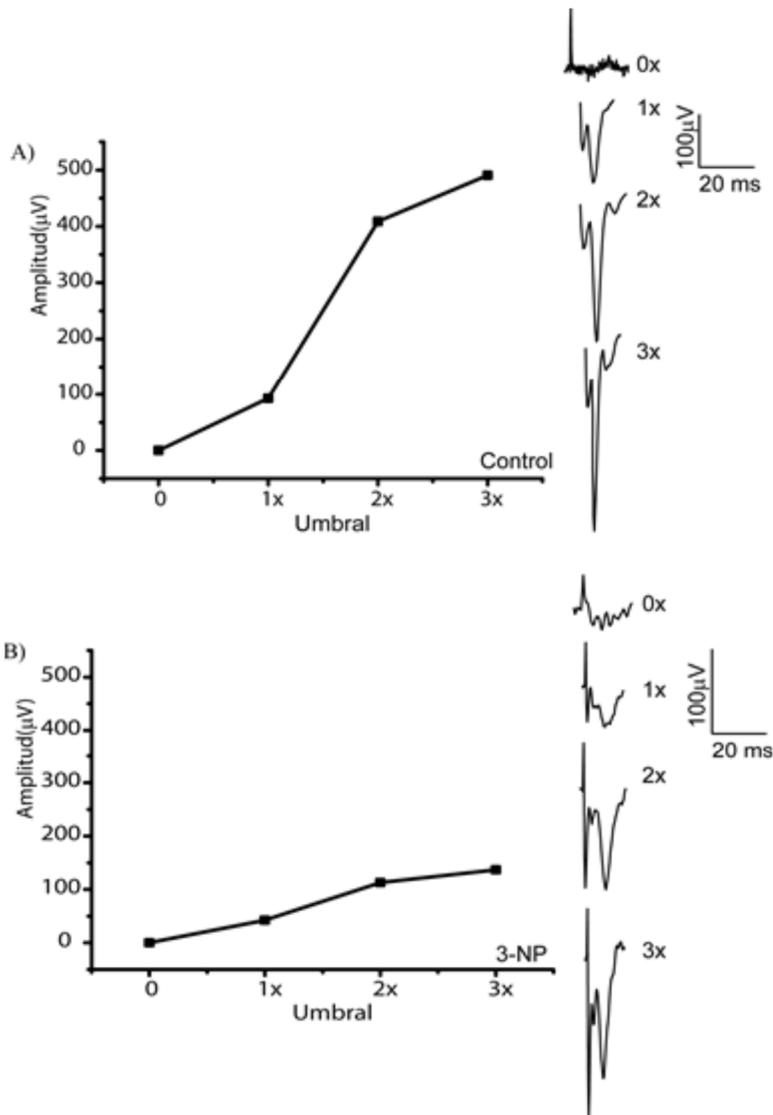


Figura 12: El 3-NP modifica las respuestas sinápticas poblacionales en registros electrofisiológicos de campo, comparadas con las de rebanadas cerebrales de ratón control. En A) se muestra una curva de intensidad-amplitud de la respuesta en rebanadas control, el eje de las abscisas es la intensidad del estímulo, representada como veces umbral (factor de amplificación de la intensidad) y el de las ordenadas la amplitud de la respuesta. Observamos que para obtener una respuesta se necesita de poca intensidad para provocar el potencial de acción ya que en 1x existe una respuesta poblacional, sin embargo, en B) que pertenece a las rebanadas de tejido de ratones tratadas con 3-NP la intensidad para obtener una respuesta debe ser mayor, además de que la respuesta máxima no sobrepasa los 150 μV .

En la Fig. 12 se comparan las respuestas entre rebanadas cerebrales de ratón control y aquellas que fueron extraídas de ratón tratado con 3-NP. La respuesta poblacional en las rebanadas control fue más fácil de evocar (Fig. 12A) ya que en ella la intensidad necesaria para provocar el potencial de acción fue menor y se obtuvo una respuesta cercana a cien microvoltios (μV) de amplitud. Al aumentar la intensidad del estímulo, la

respuesta fue mayor hasta llegar a un punto de saturación ($460\mu\text{V}$) en el cual la liberación de neurotransmisor llegó a su máximo y la respuesta poblacional no pudo crecer más. La intensidad de estimulación fue aplicada tres veces el umbral en que apareció la respuesta biológica para observar la saturación.

Mientras que en las rebanadas cerebrales del ratón tratado con 3-NP tuvimos mayor dificultad para obtener una respuesta de la misma amplitud que en los controles con intensidades de corriente equivalentes (Fig. 12B), como se observa, la respuesta umbral al estímulo de la corriente en el potencial sináptico poblacional es menor contrario a lo sucedido en las rebanadas control en la que desde el principio y con un estímulo de menor intensidad ya había una respuesta poblacional, sin embargo, al duplicar dos veces la intensidad de estimulación en el cual apareció la respuesta (umbral) obtuvimos una espiga poblacional sináptica de $100\text{ microvoltios } (\mu\text{V})$ aproximadamente, sin embargo, cuando se aplicó tres veces la intensidad del umbral de estimulación, la respuesta de esta se saturó como se observa en la gráfica B).

El DMSO no afecta la transmisión sináptica en rebanadas de ratón control ni en 3-NP

Debido a que el bloqueador de la vía de PLC- γ 1 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO), se realizaron registros en los que evaluamos que este detergente no tuviera efectos en la respuesta fisiológica por sí mismo. Una vez que se realizaron las curvas I-A, para cada experimento se grabó un tiempo relativo de 10 minutos al que consideramos como control, en el que una vez que no se observaron variaciones en la amplitud, se observó que el DMSO disuelto a una concentración al 0.01%

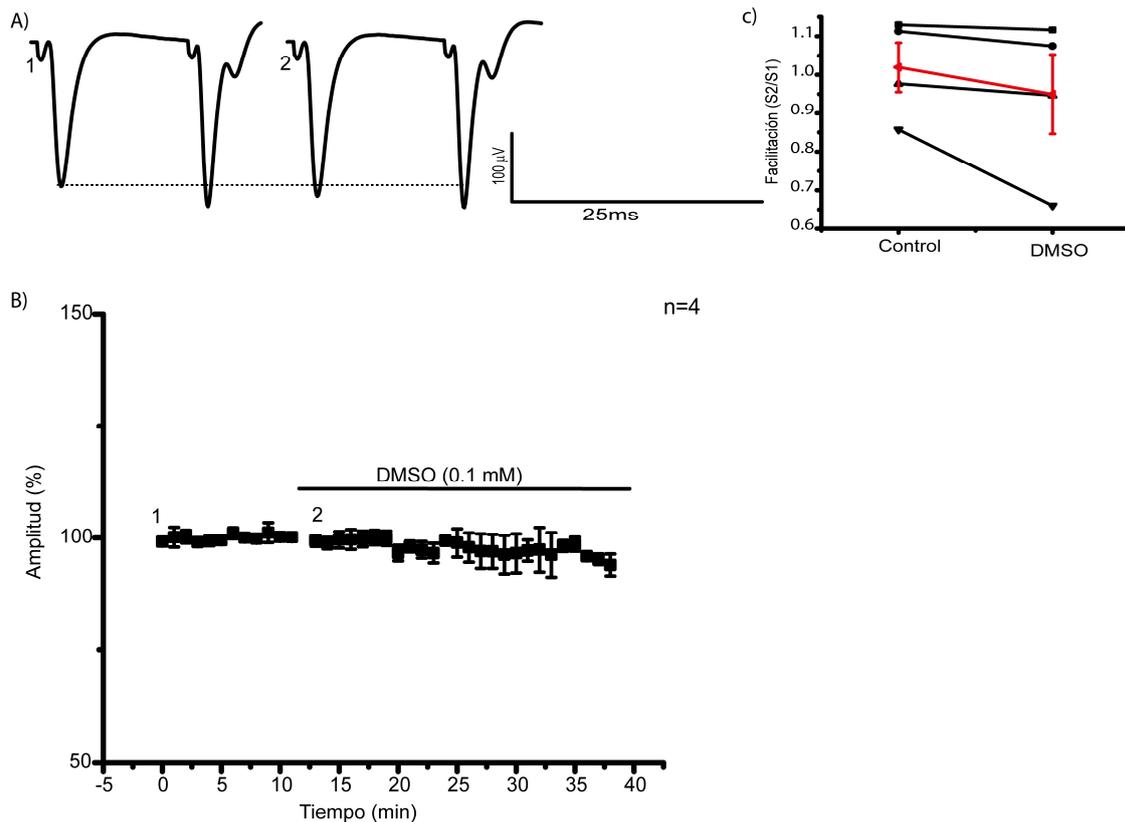


Figura 13: El DMSO no afecta la transmisión sináptica en rebanadas cerebrales de ratones control. En A) muestra los potenciales poblacionales representativos del experimento, los números indican de que momento fueron tomados los trazos; El 1 representa el control y el 2 se tomó después de aplicar el DMSO. La figura B) pertenece al curso temporal del experimento expresado en el promedio normalizado al cien por ciento, se observa que el DMSO no modifica la respuesta de los potenciales poblacionales, en la parte final del experimento se observa un ligero decremento, sin embargo, no es significativo. Finalmente, en C) tenemos el análisis del pulso pareado, las líneas negras representan experimentos individuales y la roja el promedio de experimentos, el comportamiento de los experimentos es similar excepto en uno $p < 0.05$, $n = 4$, Prom +SEM.

no afecto la comunicación sináptica tanto en rebanadas cerebrales de ratón control como aquellas que se extrajeron de ratones tratados con 3-NP. Se demostró que el disolvente no tiene efecto por sí mismo. En la Fig. 13, se puede notar que el DMSO no afecto la comunicación sináptica (control = $102.68 \pm 1.03\%$ vs DMSO = $104.39 \pm 0.63\%$), lo cual se aprecia con mayor claridad en el curso temporal del experimento presentado en la Fig. 13B, el cual permaneció estable y sin cambio aparente después de la aplicación del DMSO. Se muestra además el análisis de proporción de pulso pareado en la Fig. 13C) control = $1.245 \pm 0.110\%$ vs DMSO = $1.336 \pm 0.144\%$.

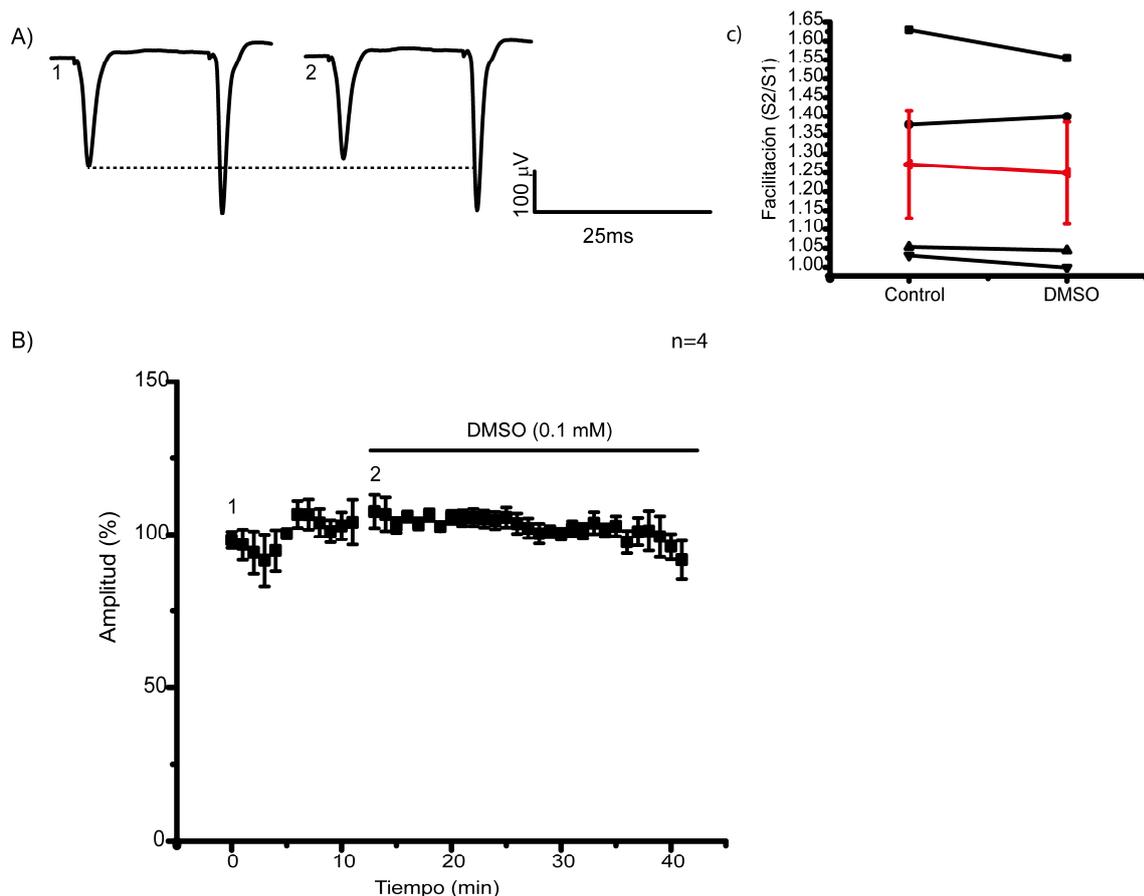


Figura 14: El DMSO no afecta la transmisión sináptica en rebanadas cerebrales de ratones tratados con 3-NP. En A) se muestran trazos representativos del experimento, los números indican el momento en que fueron tomados los trazos; El 1 representa al control y el 2 un trazo tomado después de aplicar el DMSO. La figura B) pertenece al curso temporal del experimento expresado en el promedio normalizado al cien por ciento, se observa que no existe un cambio significativo en el potencial poblacional después de aplicar el DMSO comparado con el control. Finalmente, en C) muestra el análisis del pulso pareado, las líneas negras representan experimentos individuales y la roja el promedio de experimentos, en este observamos que no existen cambios significativos en el PPR ($p < 0.05$, $n = 4$; Prom + SEM).

El siguiente experimento fue para demostrar que el DMSO no modificaba la comunicación sináptica, en el modelo de 3-NP por lo que en la Fig. 14 se muestra que el disolvente tampoco afectó la comunicación sináptica en las rebanadas de los ratones 3-NP (control = $102.089 \pm 0.294\%$ vs DMSO = $105.280 \pm 1.758\%$). De la misma forma que en la figura precedente B) muestra el curso temporal, en la cual se observa que, aunque el experimento presentó menor estabilidad en el control y existió una mayor variabilidad comparada con la variabilidad de las rebanadas control. Los análisis mostraron que no existieron cambios significativos después de aplicar el DMSO, así como en el análisis del pulso pareado Fig. 14C control = $1.156 \pm 0.05\%$ vs DMSO = $1.105 \pm 0.05\%$) en el que comprobamos efectivamente que el DMSO no afectó en la terminal presináptica como tampoco lo hizo en la célula postsináptica.

El bloqueador U73122 en una solución de bajo calcio no incrementa la amplitud de la espiga poblacional en rebanadas cerebrales de ratones tratados con 3NP

Después de demostrar que el DMSO no tenía efecto en la comunicación sináptica y como los antecedentes indicaban que el bloqueador por sí mismo evocaba una respuesta al incrementar la amplitud de la espiga poblacional en rebanadas de ratones control y de tratados con 3-NP en solución de Ca^{2+} normal (2mM), el procedimiento experimental que planteamos fue, si el U73122 tenía efecto por sí mismo, debería tenerlo aún si la concentración de calcio disminuyese (1mM), por lo que como se observa en la Fig. 15 inferimos que el efecto del bloqueador es calcio dependiente ya que el incremento en la espiga poblacional no se observó y no existieron diferencias significativas entre el grupo control comparado con el bloqueador (control=100% vs bloqueador=86.593 \pm 5.189%), así como tampoco existió significancia entre el bloqueador y el lavado de los fármacos (bloqueador=86.593 \pm 5.189% vs lavado=77.333 \pm 1.862%).

En esta figura como en las posteriores no se muestra el análisis de pulso pareado y la razón es que en ellos no hubo diferencias significativas, de lo cual se intuye que al menos en estos procedimientos experimentales las modificaciones en la liberación de neurotransmisor en la terminal presináptica o modificaciones en la célula posináptica no son lo suficientemente grandes para que haya cambios significativos. Además es necesario aclarar que esta condición experimental fue la única en la que se utilizó una concentración de calcio menor, todas los demás procedimientos fueron hechos en concentraciones normales de calcio.

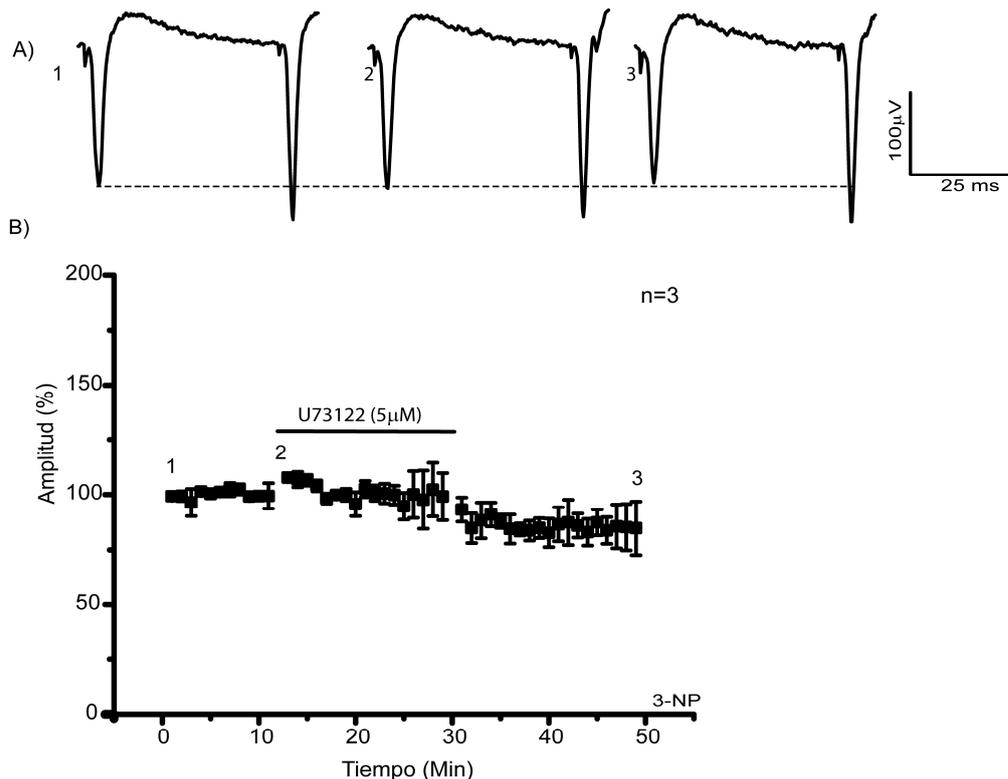


Figura 15: El U73122 depende del calcio para incrementar la respuesta poblacional sináptica en 3NP. En A) se muestran trazos representativos del experimento, los números indican el momento en que fueron tomados los trazos respecto del tiempo en el curso temporal; El 1 representa al control y el 2 un trazo tomado después de aplicar el U73122 por su parte el 3 pertenece al lavado del fármaco. La figura B) pertenece al curso temporal del experimento expresado en el promedio normalizado al cien por ciento, se observa que no existe un cambio significativo en el potencial poblacional después de aplicar el U73122 comparado con el control ($p < 0.05$, $n = 3$; Prom + SEM).

El bloqueador U73122 no modifica la respuesta de BDNF mientras que la NT-4/5 disminuye la respuesta poblacional en presencia de este.

Al haber observado que el bloqueador de la vía no tenía efecto por sí mismo en concentraciones bajas de calcio, pero si en concentraciones normales pensamos que este efecto dependía de la señalización activada por calcio, es por ello que evaluamos si el efecto de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 dependía de la vía de señalización PLC- γ 1, debido a que Morán, 2013 reportó que esta vía y los efectos del bloqueador parecía afectar la señalización de estas neurotrofinas, además, demostró que las otras dos vías asociadas al TrkB influyen en la modulación de BDNF y NT-4/5.

Debido a que los efectos de la vía de PLC- γ 1 no están del todo descritos, decidimos evaluar si las neurotrofinas modulaban la actividad corticoestriatal en presencia del bloqueador de PLC- γ 1.

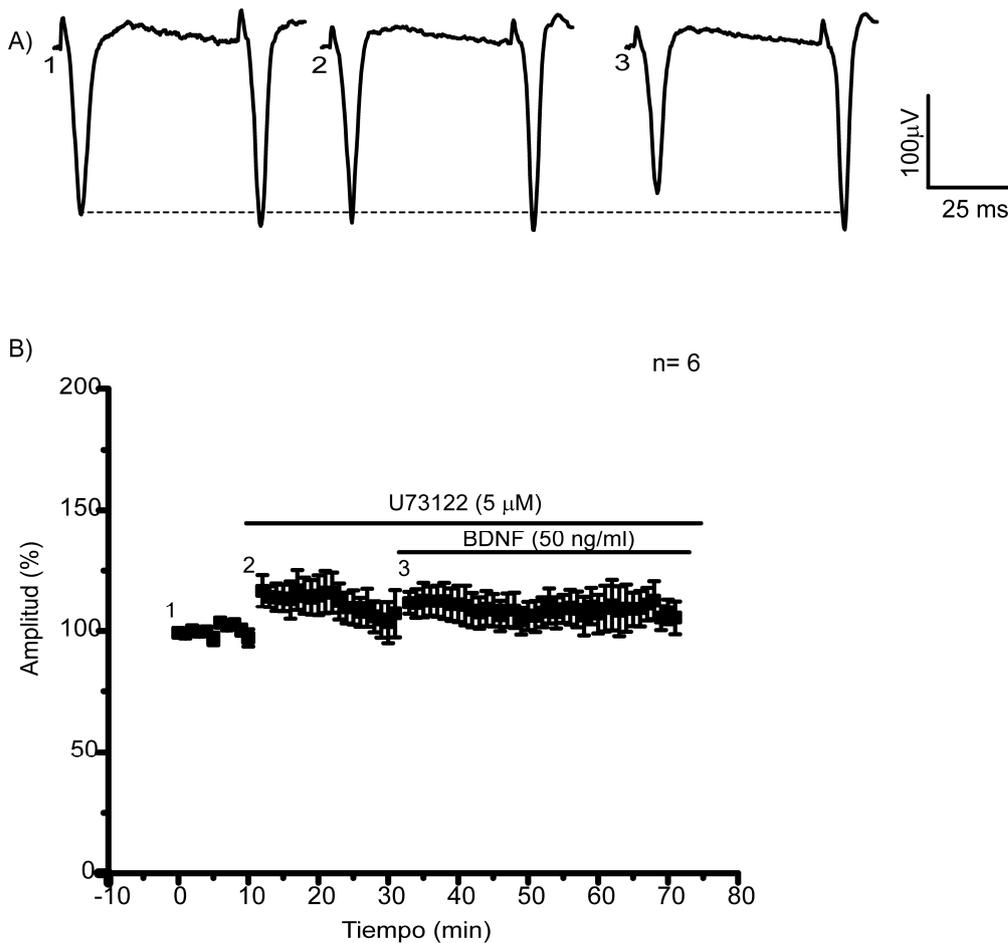


Figura 16: El BDNF no tiene efecto en presencia del U73122 en rebanadas cerebrales de ratones tratados con 3-NP. En A) se observa los trazos representativos pertenecientes a tres condiciones distintas durante el experimento, el número 1 pertenece al trazo que se obtuvo de la condición control, 2 representa el trazo en el cuál el bloqueador está presente y 3 representa el momento en el cual se añadió BDNF en presencia del bloqueador, los números corresponden con los del esquema B) en el que se observa el curso temporal del experimento. ($p < 0.05$, $n = 6$, Prom + SEM)

En estos experimentos se tomó el registró control y posteriormente se aplicó el bloqueador de PLC y se comprobó que la respuesta poblacional no se afectó, por lo que el incremento aparente de la espiga poblacional después de aplicar el bloqueador de PLC ($5 \mu\text{M}$) no resulto significativo (control = $100 \pm 0.007\%$ vs bloqueador = $107.77 \pm 6.945\%$, $P = 0.629$). El bloqueador se dejó en el baño alrededor de veinte minutos o más, con la finalidad de que al añadir el BDNF la vía estuviera bloqueada Fig. 16. Se puede notar que la neurotrofina no tuvo efecto (bloqueador = $107.77 \pm 6.945\%$ vs BDNF = $108.98 \pm 9.701\%$). Es de notar, además, que el incremento aparente de la espiga poblacional de BDNF en presencia del bloqueador no es significativo si se compara con la del control (control = 100 ± 0.007 vs BDNF = $108.98 \pm 9.701\%$) y en la interpretación de estos resultados hay que ser prudentes ya que en este trabajo en los procedimientos experimentales que utilizamos el BDNF, este no tuvo efecto.

Al haber observado la respuesta del BDNF en presencia del bloqueador, la siguiente interrogante era ¿cuál era el comportamiento de la NT-4/5 en presencia del bloqueador? Puesto que como comentamos con anterioridad estas neurotrofinas comparten el mismo receptor. En estos experimentos se aplicó el bloqueador de PLC, observamos que hubo un incremento en la modulación que no resulto significativo (control= $100 \pm 0.003\%$ vs bloqueador= $105.979 \pm 11.28\%$, $P=0.053$), una vez registrado el efecto del bloqueador se aplicó la neurotrofina como se observa en la Fig. 17, notamos que la NT-4/5 disminuyó la amplitud del potencial poblacional,

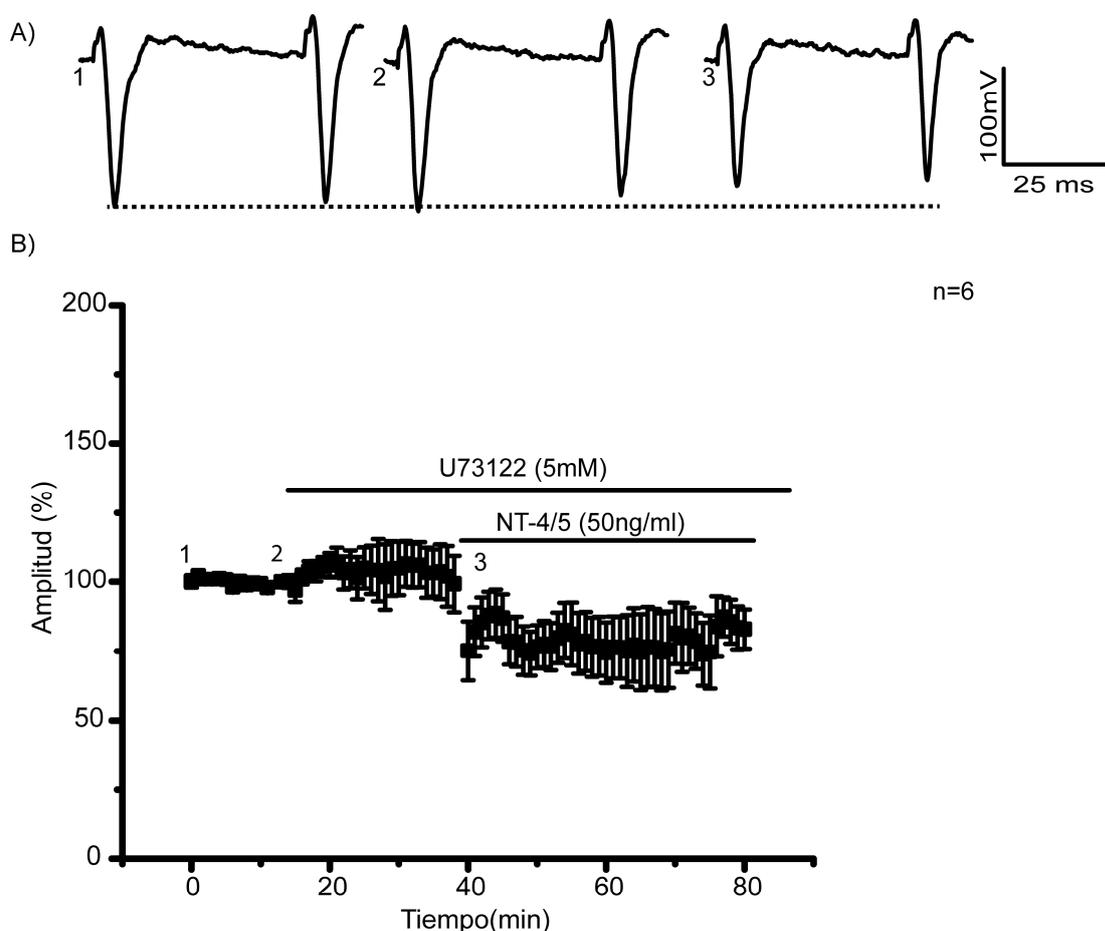


Figura 17: El NT-4/5 disminuye la actividad poblacional sináptica en presencia del U73122 en rebanadas cerebrales de ratones tratados con 3-NP. En A) se observa los trazos representativos pertenecientes a tres condiciones distintas durante el experimento, el número 1 pertenece al trazo que se obtuvo de la condición control, 2 representa el trazo en el cuál el bloqueador está presente y 3 representa el momento en el cual se añadió NT-4/5 en presencia del bloqueador, los números corresponden con los del esquema B) en el que se observa el curso temporal del experimento. ($p<0.05$, $n=6$, Prom + SEM)

este efecto resultó de particular interés por que no había sido reportado y aunque no existieron diferencias significativas (bloqueador= $105.979 \pm 11.28\%$ vs NT-4/5= $62.83 \pm 16.626\%$) a causa de la variabilidad de los experimentos, la tendencia de la respuesta

a la NT-4/5 fue decrementar la amplitud poblacional como se nota en la Fig. 17B. Además, no hubo diferencias significativas entre control y neurotrofina (control= $100 \pm 0.003\%$ vs NT-4/5= $62.83 \pm 16.626\%$).

El efecto de las neurotrofinas depende del orden de aplicación

Después de analizar los efectos de las neurotrofinas por separado y en presencia del bloqueador, decidimos evaluar los efectos de las neurotrofinas co-administradas en rebanadas cerebrales de ratón tratado con 3-NP, después del registro control se adicionó la NT-4/5 (50ng/ml), permaneciendo en el baño más de treinta minutos, de los cuales se grabaron los veinte últimos, como se puede apreciar en la Fig.18

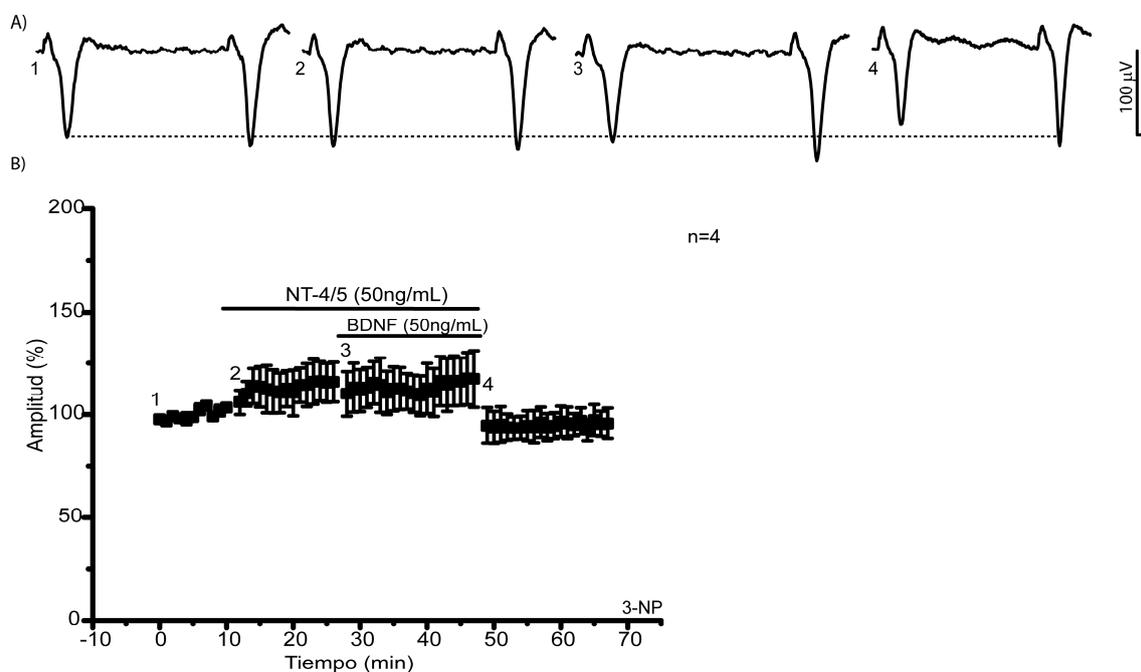


Figura 18: El BDNF no modifica el efecto evocado por la NT-4/5. En A) se observa los trazos representativos pertenecientes a cuatro condiciones distintas durante el experimento, el número 1 pertenece al trazo que se obtuvo de la condición control, 2 representa el trazo en el cuál la NT-4/5 está presente, 3 representa el momento en el cual se añadió BDNF en presencia de la neurotrofina y el 4 representa el momento en el que se lavaron las neurotrofinas, los números corresponden con los del esquema B) en el que se observa el curso temporal del experimento. ($p < 0.05$, $n = 4$, Prom + SEM)

la amplitud de la espiga en el curso temporal tanto como en los trazos representativos incrementa al añadir la neurotrofina, este efecto se mantiene durante el tiempo, sin ser significativo (control= $100 \pm 0.005\%$ vs NT-4/5= $112.77 \pm 9.28\%$), después de haber observado el efecto de la NT-4/5 se agregó el BDNF (50ng/ml) y se dejó en el baño

por más de treinta minutos, se grabaron los últimos veinte minutos, en los que el efecto de la NT-4/5 se mantuvo en el tiempo aún después de haber añadido el BDNF ver Fig. 18B números 2 y 3, entre estas dos condiciones no hubo cambios significativos (NT-4/5=112.77 ± 9.28% vs NT-4/5+BDNF= 113.22 ± 11.18%). Al final del experimento se quitaron las neurotrofinas del medio haciendo pasar la solución fisiológica en la cámara de registro en el cual, al lavar el efecto de las neurotrofinas, esta pareció regresar a la condición control (control=100 ± 0.005% vs lavado=94.84 ± 6.78%) se notó además que al lavar las neurotrofinas del medio la variabilidad del experimento es menor en comparación con la variabilidad de otras condiciones.

Por otro lado, observamos el efecto de la NT-4/5 (50ng/ml) en presencia de BDNF (50ng/ml), en estos experimentos notamos que al aplicar el BDNF no hubo efecto y el tiempo que este permaneció en el baño esta amplitud no cambio permaneciendo al nivel del control. Fig. 19). Esto se puede observar mejor en el curso temporal (control=100.271 ± 1.811% vs BDNF=93.531 ± 1.195%), sin embargo, al aplicar la NT-4/5 en presencia del BDNF se observó un incremento en la amplitud, el cual no fue significativo (BDNF=93.531 ± 1.195% vs BDNF+NT-4/5= 93.380 ± 1.198%) pero resulto un dato interesante que nos pudiera indicar que el NT-4/5 estaría respondiendo de forma distinta, finalmente al lavar el efecto de las neurotrofinas se pudo apreciar que la amplitud disminuyó y tuvimos mayor variabilidad en la respuesta poblacional respecto a la del control (control=100.271 ± 1.81158% vs lavado=86.572 ± 1.175%) contrario de la condición anterior, entre el control y el lavado en la que pudimos observar había menor variabilidad en la respuesta.

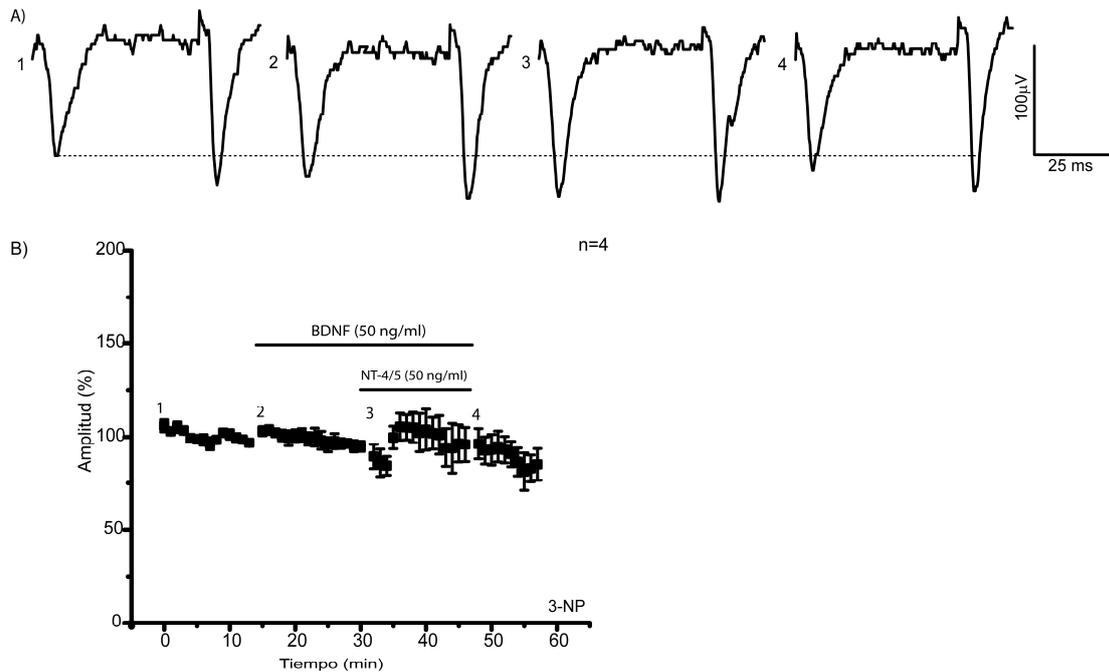


Figura 19: El BDNF no tiene efecto y la NT-4/5 incrementa la actividad poblacional en presencia de este en rebanadas cerebrales de ratón 3NP. En A) se observa los trazos representativos pertenecientes a las 4 condiciones durante el experimento, el número 1 pertenece al trazo que se obtuvo de la condición control, 2 representa el trazo en el cuál se añadió BDNF, el 3 representa el momento en el cual se añadió NT-4/5 en presencia de BDNF y el 4 representa al lavado, los números corresponden con los del esquema B) en el que se observa el curso temporal del experimento. ($p < 0.05$, $n = 4$, Prom + SEM)

La respuesta a la coadministración de neurotrofinas en presencia del bloqueador es similar a la observada en el modelo de 3-NP

Después de haber observado los efectos de las neurotrofinas co-administradas en el modelo de neurodegeneración, en las rebanadas cerebrales de ratones control no teníamos el antecedente del efecto de esta coadministración en presencia del U73122 por lo que procedimos a averiguar si las neurotrofinas eran capaces de tener un efecto después de añadir el bloqueador y haber observado previamente el efecto de una de estas, con la finalidad de observar si estos efectos eran parecidos a los obtenidos en las rebanadas de ratones tratados con 3-NP.

En la Fig. 20 podemos observar que el BDNF no muestra efecto en presencia del bloqueador, después de haber observado el efecto de la NT-4/5, estos resultados fueron interesantes debido a que como ya ha sido reportado no se obtuvieron efectos tan notorios en la aplicación de las neurotrofinas y al comparar la respuesta de la NT-4/5 con el control (control = $100 \pm 1.49e-5\%$ vs NT-4/5 = $104.782 \pm 4.791\%$) el incremento no fue significativo.

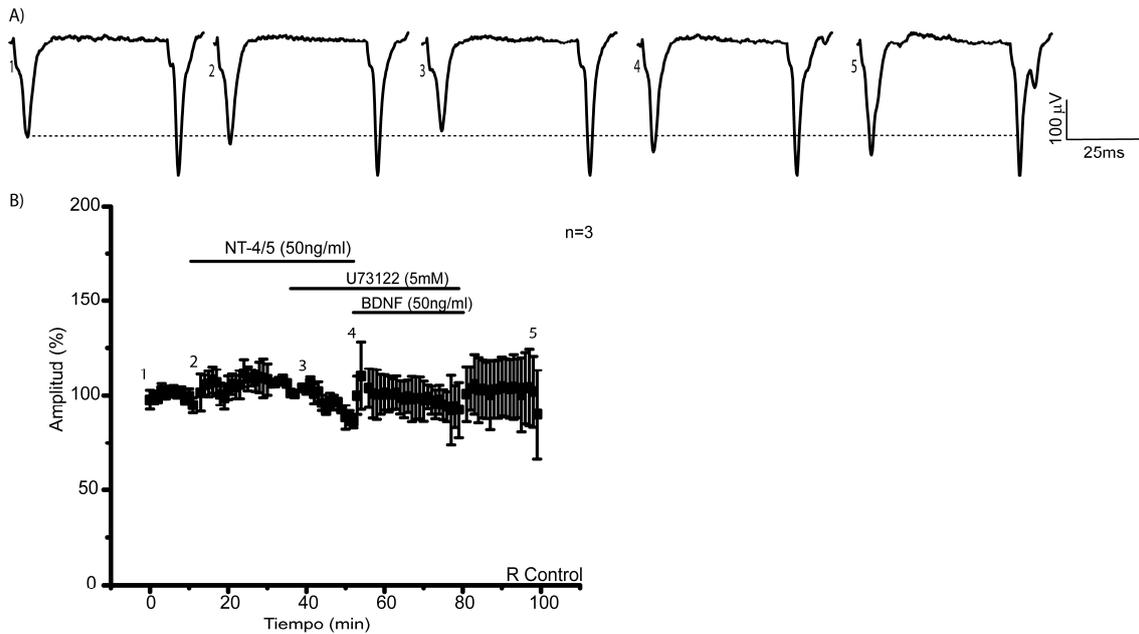


Figura 20: El BDNF aún en presencia del bloqueador no modifica el efecto evocado por la NT-4/5. En A) se observa los trazos representativos pertenecientes a cinco condiciones distintas durante el experimento, el número 1 pertenece al trazo que se obtuvo de la condición control, 2 representa el trazo en el cuál se observa el efecto de la NT-4/5, el 3 representa el momento en el cual se añadió el bloqueador en presencia de la NT-4/5, el 4 representa el momento en que se añadió el BDNF en presencia del bloqueador y el 5 representa el lavado, los números corresponden con los del esquema B) en el que se observa el curso temporal del experimento. ($p < 0.05$, $n = 3$, Prom + SEM)

Posterior a la comparación de la neurotrofina cuando se aplicó el bloqueador tampoco resultó significativo (NT-4/5= $104.782 \pm 4.791\%$ vs NT-4/5+ Bloqueador= $97.729 \pm 2.388\%$). Un dato interesante es que después de haber aplicado el bloqueador, el BDNF incrementó la respuesta, sin embargo, este incremento no fue significativo respecto de los otros estados como tampoco lo fue al compararlo con el control (control= $100 \pm 1.49e-5\%$ vs BDNF= $97.969 \pm 9.132\%$, Bloqueador= $97.729 \pm 2.388\%$ vs BDNF= $97.969 \pm 9.132\%$). Sin embargo, como se puede notar en el curso temporal de la Figura 20B después de haber aplicado el BDNF durante el lavado incremento la amplitud de la espiga poblacional, aunque este incremento no resulta significativo (BDNF= $97.969 \pm 9.132\%$ vs lavado= 103.101 ± 16.441) la tendencia es a incrementar y existe una variabilidad mucho mayor.

Una vez realizados los experimentos anteriores se observó el efecto de la NT-4/5 en presencia del bloqueador después de haber observado el efecto del BDNF, en estos experimentos al igual que en el experimento anterior se obtuvieron resultados diferentes a los esperados ya que no se observó la modulación reportada por (Ruelas,

2008; Moran 2013 y Mendoza et al., 2014), sin embargo, en al menos tres experimentos de cinco si se observó un incremento; (control=99.587 ± 1.790% vs BDNF=104.575 ± 4.799%).

Posteriormente al aplicar el bloqueador en presencia del BDNF hubo un decremento, sin ser significativo al ser comparado con la condición anterior (BDNF=104.575 ± 4.799% vs BDNF + Bloqueador= 93.090 ± 1.784), al observar el efecto del bloqueador se añadió la NT4/5, la cual como se observa en la Fig. 21A, trazo 4 y además en el curso temporal de la Fig. 21B decremento de manera visible en un 30% respecto del control y fue significativo ($H_4 = 18.846$ $P < 0.001$, con la prueba de Dunn's $q = 3.180$ $P < 0.05$) como lo observamos en la Fig. 18 en la cual estaba en presencia del bloqueador.

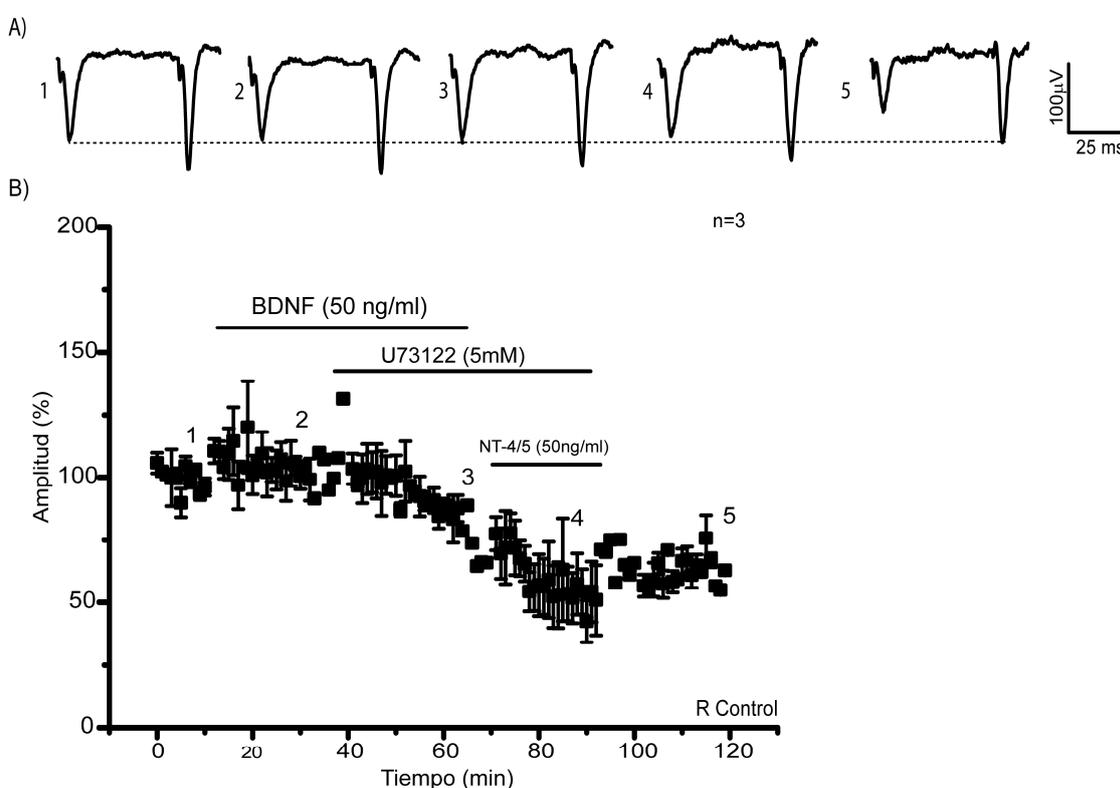


Figura 21: La NT-4/5 aún en presencia del bloqueador y el BDNF decremanta la amplitud.. En A) se observa los trazos representativos pertenecientes a cinco condiciones distintas durante el experimento, el número 1 pertenece al trazo que se obtuvo de la condición control, 2 representa el trazo en el cuál se observa el efecto del BDNF, el 3 representa el momento en el cual se añadió el bloqueador en presencia del BDNF, el 4 representa el momento en que se añadió la NT-4/5 en presencia del bloqueador y el 5 representa el lavado, los números corresponden con los del esquema B) en el que se observa el curso temporal del experimento. ($p < 0.05$, $n = 3$, Prom + SEM).

Al final del experimento lo que se hizo fue realizar un lavado con solución fisiológica, como se puede apreciar en el trazo 5 la respuesta pareció incrementar y estabilizarse durante los 15 minutos que esta fue grabada. Aunque este incremento no es lo

suficientemente evidente como para regresar al estado control, no resulta significativo al compararlo con el estado anterior NT-4/5= $60.093 \pm 8.456\%$ vs lavado= $62.640 \pm 1.698\%$) pero si es diferente significativamente al compararlo con el control ($H_4=18.846$ $P = <0.001$, con la prueba de Dunn's $q=3.955$ $P=<0.05$).

Expresión diferencial de los residuos de tirosina en PLC- γ 1 y 2 en presencia de la NT-4/5 y BDNF en control.

Después de haber realizado los registros electrofisiológicos quisimos averiguar cuáles eran los residuos implicados en la activación de la vía ya que los resultados nos indicaban que la PLC- γ 1 participa en los efectos moduladores de las neurotrofinas. Los experimentos de Western Blot se realizaron por triplicado, cada carril se cargó 30 mg/mL de proteína y se evaluó la expresión del residuo fosforilado de tirosina Y783 para PLC- γ 1 y Y759 para PLC- γ 2 en presencia de bicuculina (10 μ M), BDNF (50 ng/mL), NT-4/5 en presencia de BDNF (50 ng/mL cada una), la NT4-5 (50 ng/mL) y el BDNF en presencia de la NT-4/5 (50ng/mL). Como se muestra en la Figura 22A al lado izquierdo se muestra el residuo 783, debajo la PLC- γ 1 total y del lado derecho se encuentra el residuo 759 así como la PLC- γ 2 total respectivamente.

Se puede apreciar que el nivel de expresión de Y783 es bajo con la bicuculina respecto de la expresión del residuo Y759, sin embargo, al compararlos no se encontraron diferencias entre ellos como se aprecia en la Figura 22B. En la misma figura mostramos que el patrón de expresión del residuo de Y783 de PLC- γ 1 aumentó en presencia de la NT-4/5 mientras que con el residuo de Y759 de PLC- γ 2 disminuyo, al compararlos entre ellos encontramos diferencias significativas ($t_2 = 9.295$; $P = 0.011$). Por otro lado al comparar la expresión del residuo de Y783 de PLC- γ 1 entre las demás condiciones en las que se administraron las neurotrofinas, se observó que la expresión de la NT-4/5 fue diferente al compararla con la bicuculina (bicuculina= 1.0 vs NT-4/5= 4.861 ± 0.554 ; con una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey $q= 7.213$; $P=0.003$ con un nivel de significancia <0.05) así como también encontramos diferencias entre el BDNF y la NT-4/5 (BDNF= 1.258 ± 0.138 vs NT-4/5= 4.861 ± 0.554 , con una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey $q= 6.731$, $P= 0.005$ con un nivel de significancia <0.05).

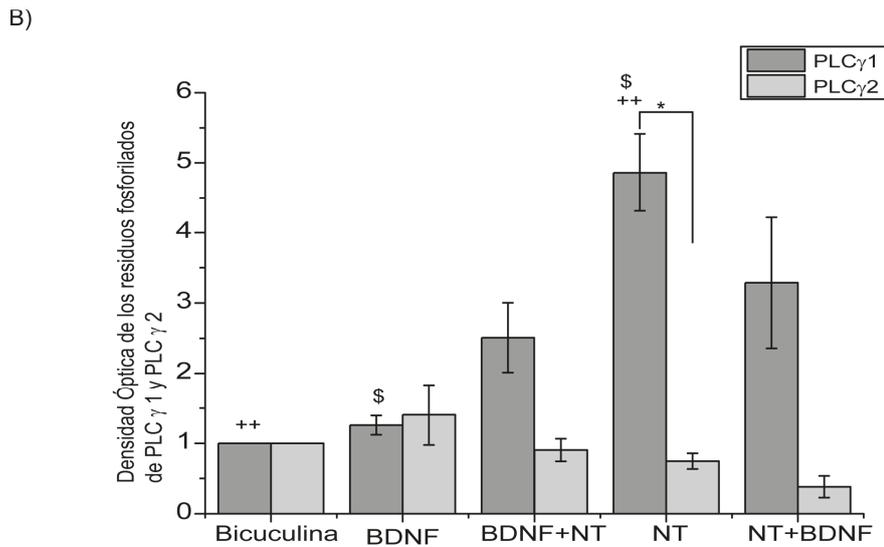
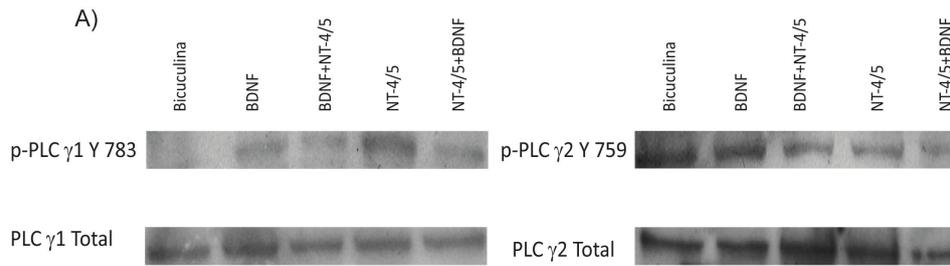


Figura 22. Expresión diferencial de los residuos de tirosina en PLC- γ 1 y PLC- γ 2 en presencia de BDFN y la NT-4/5 en control. En A) lado izquierdo se observa la expresión diferencial del residuo de tirosina 783 de PLC- γ 1, el cual incremento en presencia de la NT-4/5 y NT-4/5+BDNF. Del lado derecho se observa el residuo de tirosina 759 de PLC- γ 2 en la cual no se observa este comportamiento, en ella es la condición con bicuculina y BDNF en la que el nivel de expresión es mayor, mientras que en las demás condiciones se observa una disminución en la expresión. En B) se muestra el análisis en el que podemos observar la relación que existe entre los residuos fosforilados de PLC- γ 1 y PLC- γ 2. Se observa que hay diferencias significativas entre la expresión de p-Y783 y p-Y759 en presencia de la NT-4/5 representado con *, además, existen diferencias en la expresión del residuo p-Y783 de PLC- γ 1 entre la bicuculina y la NT-4/5 representado con (++) así como el BDNF respecto de la NT-4/5 se muestra con (\$; $p < 0.05$, $n = 3$, prom + SEM).

Discusión

En los experimentos de este trabajo se aprecia el daño ocasionado por el 3-NP en la comunicación cortico-estriatal, asimismo se observa que el efecto del bloqueador de la vía de PLC- γ 1 es calcio dependiente y que la coadministración de neurotrofinas BDNF y NT-4/5 en presencia de bloqueador de la vía de PLC- γ 1 muestran respuestas distintas además de cómo esta vía participa en la señalización de estas neurotrofinas

de manera diferencial en la actividad sináptica del estriado y observamos efectos contrarios a los reportados en la activación *in vitro* de las aferentes corticales moduladas por administración de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 en rebanadas de ratones control. A continuación, se discuten estos resultados.

El 3-NP modifica la respuesta poblacional sináptica S1

Como mencionamos anteriormente el efecto del 3-NP repercute en las respuestas sinápticas poblacionales. Como vimos (Fig. 12) es más difícil evocar una respuesta poblacional sináptica en las rebanadas de ratones tratados, probablemente debido a la desconexión aparente entre las fibras corticales y el estriado, ya que hay una reducción del volumen en la arborización dendrítica (Mendoza et al., 2014). Se conoce además que existe daño celular en las neuronas (necrosis y apoptosis; Deshpande et al., 2006; Hernández-Echeagaray, 2010; Rodríguez et al., 2010) y los astrocitos (Nishino et al., 1997). Este daño celular se observa tanto en los pacientes con la EH (Bard et al., 2014) como en nuestro modelo de 3-NP (Brouillet et al., 1999). En la EH se ha encontrado un aumento en el ácido láctico cerebral, así como un decremento de la actividad de la succinato deshidrogenasa que conlleva una inestabilidad energética, agotándose los reservorios de ATP, lo que despolariza a la membrana neuronal, y libera el Mg^{2+} que en condiciones normales bloquean los receptores NMDA. Esto produce la entrada exacerbada de Ca^{2+} y por tanto daño neuronal a través de mecanismos excitotóxicos (Beal et al., 1993; Gu et al., 1996).

En nuestro modelo con 3-NP se han encontrado alteraciones mitocondriales que conllevan a déficits energéticos los cuales a su vez desencadenan el cambio en el potencial de membrana y la despolarización que induce el desbloqueo de NMDAR, estos mecanismos expresados en el modelo de 3-NP producen una inhibición del complejo II mitocondrial y causan un desbalance en la membrana y sus consecuencias antes descritas (Coles et al., 1979; Beal et al., 1993; Alston et al., 1977; Brouillet et al., 1999) además de muerte y apoptosis por inhibición de este complejo estos eventos combinados, la muerte de neuronas por excitotoxicidad y la activación de canales NMDA con la subunidad GluN2B que modulan a CREB podrían ser la posible causa de la reducción de la amplitud S1 en nuestros registros en rebanadas de animales tratados. Porqué en células en reposo normales el calcio intracelular es controlado principalmente por 3 mecanismos regulatorios: la bomba de calcio, la captura de calcio en los reservorios de calcio intracelulares y el intercambiador de calcio-sodio y debido a que son ATP dependientes y un desabasto en la producción energética incrementa

el calcio intracelular por lo que se observa la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} como las proteasas, fosfolipasas, cinasas o la óxido nítrico sintetasa (NOS; Deshpande et al., 2006) lo cual es un factor determinante en las modificaciones observadas en el modelo y puede explicar las afectaciones en la reducción de los potenciales sinápticos. Otra de las posibles razones de la vulnerabilidad del estriado al 3-NP son los distintos mecanismos que involucran a la toxicidad dopaminérgica, la vulnerabilidad de la arteria lateral estriatal o altos niveles de la actividad del transportador de glutamato en el estriado (Nishino et al., 1997; Deshpande et al., 2006). Ya que las lesiones aparecen principalmente en la parte lateral del estriado donde los receptores D2 están más concentrados.

El DMSO no afecta a la comunicación sináptica en rebanadas cerebrales control y en tratadas con 3NP

A pesar de que algunos procedimientos experimentales indican que la incubación con DMSO puede tener efectos adversos en el tejido neuronal debido a su naturaleza lipofílica a partir de concentraciones al 0.05% mientras que en concentraciones más elevadas induce diferenciación morfológica y modificaciones bioquímicas (Tamagini et al., 2014; Danon & Kaminsky, 1985). Se conoce además que el DMSO administrado vía intraperitoneal en ratones neonatos y jóvenes causaba apoptosis neuronal generalizada (Hanslick et al., 2009).

El DMSO puede tener efectos a concentraciones muy pequeñas en el metabolismo cerebral en condiciones in vitro, pero la actividad in vivo requiere de concentraciones altas para evocar respuestas biológicas (Jacob & de la Torre, 2009) de esta manera y como lo apreciamos en los registros electrofisiológicos, en este trabajo no observamos cambios en las espigas poblacionales en presencia de DMSO una ventana de tiempo que comprende hasta horas.

El bloqueador de PLC es calcio dependiente e interviene en la modulación de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 en rebanadas cerebrales de ratones 3NP

Los procedimientos experimentales que corresponden al bloqueador de la vía de PLC fueron planteados así debido a que se tiene reportado que activa directamente canales catiónicos (Na^+ y K^+), los cuales promueven la liberación de Ca^{2+} de los reservorios internos y potencia a su vez la liberación de Ca^{2+} mediada por Inositol (1, 4, 5 P_3) en células pancreáticas acinares de ratón (Mogami et al., 1997) una vez que los canales

han sido activados previamente. Estos reservorios internos de Ca^{2+} afectan indudablemente su señalización de manera que pudiera ser atribuido erróneamente a la inhibición de la PLC. En este trabajo en las figuras 16 y 17 el bloqueador presenta un incremento en las espigas sinápticas poblacionales que aunque no resultan significativas el incremento es apreciable, como ya lo reportó Moran, 2013. Si se compara con los registros electrofisiológicos en la solución de bajo calcio (Fig. 15) en presencia del bloqueador (U73122), no presenta este incremento en la amplitud y al quitarlo la amplitud de la espiga poblacional decrementa lo que puede ser atribuido a la viabilidad de la rebanada o a que el bloqueador disminuyó el Ca^{2+} intracelular. Un cambio en la disponibilidad de calcio explicaría el decremento en la amplitud, ya que la cantidad de calcio disponible es menor e impide que pueda haber más neurotransmisor liberado. Como MacMillan & McCamon observaron en 2010 en músculo liso intestinal en el que el U73122 más que bloquear la vía de PLC, lo que hace es vaciar el Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico a través del bloqueo de las bombas de Ca^{2+} y el incremento de la entrada de Ca^{2+} ; estos resultados sugieren que al vaciar el Ca^{2+} de los reservorios internos y la entrada de Ca^{2+} extracelular incrementaría la fusión de vesículas de neurotransmisor a la membrana lo que a su vez se vería reflejado en un incremento en la amplitud de la respuesta poblacional como se aprecia en las (Figuras 16 y 17), en las cuales el incremento en la amplitud que puede ser explicado por los efectos antes mencionados sin dejar de todo claro ¿por qué? decrementa la amplitud en los experimentos con la solución de bajo calcio. Por su parte el otro sustrato que procede de la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), DAG regula a la PKC, la cual es requerida para la activación de la vía de señalización MAPK y que se ha asociado con fenómenos de plasticidad sináptica. Se ha visto que la estimulación de TrkB por BDNF activa a PLC- γ y esta a su vez incrementa el Ca^{2+} intracelular, que activa a CaMKII y estimula la liberación de glutamato en cultivos de neuronas hipocámpales (Lessman & Heumann, 1998). Se ha visto también, que ratones con una mutación que hace a PLC- γ inoperante, produce severas deficiencias en la inducción de LTP (Minichiello *et al.*, 2002), lo que refleja la importancia de PLC- γ en diferentes formas de transmisión y plasticidad sináptica en distintas estructuras cerebrales.

Una particularidad de PLC- γ es que puede intervenir como enlace entre la señal de los receptores TrkB y los canales TRPC3 (Amaral & Pozzo-Miller, 2007). Este receptor entonces podría estar implicado en el incremento del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de las células neuronales (Chao, 2003) y posiblemente mediar algunos efectos implicados

en la transmisión sináptica por lo que se sugiere que en trabajos posteriores se revise la participación de este canal.

Además en las mismas figuras podemos observar que el BDNF y la NT-4/5 presentan efectos distintos al estar en presencia del bloqueador, en la figura 16 el efecto de BDNF se ve interrumpido por la inhibición de la vía; en el trazo como en el curso temporal de la misma figura observamos que el incremento de la amplitud al aplicar el BDNF en presencia del U73122 mantiene el efecto evocado por este lo que nos sugiere que el efecto del BDNF se ve afectado por los incrementos de Ca^{2+} o por la inhibición de la PLC- γ se ha mostrado que PLC- γ es necesaria para el efecto de BDNF, e interacciona con los receptores a cannabinoides CB1R (Zhao & Levine, 2014), esta interacción no requiere de la señalización de MAPK, PI3K o PKC pero si de PLC- γ . Por otro lado, la NT-4/5 decreta la amplitud de la espiga en presencia del bloqueador como lo observado en la Figura 17 lo cual nos pudiera sugerir que esta neurotrofina estaría respondiendo de forma distinta a los incrementos de Ca^{2+} generados por la aplicación del bloqueador de la vía de PLC- γ o que haya cambios conformacionales en los cuales la interacción que existe con el receptor de TrkB active otras cascadas de señalización (Gupta et al., 2013).

BDNF y NT-4/5 presentan efectos diferenciales que dependen del orden de aplicación en el modelo de 3-NP

Para reportar los efectos de la coadministración de las neurotrofinas trabajos en el laboratorio demuestran la expresión de las neurotrofinas en el núcleo estriado, indicando que BDNF y la NT-4/5 están presentes en el desarrollo de los ratones a la vida adulta y como la expresión de la NT-4/5 aumenta conforme pasa el tiempo (en particular a los 40 o 42 días postnatales, edades promedio en que fueron utilizados los ratones) mientras que BDNF disminuye (Zermeño *et al.*, 2009). Con este antecedente nos preguntamos ¿de qué manera se vería influenciada la modulación sináptica al aplicar las neurotrofinas de manera conjunta en rebanadas cerebrales de ratones tratados con la toxina 3-NP? (ver Figuras 18 y 19) observamos que la NT-4/5 incrementa la modulación como lo reporta (Morán, 2013), al coadministrar el BDNF en presencia del NT-4/5, no se modifica el efecto de la neurotrofina NT-4/5, de la misma forma que lo vimos con el bloqueador. Sin embargo, al hacerlo de forma contraria, al coadministrar el NT-4/5 en presencia de BDNF (ver Figura 19) el BDNF no presenta un efecto en la modulación como se ha reportado previamente en el laboratorio (Ruelas,

2008; Morán, 2013, Mendoza et al., 2014) mientras que al aplicar el NT-4/5 existe un incremento en la modulación. Estos resultados son de particular interés porque la neurotrofina no tuvo efecto y esto se puede deber a que los lotes de la neurotrofina adquiridos no eran activos o los mismos excedieron el tiempo de uso debido a que, en repetidos experimentos realizados en este proyecto, como en el de personal del laboratorio en los cuales BDNF fue utilizado no hubo efecto (datos no mostrados). Por otro lado, los efectos del NT-4/5 pueden deberse a que la neurotrofina está interactuando con una de las tres isoformas que se reportan para el receptor TrkB como lo observa (Eide *et al.*, 1996; Gupta et al., 2013) en el cual la expresión de alguno de los receptores tiene un efecto inhibitorio en la respuesta de BDNF, el cual, a su vez media la vía de PLC como en los ovocitos de *Xenopus*, o en el trabajo hecho por (Ardelt *et al.*, 1994) en el cual proponen que los efectos del NT-4/5 en rebanadas estriatales pudieran no estar actuando a través del receptor de TrkB o que pudiera ser una interacción distinta entre BDNF y TrkB.

Al co-administrar las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 en condiciones control (Figuras 20 y 21) fue de particular interés que BDNF incrementase la variabilidad de la respuesta poblacional sináptica después de observado el efecto de la NT-4/5 en conjunto con el bloqueador.

Por otro lado, el efecto de la NT-4/5 disminuyó la amplitud de la espiga poblacional en los experimentos en que se observó primero el efecto de BDNF en conjunto con el bloqueador, sin embargo, estos resultados son similares a aquellos en los que se observó el efecto de la neurotrofina en presencia del bloqueador, en ellas el BDNF conserva el efecto evocado en la condición anterior (Fig. 16), mientras que la NT-4/5 se observa que existe un decremento en la amplitud del mismo (Fig.17), este decremento pudiera deberse a que la neurotrofina está actuando de manera pro apoptótica y disminuye la viabilidad de las células ya que en este trabajo no descartamos la interacción con el receptor p75NTR, el cual como mencionamos con anterioridad está relacionado con señales de muerte celular a través de la interacción de las neurotrofinas con este mismo (Barde, 1989; 1994; Huang & Reichardt, 2003) o existe la posibilidad que el efecto de BDNF se viese decrementado como consecuencia de la disminución en la expresión del receptor TrkB (Mendoza et al., 2014).

Es por ello que aunque estas neurotrofinas tengan como blanco el mismo receptor, compartan una secuencia homológica cercana al 50% y la homología estructural al

60% (Travaglia et al., 2012) existe evidencia experimental que sugiere que los efectos de las neurotrofinas no son similares, aun cuando comparten todas estas características. Minichiello et al., 1998 encontró que ratones con una mutación en la expresión del receptor TrkB en el que intercambiaron una tirosina por una fenilalanina, fueron incapaces de mediar la supervivencia neuronal de neuronas dependientes de NT-4 mientras que las BDNF dependientes solo decrementaron un poco su supervivencia. Además, al utilizar neurotrofinas exógenas para estimular neuronas corticales de los TrkB mutantes, BDNF activó MAPK, ERK 1 y 2 en mayor cantidad de la que lo hizo la NT-4 lo cual indica que la respuesta generada por TrkB depende del ligando que se le une. En otro experimento el gen de BDNF fue remplazado por el NT-4 permitiendo la comparación de dos ligandos in vivo (Fan et al., 2000). Aunque los animales en los cuales BDNF fue reemplazado por la NT-4, los animales fueron viables, pero más pequeños y con problemas de fertilidad. Se muestra además que NT-4 fue más potente al inducir el gen c-fos por lo que estos tejidos de cultivo y exponentes animales indican que la naturaleza del ligando TrkB especifica las vías activadas y que la señalización dependiente de NT-4 es a través de moléculas SHC la cual interactúa con NPXpy.

Al existir diferencias en la respuesta de las neurotrofinas se puede explicar que al ser factores tróficos logran la especificidad en la respuesta no a través de la expresión de los receptores Trk en determinado tejido, sino por la combinación de múltiples rutas de señalización que ejecuten una función en concreto (Cross Talks). Por lo que se puede considerar que la misma neurotrofina actúa en la misma población neuronal, pero ejecuta efectos totalmente diferentes en escalas de tiempo distintas. Por ejemplo, se han visto diferencias funcionales en la transmisión sináptica de neuronas hipocámpales, si la aplicación de BDNF se hace de manera crónica o aguda; es decir, si el BDNF es aplicado crónicamente incrementa la amplitud, pero no la frecuencia de las corrientes sinápticas espontáneas; mientras que, si la aplicación es aguda, afecta solo la frecuencia de las corrientes espontáneas sin incrementar su amplitud (Sherwood & Lo, 1999). Puede ser también que poblaciones neuronales distintas respondan a la misma neurotrofina y como ejemplo es que el BDNF activa las vías de señalización MAPK y PI3K en neuronas del hipocampo, para prevenir la fatiga sináptica inducida por un tren de alta frecuencia (Gottschalk et al., 1999) mientras que en neuronas piramidales de la corteza somatosensorial activa PLC- γ , pero no MAPK, PKC y PI3K (Zhao & Levine, 2014). O por otro lado puede ser que diferentes neurotrofinas ejecuten el mismo efecto biológico a través de diferentes mecanismos de señalización. Por ejemplo, el BDNF y la NT-3 producen la atracción del cono de crecimiento axonal en motoneuronas en desarrollo. Sin embargo, los efectos del BDNF

en esta función requieren del influjo de Ca^{2+} y dependen de cAMP; mientras que el efecto de NT-3 requiere de cGMP y es independiente del Ca^{2+} extracelular (Song et al., 1998). Finalmente, las respuestas a las neurotrofinas dependen del tejido o la célula blanco y esto se debe a la especificidad de cada una de ellas (Travaglia et al., 2012).

Expresión diferencial de los residuos de tirosina en PLC- γ 1 y PLC- γ 2 en presencia de la NT-4/5 y BDNF.

En los experimentos realizados observamos el aumento del residuo de tirosina (Y) 783 de PLC- γ 1 en presencia de la NT-4/5 (ver Fig. 22A), en BDNF el aumento fue menor y en el control la expresión es mínima, sin embargo, el comportamiento que tiene PLC- γ 2 fue distinto ya que en el residuo de tirosina 759 disminuye con excepción del control y BDNF, los cuales permanecen constantes. Por lo que pensamos que en el caso de PLC- γ 1 la NT-4/5 tiene una actividad mayor en el residuo Y 783, lo cual explicaría que al existir una actividad mayor en este residuo, en los experimentos en los que se coadministró la NT-4/5 impediría al BDNF actuar, por lo que esos decrementos en la amplitud en los experimentos electrofisiológicos al aplicar el NT-4/5 estarían dados a partir de la interacción con este residuo y el BDNF, que aunque observamos que hay interacción con el residuo se tienen que hacer estudios posteriores para conocer como es la interacción con esta neurotrofina. Además en este trabajo demostramos que la PLC- γ 2 participaría en la actividad de BDNF en el residuo Y 759 y que la actividad con la NT-4/5 en el mismo residuo es menor.

Las interacciones reguladoras de los diferentes tipos de PLC son mediadas a través de receptores tirosina cinasa o receptores no asociados a esta. PLC- γ 1 y PLC- γ 2 comparten dominios estructurales comunes y las secuencias de aminoácidos son 50% idénticas, es razonable aseverar que los mecanismos de activación entre estas dos isoformas es similar (Seyika et al., 1999). La estimulación de PLC-g 1 ha sido asociada a los receptores de factores de crecimiento, los cuales tienen actividad tirosina cinasa y aunque la actividad de PLC- γ 2 también depende de tirosinas cinasas la expresión de esta, está más relacionada a células hematopoyéticas (Seyika et al., 1999; Watanabe et al, 2001), en este trabajo pudimos observar que PLC- γ 2 en el residuo Y759 participa en el estriado e interactúa con el control con bicuculina y el BDNF (ver Fig. 22A).

Tras la estimulación de alguna de las dos isoformas, los dominios citoplasmáticos de los receptores a factores de crecimiento se autofosforilan en residuos de tirosina, este proceso crea sitios de unión a fosfotirosina para dominios PLC- γ 1-SH2 (Src homology 2), lo que resulta en la interacción de PLC- γ 1 con el receptor de factor de crecimiento y la posterior fosforilación de PLC. Estudios in vivo e in vitro con el EGF (factor de crecimiento epidermal) demuestran que la interacción se lleva a cabo a través de los residuos de tirosina en las posiciones 771, 783 y 1254 (Kim et al., 1991). Así como la importancia de estos residuos en células NIH/3T3 para el funcionamiento de PLC- γ 1. Además ha sido propuesto que los receptores no asociados a tirosina cinasa fosforilan los receptores o adaptadores de proteínas en residuos de tirosina para generar un vínculo con PLC a través de proteínas G o a través de la activación indirecta de PLC al incrementar el PIP₂ liberado por la PI3K (Kim et al 1991) por lo que con las interacciones y respuestas biológicas mostradas en el presente trabajo no descartan la interacción con otras vías a través de cross talks.

La PLC- γ 1 es la única fosfolipasa C regulada por tirosina cinasa que se expresa ampliamente en el cerebro y sirve a diferentes roles funcionales como el crecimiento neurítico, la inducción y mantenimiento de la plasticidad sináptica en ciertas áreas cerebrales así como el rol que desempeña en el desarrollo embrionario (Schuman, 1999; Reichardt, 2006; Wolf et al, 2007) y forma parte de un mecanismo de transducción de señales activada por factores tróficos para realizar estas funciones (Wolf et al, 2007). En cuanto a la PLC- γ 2 poco ha sido descrito en su interacción en el SN por lo que se propone profundizar el estudio de esta isoforma y las interacciones que tiene con los receptores tirosina cinasa.

La PLC- γ 1 se encarga del metabolismo de PIP₂ y lo convierte en IP₃ y DAG. La hidrólisis del fosfolípido PIP₂ genera IP₃ y DAG. El IP₃ induce la liberación Ca²⁺ de los depósitos intracelulares aumentando la disponibilidad de Ca²⁺ citoplasmático que forma parte esencial para la activación de la PLC. El Ca²⁺⁺ además interacciona con otras vías de señalización, regula la activación de isoformas de PKC (Proteína cinasa C) y la proteína CaMKII (Ca²⁺/Calmodulina proteína cinasa II; Poulin et al., 2005).

Los dos dominios continuos de SH2, uno amino terminal (NH₂) y otro carboxilo terminal (COOH), la primera media la unión de PLC- γ 1 al receptor proteína tirosina cinasas el cual activa la PLC- γ 1 fosforilándose en Y 783, se conoce que este residuo fosforilado se asocia con el dominio COOH terminal SH2 dentro de la misma molécula de PLC- γ 1. Poulin et al., 2005 demostraron con varios experimentos que la interacción del

carboxilo terminal como el amino participan en la interacción del residuo fosforilado para la activación de la PLC- γ 1 ya que la mutación del carboxilo pero no la del amino expone el residuo fosforilado Y 783 y lo hace disponible para la unión de anticuerpos y para la defosforilación a través de fosfatasas, sin que existan modificaciones metabólicas como la producción de PIP₂. La interacción intramolecular entre el residuo fosforilado de Y 783 y COOH-SH2 induce al reordenamiento de la carga superficial y activación de la PLC. Estas moléculas entonces modulan la actividad de proteínas cascada abajo en la señalización celular de gran importancia, que terminan alterando las respuestas celulares. Con base en los experimentos e interacciones químicas anteriormente descritos, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con que la activación de la PLC- γ 1 se lleva a cabo a través de los residuos de tirosina 783 para la PLC gamma 1 y para la activación de la PLC- γ 2 el residuo tirosina 759 a través de la interacción de receptores tirosina cinasa, para este caso dado que ambas neurotrofinas actúan a través del TRK B, se propone que es a través de esta interacción.

Conclusiones

En este trabajo observamos que el DMSO no afecta las respuestas poblacionales sinápticas en condiciones control, ni en 3-NP.

El bloqueador de la vía PLC- γ (U73122) depende de calcio e interfiere en la modulación sináptica de NT-4/5 por lo que la vía de PLC- γ 1 juega un rol importante en la modulación de las neurotrofinas en el estriado.

La modulación sináptica decremента al aplicar NT-4/5 en presencia del bloqueador de PLC.

La expresión del residuo Y 783 interviene en la activación de PLC- γ 1 en presencia de la NT-4/5 y BDNF.

Bibliografía

- Abril Carreres M A, Ticó Falguera N, Garreta Figuera R. 2004. Enfermedades neurodegenerativas. Servicio de Rehabilitación. Hospital Mútua de Terrassa; 38(6): 318–324.
- Alston T A, Mela L, & Bright H J. 1977. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci*. 74: 3767-3771.
- Altar CA & DiStefano PS. 1998. Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends in neurosciences*. 21(10); 433-437.
- Amaral M D, & Pozzo-Miller L. 2007. BDNF induces calcium elevations associated with BDNF, a nonselective cationic current mediated by TRPC channels. *Journal of neurophysiology*. 98(4); 2476-2482.
- Ardelt A A, Flaris A N y Roth K A. 1994. Neurotrophin-4 selectively promotes survival of striatal neurons in organotypic slice culture. Washington. *Brain Research*; 647; 340-344.
- Avila-Luna A. & Bueno-Nava A. 2014. Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal. México. *Investigación en Discapacidad*. 68(1); 19-24.
- Azzarelli A. 2000. Enfermedad de Huntington y degeneraciones de algunos núcleos subcorticales. En: *Neuropatología, diagnóstico y clínica*. Barcelona: Editorial Edisma; p. 603-20.
- Bard J, Wall D M, Lazari O, Arjomand J and Munoz-Sanjuan I. 2014. Advances in Huntington Disease Drug Discovery: Novel Approaches to Model Disease Phenotypes. USA. *Journal of Biomolecular Screening*; 19(2); 191-204.
- Barde Y-A. 1989. Trophic factors and neuronal survival. Federal Republic of Germany. *Cell Press*; 2; 1525-1534.
- Barde Y-A. 1994. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog. Clin. Biol. Res*; 390:45-56.
- Bargas J & Galarraga E. 2008. Transmisión sináptica En: *Biología funcional de los animales V. 2. Siglo XXI*; 2 ed. México. 86-139.
- Bargas J, Galarraga E & Aceves J. 1990. Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. Mexico. *Brain Research*. 539; 159-163.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J. 1998. Los ganglios basales. En: *Fisiología. Células, órganos y sistemas*. Martínez-Muñoz E J, García X. FCE. México. 5(X.13); 257-273; 149-165.
- Beal M, Brouillet E, Jenkins G B, Ferrante J R, Kowall W N, Miller J, Storey Elsdon, Srivastava R, Rosen R B & Hyman T B. 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci*. 13; 4181-4192.
- Berchtold N-C. et al. 2002. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. *J. Neurosci Res*; 68: 511-521.
- Bolam P J, Brown CTM, Moss J & Magill J. 2009. *Basal Ganglia: Internal Organization*. Oxford. *MRC Anatomical Neuropharmacology*. 2; 97-104.
- Boulanger L, & Poo M M. 1999. Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nature neuroscience*, 2(4); 346-351.
- Brouillet E, Condé F, Beal M F & Hantraye P. 1999. Replicating Huntingtos's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology*. 59: 427-468.
- Browne S E, Ferrante R J & Beal M F. 1999. Oxidative stress in Huntington's Disease. En: *Symposium: Oxidative stress in neurological disease*. *Brain Pathology*. 9: 147-163.
- Camacho A-M. 1997. Las Neurotrofinas. *Salud mental V*; 20(2): 55-59.

- 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(1); 153-164.
- Cepeda C, Hurst S R, Calvert R C, Hernández-Echeagaray E, Nguyen N O, Jocoy E, Christian J L, Ariano A M & Levine S M. 2003. Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's Disease. *The journal of neuroscience*. 23(3); 961-969.
- Cepeda C, Wu N, André V M, Cummings D M & Levine M S. 2007. The corticostriatal pathway in Huntington's Disease. *Prog. Neurobiol*. 81: 253-271.
- Chao V M. 2003. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signaling pathways. *New York. Nature Reviews Neuroscience*; 4; 299-309.
- Cherubini E. 2010. Transmisión Sináptica, En: *Fisiología Médica*. Conti F. McGraw Hill. 146-159.
- Coles J C, Edmondson E D & Singer P T. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-Nitropropionate*. *The journal of biological chemistry*. 254(12); 5161-5167.
- Crittenden R J & Graybiel M A. 2011. Basal Ganglia Disorders Associated with Imbalances in the Striatal Striosome and Matrix Compartments. *Frontiers in Neuroanatomy*. 68 (5); 1-25.
- Danon Y L & Kaminsky E. 1985. Dimethyl sulfoxide-induced differentiation does not alter tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*. 3; 43-57.
- Davies A M. 1994. The role of neurotrophins in the developing nervous system. *United Kingdom. J Neurobiol*; 25(11); 1334-1348.
- DeLong R M. & Wichman T. 2007. Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia. *Arch Neurol*. 68; 20-24.
- Deshpande B S, Hida H, Takei-lo N, Masuda T, Baba H, Nishino H. 2006. Involvement of nitric oxide in 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity in rats. *Brain Research*; 205-215.
- Eide F F, Vining R E, Eide L B, Zang K, Wang Xiao-Yun y Reichardt L F. 1996. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on Brani-Derived Neurotrophic Factor signaling. *California. The Journal of Neuroscience*; 16 (10); 3123-3129.
- Espíndola S, Vilches-Flores A, Hernández-Echeagaray E. 2012. 3-Nitropropionic acid modifies neurotrophin mRNA expression in the mouse striatum: 18S-rRNA is a reliable control gene for studies of the striatum. *México. Neuroscience Bulletin*; 28(5); 517-531.
- Fernández-Chacón R. 2007. La maquinaria molecular de las sinapsis. En: *Unidad Didáctica: Viaje al universo neuronal*. Dierssen M. Fundación Española de Ciencia y Tecnología. 277p.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Barral J & Bargas J. 1997. Domapine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca²⁺ conductance. *Mexico. Neuroreport*. 8; 2183-2186.
- Gottschalk W A, Jiang H, Tartaglia N, Feng L, Figurov A, & Lu B. 1999. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *Learning & memory*. 6(3); 243-256.
- Gu M, Gash M T, Mann V M. 1995. Mitochondrial defect in Huntington's Disease caudate nucleus. *Ann Neurol*. 39; 385-389.
- Gupta V K., You Y., Gupta V B., Klistorner A y Graham ST. 2013. TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Pshychiatric and Proliferative Disorders. *Int. J. Mol. Sci*; 14; 10123-10142.
- Hallböök F. 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Sweden. Elsevier Science Ltd*. 9; 616-621.
- Hanslick J L, Lau K, Noguchi K k, Olney J W, Zorumski C F, et al. 2009, Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central

- nervous system. *Neurobiol Dis.* 34; 1-10.
- 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. *Neurol Sci.* Springer-Verlag. DOI 10.1007/s10072-010-0394-2.
- Hernández-Echeagaray E. 2010. Advances in the neurobiology of Huntington's disease En: *The Neurobiological Sciences Applied to Psychiatry: From Genes, Proteins and Neurotransmitters to Behaviour.* India. Research Signpost. 43-65.
- Huang J E & Reichardt F L. 2003. TRK receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72; 609-642.
- Jacob W S & de la Torre C S. 2009. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacological Reports.* 61; 225-235.
- 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.
- Kafitz W K, Rose R Ch, Thoenen H & Konnerth. 1999. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature.* 401; 918-921.
- Kandel R E, Jessel M T & Schwartz H J. 1997. *Neurociencia y Conducta.* Ed Prentice Hall. Madrid 119-175.
- Kang H, Jia L Z, Suh K Y, Tang L, & Schuman EM. 1996. Determinants of BDNF-induced hippocampal synaptic plasticity: role of the Trk B receptor and the kinetics of neurotrophin delivery. *Learning & memory.* 3(2-3); 188-196.
- Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, Margolis B, Kim JG, Schlessinger J, and Rhee SG. 1991. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 65:435– 441.
- Koponen E, Lakso M, & Castrén E. 2004. Overexpression of the full-length neurotrophin receptor trkB regulates the expression of plasticity-related genes in mouse brain. *Molecular brain research.* 130(1); 81-94.
- Landless C, Bates G. 2004. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington disease. *EMBO;* 5:958-963.
- Lemus-Aguilar I, Vargas J, Tecuapetla F, Galárraga E, Carrillo-Reid L. 2006. Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas. México. *REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA;* 38(2): 82 – 92.
- 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(2); 399-413.
- Lessmann V, Gottmann K, & Heumann R. 1994. BDNF, and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport,* 6(1); 21-25.
- Levine E S, Crozier R A, Black I B, & Plummer M R. 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(17); 10235-10239.
- Levine E S, Dreyfus C F, Black I B, & Plummer M R. 1995. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proceedings of the national academy of sciences,* 92(17); 8074-8077.
- Levine E S, Dreyfus C F, Black I B, & Plummer M R. 1996. Selective role for trkB neurotrophin receptors in rapid modulation of hippocampal synaptic transmission. *Molecular brain research,* 38(2); 300-303.
- Li W., Li Y., Gao F.B. (2005). Abelson, enabled, and p120 catenin exert distinct effects on dendritic morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Dyn.* 234(3): 512-522.
- Lohof A M, Ip N Y, & Poo M M. 1993. Potentiation of developing neuromuscular

- synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*. 363; 350–353.
- Lucas JJ & Ortega Z. 2009. Modelos animales de enfermedades neurodegenerativas: ejemplo de la enfermedad de Huntington. *Anales Ranf*: 237-272.
- Luján R. 2004. Bases moleculares de la señalización neuronal. México. *Ciencia al día*. 5 (2); 1-19.
- MacMillan D & McCamon J G. 2010. The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca^{2+} release from intracellular sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} store by inhibiting Ca^{2+} pumps in smooth muscle. The British Pharmacological Society. *Journal of Pharmacology*; 160 1295-1301.
- Mattson Porth C. & Grossman S. 2014. *Fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos Básicos*. Wolters Kluwer. 9a ed. España; 382-390.
- Mendoza E, Miranda-Barrientos J A, Vázquez-Roque R A, Morales-Herrera E, Ruelas A, De la Rosa G, Flores G y Hernández-Echeagaray E. 2014. In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. México. *Neuroscience*; 280; 156-170.
- Minichiello L, Casagrande F, Tatche S R., Stucky L Ch, Postigo A, Lewin R G, Davies M A & Klein R. 1998. Point mutation in *trkB* causes loss of NT4-dependent neurons without major effects on diverse BDNF responses. *Neuron*. 3; 335-345.
- Mogami H, Mills LI C and Gallacher V D. 1997. Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca^{2+} , potentiates ins (1,4,5) P3-mediated Ca^{2+} release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. Great Britain. *Biochem J*; 324; 645-651.
- Montalcini-Levi R. 1987. Nerve growth factor in serum: evaluation of serum NGF levels with a sensitive bioassay employing embryonic sensory neurons. Italy. *J Neurosci Res*; 17 (1); 25-35.
- Morán Martínez I. 2013. Participación de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 en la modulación de la comunicación sináptica cortico-estriatal. Tesis de Licenciatura. Laboratorio de neurofisiología del desarrollo y la neurodegeneración. FES Iztacala. UNAM.
- Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande B S, Shimizu H, Morikawa S, Inubushi T. 1997. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brainbarrier: involvement of dopamine toxicity. *Neuroscience Research*. 27; 343-355.
- Numakawa T, Yamagishi S, Adachi N, Matsumoto T, Yokomaku D, Yamada M, & Hatanaka H. 2002. Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of Ca^{2+} oscillations in developing cortical neurons. *Journal of biological chemistry*. 277(8); 6520-6529.
- Poo M M. 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature reviews neuroscience*. 2(1); 24-32.
- Poulin B, Sekiya F & Rhee GS. 2005. Intramolecular interaction between phosphorylated tyrosine-783 and the C-terminal Src homology 2 domain activates phospholipase C- g 1. *PNAS*; 102 (12); 4276 – 4281.
- Purves D, Augustine G J, Fitzpatrick D, Hall W C, LaMantia A, McNamara J O & Williams S M. 2004. *Neuroscience*. 3Ra ed. USA: Sinauer Associates.
- Ravina B, Romer M, Constantinescu R. 2008. The relationship between CAG repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Mov Disord*; 23:1223–1227.
- Reichardt L F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological sciences*. 361(1473); 1545-1564.
- Rodríguez E, Rivera I, Astorga S, Mendoza 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. México. *Int J Biol Sci*; 6(3): 199–212.
- Roehrs C, Garrido-Sanabria ER, Da Silva AC, Fariol LC, Sinhorin VD, Marques RH,

- Priel MR, Rubin MA, Cavalheiro EA, Mello CF. 2004. Succinate increases neuronal post-synaptic excitatory potentials in vitro and induces convulsive behavior through N-methyl-d-aspartate-mediated mechanisms. *Neuroscience*; 125(4): 965-971.
- Ruelas C A E. 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. FES Iztacala, UNAM. México.
- Ruelas C A E. 2010. 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. Tesis de Maestría. FES Iztacala, UNAM. México.
- Ruiz Liard A. & Latarjet M. 2012. Anatomía Humana. Ed Panamericana. 4Ta ed; 10^a reimp. Buenos Aires; 155-185.
- Schlösser B, Bruggencate ten G & Sutor B. 1999. Local Disinhibition of Neocortical Neuronal Circuits Causes Augmentation of Glutamatergic and GABAergic Synaptic Transmission in the Rat Neostriatum *in Vitro*. Mexico. *Experimental Neurology*. 157; 180-193.
- Schuman E M. 1999. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Current opinion in neurobiology*. 9(1); 105-109.
- Sekiya F, Bae YS & Rhee SG. 1999. Regulation of phospholipase C isozymes: activation of phospholipase C- γ in the absence of tyrosine-phosphorylation. *Chem. Phys. Lipids* 98, 3–11.
- Sherwood N T & Lo D C. 1999. Long-term enhancement of central synaptic transmission by chronic brain-derived neurotrophic factor treatment. *The journal of neuroscience*. 19(16); 7025-7036.
- Song H J, Ming G L, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M & Poo M M. 1998. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*. 281(5382);1515-1518.
- Suen PC, Wu K, Levine ES, Mount HT, Xu JL, Lin SY, & Black IB. 1997. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proceedings of the national academy of sciences*. 94(15); 8191-8195.
- Tamagnini F, Scullion S, Brown T J, Randall D A. 2014. Low concentrations of the solvent dimethyl sulphoxide alter intrinsic excitability properties of cortical and hippocampal pyramidal cells. *PIOS ONE*. 9(3); 1-12.
- Tasset I, Sánchez F, Túnez I. 2009. The molecular bases of Huntington's disease: the role played by oxidative stress. *Rev Neurol*. 49(8); 424-429.
- Travaglia A. et al. 2012. The inorganic perspectives of neurotrophins and Alzheimer's disease. *Journal of Inorganic Biochemistry*; 111: 130–137.
- Tyler W J, & Pozzo-Miller L D. 2001. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *The Journal of neuroscience*, 21(12); 4249-4258.
- Velázquez P L, Rodríguez L R. 2012. Características generales de las enfermedades poliglutamínicas. En: Manifestaciones tempranas de la Ataxia espinocerebelosa tipo 2. Holguín: Ediciones Holguín; 11-32.
- Vergara F & Fonk L M. 1995. Introducción a la neurología: Las bases del examen clínico. Ed Universitaria; Chile; 96-98.
- Walker F O. 2007. Huntington's disease. *Lancet*; 369: 218-28.
- Wang X H, & Poo M M. 1997. Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. *Neuron*, 19(4); 825-835.
- Watanabe D, Hashimoto S, Ishiai M, Matsushita M, Baba Y, Kishimoto Y, Kurosaki T & Tsukada S. 2001. Four tyrosine residues in phospholipase C- γ 2, Identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B Cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *The journal of biological chemistry*; 276(42): 38595–38601.
- Wilson J Ch. 1998. Basal Ganglia. En: The Synaptic Organization of the Brain. Shepherd MG. New York. Oxford University Press; 329-375.

- Wolf HD, Nestler JE & Russel SD. 2007. Regulation of neuronal PLC β by chronic morphine. *Brain Res*; 1156: 9–20.
- Yoshii A & Constantine-Paton M. 2014. Postsynaptic localization of PSD-95 is regulated by all three pathways downstream of trkB signaling. *Frontiers in synaptic neuroscience*. 6(6); 1-7.
- Yuan C, Gao J, Bai L, Marshal C, Cai Z, Wang L & Xiao M. 2014. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *Plos One*. 9(9); 1-9.
- Zermeño V, Espindola S, Mendoza E y Hernández E. 2009. Differential expression of neurotrophins in postnatal C57BL/6 mice striatum. México. *International Journal of Biological Sciences*; 5(2); 118-127.
- Zhao L & Levine S E. 2014. BDNF-endocannabinoid interactions at neocortical inhibitory synapses require phospholipase C signaling. *J Neurophysiol*. 111; 1008-1015.