



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DEL POLIFENOL RESVERATROL SOBRE
LA RESPUESTA SINÁPTICA MODULADA POR LA
NEUROTROFINA BDNF EN UN MODELO DE
NEURODEGENERACIÓN ESTRIATAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

CITLALI BELEN BELLIDO VARGAS

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

ASESORA INTERNA:

Dra. María Esther Cruz Beltrán



Ciudad de México

Mayo, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DEL POLIFENOL RESVERATROL SOBRE
LA RESPUESTA SINÁPTICA MODULADA POR LA
NEUROTROFINA BDNF EN UN MODELO DE
NEURODEGENERACIÓN ESTRIATAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

CITLALI BELEN BELLIDO VARGAS

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

ASESORA INTERNA:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Tesis realizada en el Laboratorio de Neurofisiología del
desarrollo y la Neurodegeneración de la Unidad de
Biomedicina (UBIMED), Facultad de Estudios Superiores
Iztacala.

Beneficiario de la Beca PAPIIT (Clave del proyecto:
IN216515) y CONACYT (Clave del proyecto: 180660-2012).





UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **BELLIDO VARGAS CITLALI BELEN**, con número de cuenta **306077722**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **09 de mayo de 2017** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

VOCAL Dra. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY *Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray*

SECRETARIO Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

SUPLENTE M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

SUPLENTE Dra. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del polifenol resveratrol sobre la respuesta sináptica modulada por la neurotrofina BDNF en un modelo de neurodegeneración estriatal.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 06 de abril de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”
DIRECCIÓN



VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

Agradecimientos

A la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray por brindarme la oportunidad de formar parte de su gran equipo de trabajo, por el apoyo otorgado a lo largo de este proyecto, pero sobre todo por ser un excelente ejemplo a seguir tanto en el ámbito personal como académico.

Al Técnico Académico M. C. Ernesto Mendoza Duarte por el infinito apoyo y paciencia, los consejos brindados y su gran amistad.

A la Dra. Elizabeth Nieto Mendoza por su buena disposición, conocimientos y gran ayuda.

Al comité académico conformado por la Dra. María Esther Cruz Beltrán, Dra. Patricia Rosas Saucedo, M. en ISBH. Angélica Flores Ramírez y Dra. Juana Monroy Moreno, por las observaciones correspondientes que permitieron enriquecer el presente trabajo.

A todos y cada uno de los profesores que con su valioso conocimiento y experiencia permitieron mi formación académica.

Dedicatorias

A papá y a mamá: Gracias por ser un buen ejemplo, por el esfuerzo, los sacrificios, la dedicación y el apoyo incondicional, a ustedes les debo lo que soy. Este logro es totalmente suyo.

A Hugo: Mi fuente de inspiración, simplemente gracias por ser, estar y existir.

A mis hermanos: Gracias por la vida compartida y por motivarme a ser una mejor persona.

A los grandes amigos que conocí a lo largo de este tiempo por los gratos momentos de conocimiento, diversión y esparcimiento, en los que en más de una ocasión desafiamos la sabiduría popular: “Evite el exceso”. Gracias por todo: Sarita, Toño, Ferni, César, Rebeca, Laurel, Alam, Neto, Víctor, Diego y Edmundo.

A los animales que fueron sacrificados, les rindo homenaje: El conocimiento generado y la totalidad de preguntas y respuestas encontradas, es posible gracias a ustedes.

A todas aquellas personas que en algún momento formaron parte de mi espacio-tiempo, gracias por el aprendizaje y las lecciones brindadas.

“Ninguna gran mente ha existido jamás sin un toque de locura.”

Aristóteles

“...del cerebro, y no de otro lugar provienen las alegrías, los placeres, la risa, la broma, y también las tristezas, la aflicción, el abatimiento, y los lamentos. Y con el mismo órgano, de una manera especial, adquirimos el juicio y el saber, la vista y el oído y sabemos lo que está bien y lo que está mal, lo que es trampa y lo que es justo, lo que es dulce y lo que es insípido, algunas de estas cosas las percibimos por costumbre, y otras por su utilidad... Y a través del mismo órgano nos volvemos locos y deliramos, y el miedo y los terrores nos asaltan, algunos de noche y otros de día, así como los sueños y los delirios indeseables, las preocupaciones que no tienen razón de ser, la ignorancia de las circunstancias presentes, el desasosiego y la torpeza. Todas estas cosas las sufrimos desde el cerebro.”

Hipócrates

“Por los tenebrosos rincones de mi cerebro acurrucados y desnudos duermen los extravagantes hijos de mi fantasía esperando en silencio que el Arte los vista de la palabra para poderse presentar decentes en la escena del mundo...”

Gustavo Adolfo Bécquer

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	1
Resumen	2
1. Introducción	
1.1 Sistema Nervioso	3
1.2 Ganglios Basales	3
1.2.1 Circuitos de los ganglios basales	6
1.3 Núcleo estriado	8
1.4 Transmisión sináptica	9
1.4.1 Sinapsis eléctrica	9
1.4.2 Sinapsis química	9
1.5 Modulación de la transmisión sináptica	11
1.6 Factores Neurotróficos	12
1.7 Neurotrofinas	13
1.8 Mecanismos de señalización mediados por receptores	14
1.9 Vías de señalización mediadas por neurotrofinas	15
1.9.1 Vía de señalización MAPK/ERK o Ras/ERK	15
1.9.2 Vía de señalización PI3K/Akt	15
1.9.3 Vía de señalización PLC- γ 1	16
1.10 BDNF	17
1.11 Enfermedad de Huntington	18
1.11.1 BDNF y Enfermedad de Huntington	19
1.11.2 Modelo farmacológico de la Enfermedad de Huntington	21
1.12 Antioxidantes	24
1.12.1 Resveratrol	25
2. Justificación	28
3. Hipótesis	29
4. Objetivos	29
5. Materiales y Métodos	30
6. Resultados	35
7. Discusión	52
8. Conclusiones	57
9. Referencias Bibliográficas	58

ABREVIATURAS

3-NP: Ácido 3 nitropropiónico	i. p.: Intraperitoneal
ACh: Acetilcolina	IP3: Inositol 1, 4, 5-trifosfato
ADN: Ácido desoxirribonucleico	JNK: Cinasa c-Jun N-terminal
Akt: Proteína cinasa B	KA: Receptor Kainato
AMPA: Receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	kDA: kiloDalton
AMPK: Proteína cinasa activada por AMP	LTD: Depresión a largo plazo
ATP: Adenosín trifosfato	LTP: Potenciación a largo plazo
BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro	m-TOR: Proteína m-TOR
BK_{Ca}: Canales de potasio de gran conductancia activados por calcio	MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno
CAG: Triplete citosina-adenina-guanina	MDA: Malondialdehído
CREB: Proteína unidora de los elementos de respuesta al AMPc	MSN: Neuronas Espinosas Medianas
D1: Receptores dopaminérgicos tipo D1	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
D2: Receptores dopaminérgicos tipo D2	NFκB: Factor Nuclear NF κ B
DA: Dopamina	NGF: Factor de Crecimiento Nervioso
DAG: Diacilglicerol	NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato
EH: Enfermedad de Huntington	NT-3: Neurotrofina-3
EO: Estrés Oxidativo	NT-4/5: Neurotrofina-4/5
EP: Núcleo entopeduncular	p75 NTR: Receptor de neurotrofinas p75
ERK: Proteína cinasa regulada por señales extracelulares	PGC-1α: Coactivador Transcripcional PGC-1 α
FKHRL1: Factor de Transcripción FKHRL1	PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa
GABA: Ácido gamma-amino butírico	PLC-γ 1: Phospholipase C- γ 1
GB: Ganglios Basales	PPF: Facilitación por pulso pareado
Glu: Glutamato	PPD: Depresión por pulso pareado
GP: Globo pálido	SDH: Succinato deshidrogenasa
GPe: Globo pálido externo	SN: Sustancia nigra
GPI: Globo pálido interno	SNc: Sustancia nigra pars compacta
GSH: Glutatión	SNr: Sustancia nigra pars reticulata
htt: Hungtintina normal	STN: Núcleo Subtalámico
httm: Hungtintina mutada	RL: Radicales Libres
	Resv: Resveratrol
	RNA_m: RNA mensajero
	TFMA: Factor de transcripción mitocondrial TMFA
	Trk: Receptores Tirocin Cinasa



RESUMEN

En el presente estudio se evaluó mediante la técnica de registros electrofisiológicos la actividad glutamatérgica corticoestriatal para dilucidar si los diferentes tratamientos y pretratamientos con el antioxidante polifenólico Resveratrol (20 mg/kg i. p.) eran capaces de mejorar la respuesta sináptica poblacional en el modelo experimental de la Enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico (15 mg/kg i. p.). Así mismo, se evaluó en presencia del Resveratrol, la respuesta sináptica estriatal modulada por el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF).

Los resultados obtenidos muestran que el Resveratrol es capaz de atenuar el daño inducido con ácido 3-nitropropiónico. Asimismo, se encontró que el efecto del Resveratrol sobre la modulación sináptica corticoestriatal en presencia de BDNF es diferencial bajo las mismas condiciones experimentales; en un 34% de los casos BDNF incrementa la respuesta S1, mientras que en el 66% restante disminuye la amplitud de la respuesta S1. En ambos casos se comprobó que la neurotrofina actúa mediante mecanismos postsinápticos.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema Nervioso

La estructura y organización del sistema nervioso es el resultado de millones de años de evolución. La evolución otorgó un sistema nervioso a los diferentes organismos, el cual les permite integrar la información que reciben y emitir las respuestas más adecuadas para la supervivencia y reproducción del organismo en cuestión (Revisado en Hickman, 2008).

El sistema nervioso es una red de tejidos altamente especializada que regula, coordina e integra todas las funciones de los órganos y sistemas, y cuya principal función consiste en codificar, procesar y transmitir la información para lograr una respuesta apropiada, oportuna y eficaz (Revisado en Ross, 2008). Dicho de otro modo, el sistema nervioso es el centro de control que regula todas las actividades del organismo.

Las neuronas son las células fundamentales del sistema nervioso, representan la unidad anatómica y funcional del cerebro (Revisado en Ross, 2008). Éstas no funcionan de forma aislada; se organizan en conjuntos o circuitos neuronales que procesan tipos específicos de información (Revisado en Purves, 2004).

Un ejemplo de circuitos neuronales son los ganglios basales conformados por una compleja red de núcleos ubicados en el cerebro anterior o prosencéfalo cuyo desempeño es esencial en el control del movimiento. Se ha propuesto que cualquier daño o desorganización de los ganglios basales produce alteraciones motoras como las observadas en las enfermedades de Parkinson o en la de Huntington (Yamada *et al*, 2016).

1.2 Ganglios Basales

Los Ganglios Basales (GB) son un conjunto de estructuras subcorticales (Parent *et al*, 1995; Bolam *et al*, 2009) involucrados en el control motor a través de la planeación y ejecución correcta de los programas motores (Bolam *et al*, 2000). Así mismo, desempeñan un papel importante en diversas funciones tales como: la actividad cognitiva, la conducta emocional (Tisch *et al*, 2004) y los procesos de aprendizaje y memoria (Graybiel, 2000; Calabresi *et al*, 2015).

Los GB se localizan en la parte ventral de los hemisferios cerebrales y se encuentran organizados de manera topográfica y funcional en circuitos específicos que involucran diversas regiones de la corteza y el tálamo, a este arreglo se le conoce como circuito segregado (Afifi, 2003). Dichos circuitos son nombrados a partir de la función de las áreas corticales de donde se originan; éstos son: motor, asociativo, límbico y oculomotor (DeLong & Wichmann, 2007; Wichmann & Dostrovsky, 2011).

Tradicionalmente los GB se encuentran conformados por cuatro núcleos principales (**Figura1**): el núcleo estriado o neostriado, el globo pálido (GP), la sustancia nigra (SN) y el



núcleo subtalámico (SNT) (Bolam *et al*, 2000; Afifi, 2003; Tisch *et al*, 2004; Tepper *et al*, 2007; Bolam *et al*, 2009).

En roedores el estriado no cuenta con división alguna, sin embargo en vertebrados superiores la cápsula interna divide al estriado en el núcleo caudado y el putamen (Tepper *et al*, 2007).

El globo pálido es conformado por dos partes, el segmento externo (GPe) y el segmento interno (GPi) (Bolam *et al*, 2000; Tisch *et al*, 2004; Tepper *et al*, 2007). En roedores, el segmento externo es simplemente referido como GP mientras que el equivalente del segmento interno (en términos de aferencias y eferencias) corresponde al núcleo entopeduncular (EP). Los dos segmentos del GP difieren en aferencias y eferencias, por lo tanto son funcionalmente distintos (Tepper *et al*, 2007).

De manera similar, la sustancia nigra se encuentra dividida en dos, la sustancia nigra pars compacta (SNc) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (Bolam *et al*, 2000; Tisch *et al*, 2004; Tepper *et al*, 2007). Ambas partes de la SN poseen aferencias (inputs o entradas) similares, sin embargo la diferencia radica en sus eferencias (outputs o salidas) y la composición bioquímicamente distinta de sus diversos tipos neuronales (Tepper *et al*, 2007).

La división anterior corresponde a los aspectos dorsales de los GB; existe una división ventral en la que se incluye al núcleo accumbens, al pálido ventral (que probablemente incluye un equivalente ventral del GPi), así como aspectos mediales del STN y la SN (Tepper *et al*, 2007). La división dorsal de los GB es asociada primordialmente con las funciones motoras y asociativas mientras que la división ventral se encuentra más relacionada con funciones límbicas (Tepper *et al*, 2007; Gerfen & Surmeier, 2011).

El principal neurotransmisor utilizado por el 98% de las neuronas de los ganglios basales es el ácido gamma aminobutírico (GABA). Tanto el estriado, como ambos segmentos del GP y la SNr poseen neuronas de proyección cuya naturaleza es de tipo GABAérgica. No obstante, existen algunas excepciones y el 2% restante corresponde con las neuronas glutamatérgicas del STN, las neuronas dopaminérgicas de la SNc y la una única población de interneuronas estriatales que son de naturaleza colinérgica (Tepper *et al*, 2007; Bolam *et al*, 2009).

La principal entrada o aferencia de información a los GB es el núcleo estriado. Éste recibe diversas aferencias glutamatérgicas excitatorias provenientes de la corteza y el tálamo (Tisch *et al*, 2004; Cepeda *et al*, 2007; Tepper *et al*, 2007 Gerfen & Surmeier, 2011). Por otra parte, las principales estructuras eferentes o de salida que constituyen los GB son el GPi y la SNr, todas estas estructuras proyectan principalmente hacia la corteza cerebral a través del tálamo (Middleton, 2000; Tisch *et al*, 2004; DeLong & Wichmann, 2007; Wichmann & Dostrovsky, 2011).



1.2.1 Circuitos del sistema de los Ganglios Basales

El modelo más influyente de la función que desempeñan los circuitos de los ganglios basales se encuentra basado en la segregación y procesamiento de la información a través de dos vías: la directa y la indirecta (**Figura 2**). Estas vías actúan de manera contraria y complementaria para favorecer el control del movimiento (Albin *et al*, 1989; Kreitzer & Malenka, 2008; Gerfen & Surmeier, 2011; Calabresi *et al*, 2014).

El circuito de la vía directa surge a partir de las neuronas espinosas medianas (MSN, por sus siglas en inglés Medium Spiny Neurons) de proyección estriatonigral, las cuales reciben aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo. Las MSN de la vía directa proyectan a las neuronas GABAérgicas del globo pálido interno y de la sustancia nigra pars reticulata, que a su vez establecen conexiones axonales al núcleo motor del tálamo. De forma simplificada, la vía directa actúa desinhibiendo las proyecciones excitatorias talamocorticales lo que conduce a la activación de los circuitos premotores corticales, facilitando el movimiento apropiado (Kreitzer & Malenka, 2008; Gerfen & Surmeier, 2011).

La vía indirecta surge a partir de las MSN de proyección estriatopallidal, las cuales generan sinapsis inhibitorias en las neuronas GABAérgicas palidales que a su vez proyectan a las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico. Las neuronas del STN establecen conexiones axonales a los núcleos de salida de los GB (globo pálido interno y sustancia nigra pars reticulata), donde se generan sinapsis excitatorias sobre las neuronas inhibitorias eferentes. El efecto resultante de la actividad de la vía indirecta es una inhibición de las neuronas talamocorticales de proyección, facilitando la inhibición de los movimientos inapropiados (Kreitzer & Malenka, 2008; Gerfen & Surmeier, 2011).

Un aspecto importante de este modelo es el papel que desempeña la dopamina (DA) en la modulación de la actividad de las vías directa e indirecta a través de la regulación del disparo axonal de las MSN del estriado (Kreitzer & Malenka, 2008). Existen dos tipos de subfamilias de receptores dopaminérgicos relacionados a las MSN, los de tipo D1 y los D2. Aunque ambos se encuentran acoplados a proteínas G su función es totalmente distinta (DeLong & Wichmann, 2007; Gerfen & Surmeier, 2011; Calabresi *et al*, 2014). Cuando la DA se une a un receptor tipo D1 se inicia una cascada de señalización de segundos mensajeros que resulta en la despolarización de la neurona. En contraste, cuando la DA se une a un receptor tipo D2 la cascada de señalización de los segundos mensajeros culmina en una hiperpolarización de la neurona (Utter & Basso, 2008). Los receptores D1 se encuentran expresados en la vía directa y su acción favorece la activación de la vía estriatonigral (vía directa), mientras que los receptores tipo D2 se encuentran en la vía indirecta y su activación favorece la vía estriatopallidal (vía indirecta) (DeLong & Wichmann, 2007; Gil & Rego, 2008; Utter & Basso, 2008; Bolam *et al*, 2009; Bateup *et al*, 2010; Gerfen & Surmeier, 2011; Calabresi *et al*, 2014).



Por lo anteriormente mencionado, dentro de las estructuras que conforman los GB es de vital relevancia el núcleo estriado debido a la función que desempeña como el principal receptor e integrador de las proyecciones excitatorias provenientes de la corteza y el tálamo (Calabresi *et al*, 2000; Grittis & Kreitzer, 2012; Girault, 2012), función que se traduce en un adecuado control del movimiento.

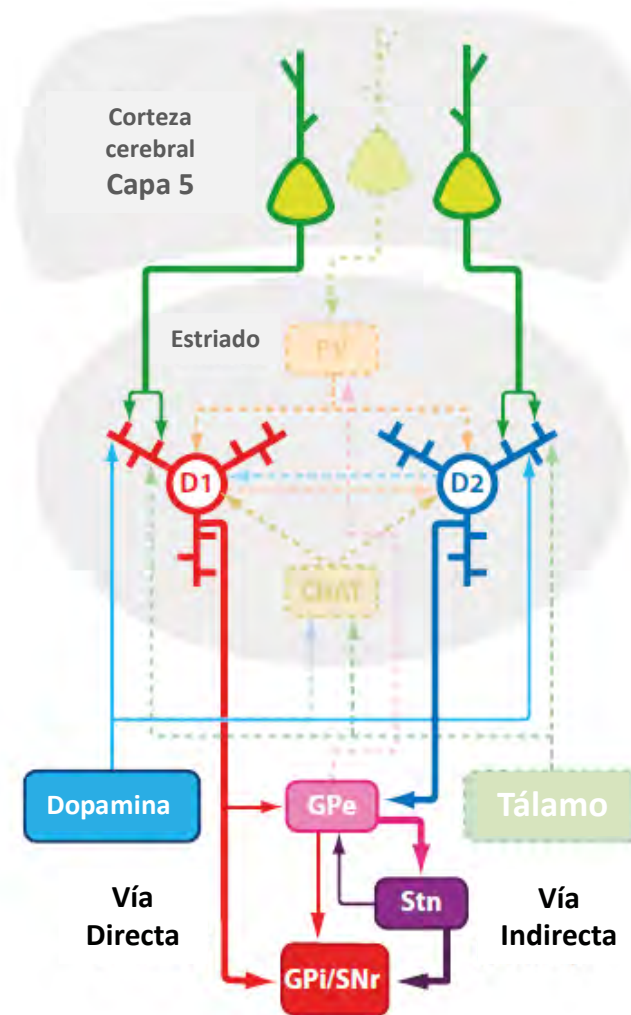


Figura 2. Esquema de los circuitos que conforman las vías corticoestriatales directa e indirecta. En corteza, las neuronas piramidales de la capa 5 proveen aferencias glutamatérgicas excitatorias hacia las espinas de las MSN de proyección. Las MSN que expresan receptores tipo D1 originan la vía estriatonigral (vía directa) que proyecta hacia los núcleos de salida de los GB (GPi/SNr), mientras que las MSN que expresan receptores tipo D2 originan la vía estriadopalidal (vía indirecta) y proyectan hacia el GPe (Modificado de Gerfen & Surmeier, 2011).



1.3 Núcleo Estriado

El 90 al 95% de la población neuronal (Nakano *et al*, 2000; Afifi, 2003; Tisch *et al*, 2004) que conforma el núcleo estriado corresponde con las neuronas espinosas medianas GABAérgicas de proyección (Kawaguchi *et al*, 1995; Afifi, 2003; Cepeda *et al*, 2007; Tepper *et al*, 2007; Bolam *et al*, 2009; Grittis & Kreitzer, 2012), denominadas así debido a su elevada y característica densidad de espinas dendríticas (Kawaguchi *et al*, 1995; Tisch *et al*, 2004). Algunas de sus principales características electrofisiológicas son su potencial de reposo negativo y sus bajos rangos de disparo *in vivo* (Kreitzer & Malenka, 2008). En condiciones normales son silentes, sin embargo bajo ciertas condiciones pueden responder mediante disparos fásicos (Kawaguchi, 1997).

Las MSN son categorizadas en al menos dos subpoblaciones, con base en la región de proyección, el patrón de colateralización axonal y su neuroquímica (Kreitzer & Malenka, 2008; Bolam *et al*, 2009). Como anteriormente fue descrito, una subpoblación de MSN origina la vía directa y la otra subpoblación de MSN origina la vía indirecta. Ambas subpoblaciones dan origen a colaterales axonales cuyo objetivo es inervar a otras MSN (Bolam *et al*, 2009).

El 10-5% restante de la población neuronal estriatal es un grupo de neuronas sin espinas denominadas interneuronas (Afifi, 2003; Tepper *et al*, 2007; Bolam *et al*, 2009). Son fenotípicamente diversas y poseen propiedades específicas y complementarias que les permiten influir sobre la actividad de las MSN (Tepper & Bolam, 2004). Existen al menos tres poblaciones de interneuronas GABAérgicas y una población de interneuronas colinérgicas en el estriado (Kawaguchi *et al*, 1995; Bolam *et al*, 2009). Las interneuronas GABAérgicas son divididas en dos grupos con base en sus propiedades fisiológicas, estas son: 1) Interneuronas fast-spiking (histoquímicamente identificadas como positivas a parvalbúmina [PV]); 2) Interneuronas low-threshold spiking (histoquímicamente identificadas como positivas a somatostatina, óxido nítrico sintasa [NOS] y neuropéptido Y, así como las interneuronas positivas a calretinina) (Kawaguchi *et al*, 1995; Afifi, 2003; Tepper & Bolam, 2004; Kreitzer & Malenka, 2008).

Las interneuronas colinérgicas gigantes son identificadas histoquímicamente por la presencia de colina acetiltransferasa (Kawaguchi *et al*, 1995; Tepper & Bolam, 2004); anatómica y fisiológicamente son identificadas por sus largos cuerpos celulares, su densa arborización axonal y su actividad tónica *in vivo* (Kreitzer & Malenka, 2008).

Tanto las interneuronas GABAérgicas como las colinérgicas forman un importante sitio de acción para la DA y la ACh que son neurotransmisores y/o neuromoduladores en el estriado. Cabe señalar que ACh y DA no producen excitación o inhibición directas, lo realizan mediante la despolarización o hiperpolarización de la membrana de las MSN, ejercen sus efectos neuromodulatorios actuando sobre los canales de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ dependientes de voltaje (Tepper & Bolam, 2004).



Adicionalmente a la división poblacional del estriado, éste puede ser compartimentado en el estriosoma (o parches) y la matriz. Los estriosomas poseen células que se tiñen ligeramente con acetilcolinesterasa, mientras que las neuronas de la matriz presentan elevados niveles de la proteína unidora de calcio calbindina. Ambos compartimentos difieren en aferencias, eferencias, neurotransmisores, neuromoduladores y distribución de subtipos de receptores dopaminérgicos (Afifi, 2003; Vonsattel *et al*, 2008; Bolam *et al*, 2009).

1.4 Transmisión Sináptica

Para comprender un sistema se requiere del conocimiento de los componentes elementales y la manera en la que dichos componentes interaccionan entre sí, además de las propiedades emergentes de esas interacciones (Revisado en Sporns, 2011). Por lo tanto, para comprender los circuitos neuronales es necesario el conocimiento del elemento neurona y su componente primordial: la sinapsis.

Cada neurona cuenta con la habilidad de influir sobre muchas otras células. Esta comunicación tan sofisticada y altamente eficiente es posible gracias a la sinapsis, que es definida como el punto de unión o contacto funcional entre las neuronas (Revisado en Purves, 2004; Zucker *et al*, 2004). Una adecuada comunicación entre neuronas implica que éstas deben de integrar y asociar señales que pueden ser de carácter químico o eléctrico.

Existen dos tipos de sinapsis que son clasificadas con base en sus mecanismos de transmisión; las sinapsis químicas y las sinapsis eléctricas (Revisado en Purves, 2004).

1.4.1 Sinapsis eléctricas

Las sinapsis eléctricas permiten directamente el flujo pasivo de cargas o corrientes eléctricas de una neurona a otra a través de uniones tipo gap (**Figura 3A**), estas uniones son canales iónicos de membrana especializados que forman un poro (conexón) y permiten a las células establecer una conexión extraordinariamente rápida (Revisado en Purves, 2004).

Dichas conexiones pueden ser unidireccionales o rectificantes, si únicamente dejan pasar carga en una dirección, o bien, si dejan pasar carga en ambas direcciones se les denomina bidireccionales o recíprocas (Bargas & Galarraga, 2008).

1.4.2 Sinapsis químicas

Las sinapsis químicas permiten la comunicación celular mediante la secreción de mensajeros químicos contenidos en vesículas sinápticas, los mensajeros son denominados neurotransmisores (**Figura 3B**). Las sinapsis químicas son las más utilizadas por las neuronas del sistema nervioso para comunicarse y formar redes neuronales. Estas sinapsis constan de una elaborada secuencia de eventos. El proceso es iniciado cuando un



potencial de acción invade la terminal de la neurona presináptica y esto ocasiona un cambio en el potencial de membrana permitiendo la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. La apertura de estos canales permite el influjo de Ca^{2+} extracelular, aumentando así el gradiente de concentración del Ca^{2+} intracelular. El aumento en las concentraciones del Ca^{2+} intracelular permite que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana celular y éstas a su vez liberan el neurotransmisor al espacio o hendidura sináptica. Una vez que los neurotransmisores son liberados al espacio sináptico éstos se unen a receptores moleculares específicos localizados en la membrana de la neurona postsináptica. La unión del neurotransmisor a su receptor ocasiona la apertura o cierre de canales iónicos lo que modifica la entrada o salida de iones que a su vez modifica el flujo de corriente, alterando la conductancia y el potencial de membrana de la neurona, incrementando o decrementando la posibilidad de que la neurona postsináptica dispare un potencial de acción (Revisado en Purves, 2004).

Los neurotransmisores evocan respuestas sinápticas de tipo eléctrico mediante la unión a sus receptores, dichas respuestas pueden ser rápidas o lentas dependiendo del tipo de receptor sobre el que actúa el neurotransmisor (Revisado en Purves, 2004). Los receptores de los neurotransmisores se clasifican en dos grupos principales, según la forma en que controlan los canales iónicos en la célula postsináptica (Revisado en Kandel, 2001), estos son los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos (Revisado en Purves, 2004).

Los receptores de tipo ionotrópico, también conocidos como canales receptores o canales sensibles a ligando, son canales que se abren de forma directa cuando el neurotransmisor se une a ellos, esto debido a que el receptor sufre un cambio conformacional que da lugar a la apertura del canal. Por otra parte, los receptores de tipo metabotrópico actúan de forma indirecta activando los canales iónicos. La activación de estos receptores estimula la producción de segundos mensajeros dentro de la célula postsináptica, estos segundos mensajeros a su vez activarán diferentes vías de señalización permitiendo la apertura o cierre de los canales iónicos (Revisado en Purves, 2004).

Tanto los receptores ionotrópicos como metabotrópicos poseen diversas funciones. Los primeros producen acciones sinápticas relativamente rápidas, cuya duración es de milisegundos. Los segundos producen acciones sinápticas más lentas que pueden durar de segundos a minutos, estas acciones más lentas pueden regular el comportamiento modificando la excitabilidad de las neuronas y la fuerza de las conexiones sinápticas (Revisado en Kandel, 2001).



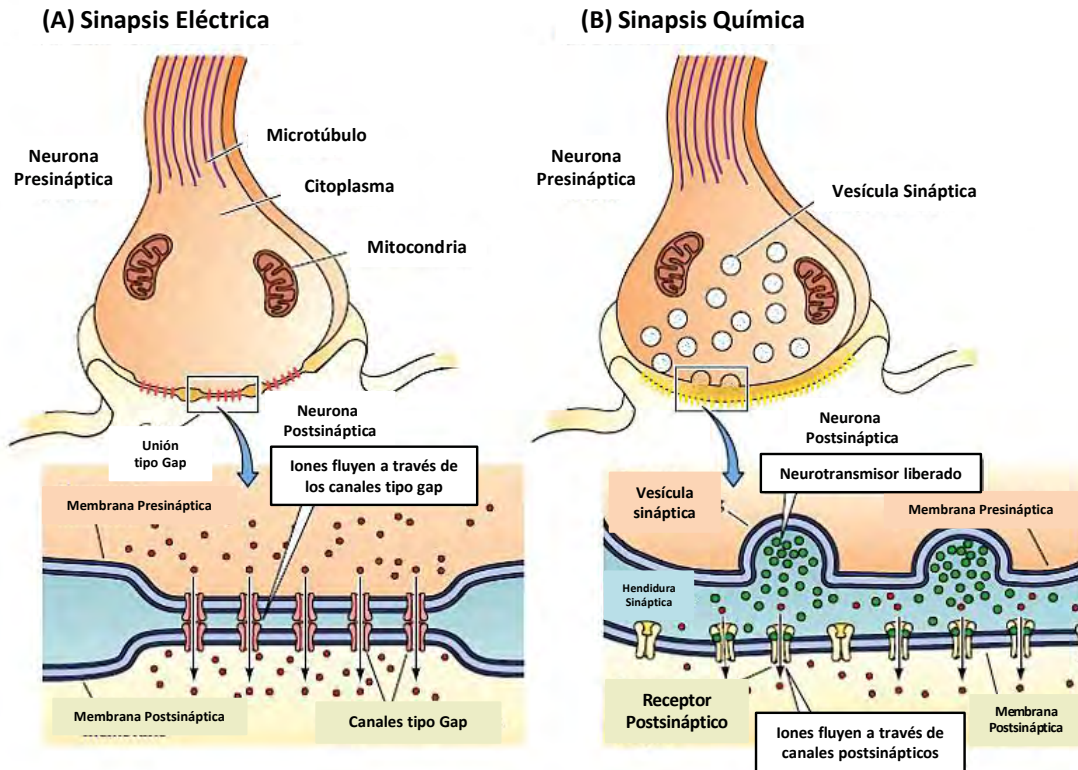


Figura 3. Esquema de una sinapsis eléctrica y una sinapsis química, ambas difieren fundamentalmente en sus mecanismos de transmisión. **(A)** En una sinapsis eléctrica, las uniones tipo gap permiten el flujo pasivo de corriente a través de los canales. Este flujo pasivo de corriente modifica el potencial de membrana postsináptico, iniciando (o en algunas ocasiones inhibiendo) la generación de potenciales de acción postsinápticos. **(B)** Durante una sinapsis química no existe continuidad intercelular, por consiguiente no existe flujo de corriente directa entre las células presinápticas y postsinápticas. Los flujos de corriente sináptica atraviesan la membrana postsináptica únicamente en respuesta a la secreción de neurotransmisores, los cuales permiten la apertura o cierre de los canales iónicos presentes en la postsinapsis, esto después de la unión a su receptor molecular específico (Modificado de Purves, 2004).

1.5 Modulación y plasticidad sináptica

El término modulación de la transmisión sináptica o neuromodulación es definido como la habilidad que poseen las neuronas de alterar sus propiedades eléctricas, en respuesta a cambios bioquímicos intracelulares y extracelulares, debido a una estimulación sináptica u hormonal. Es una de las características intrínsecas más importantes de cada neurona (Revisado en Kaczmarek & Levitan, 1987) y permite a cada neurona adaptarse a los cambios constantes que existen en el ambiente (Revisado en Kaczmarek & Levitan, 1987; Wilson, 2001). Un cambio en la eficacia de la transmisión sináptica entre neuronas ocurre en respuesta a la actividad propia o en respuesta a la actividad sináptica de otras. Este cambio en la eficiencia de la transmisión sináptica, generado como una respuesta



adaptativa ante un estímulo determinado se denomina plasticidad sináptica, siendo postulada como la base misma de los procesos de aprendizaje y memoria (Yoshioka & Kuba, 2000). Cuando una neurona actúa de manera reiterada sobre otra, se establece un mecanismo de reforzamiento sináptico entre ellas, lo que hace más fácil su posterior interacción. Estos cambios pueden ser de dos tipos, morfológicos o neuroquímicos (Revisado en Córdova, 2003).

Los cambios morfológicos conllevan un cambio estructural permanente como por ejemplo, un incremento de la superficie sináptica, formación de nuevas sinapsis, translocación de contactos sinápticos etc. Estos cambios afectan el número y localización de las sinapsis, y son el sustrato de procesos como el aprendizaje y la memoria. En el sistema nervioso existen redes neuronales estables, así mismo existen otras muy plásticas que permiten que un alto porcentaje de la arquitectura del sistema nervioso sea modificada (Revisado en Córdova, 2003).

Los cambios neuroquímicos no son microscópicamente apreciables, sin embargo afectan el funcionamiento de las sinapsis, esto a través de la cantidad de neurotransmisor liberado, el número de receptores postsinápticos existentes, cambios en la velocidad de recaptura del neurotransmisor, vías de señalización, segundos mensajeros, entre otros (Revisado en Córdova, 2003).

La plasticidad sináptica es modulada por infinidad de moléculas neuromoduladoras que modifican la eficacia de la transmisión sináptica, ejemplo de estas moléculas son los factores neurotróficos.

1.6 Factores Neurotróficos

Los factores neurotróficos son moléculas polipeptídicas (Skaper & Walsh, 1998; Semkova & Krieglstein, 1999; Siegel & Chauhan, 2000; Skaper, 2008) que interaccionan con receptores celulares específicos para producir diversas respuestas biológicas (Semkova & Krieglstein, 1999; Alberch *et al*, 2002). Éstos se encargan de promover el desarrollo, diferenciación, supervivencia, comunicación y mantenimiento fenotípico de las neuronas; pueden regular funciones neuronales como la transmisión y plasticidad sinápticas, además de regular el crecimiento y la orientación tanto de axones como de dendritas (Lo, 1995; Berninger & Poo, 1996; Skaper & Walsh, 1998; Siegel & Chauhan, 2000; Alberch *et al*, 2004; von Bartheld, 2006; Fumagalli *et al*, 2008; Pardon, 2010).

Los factores neurotróficos se agrupan y clasifican en familias de moléculas relacionadas estructural y funcionalmente (Siegel & Chauhan, 2000; Pardon, 2010), siendo la familia de neurotrofinas el grupo mejor estudiado (Biebel & Barde, 2000).



1.7 Neurotrofinas

En el cerebro de mamíferos se han caracterizado cuatro miembros principales de la familia de las neurotrofinas, éstos son el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Lo, 1995; Lessman, 1998; Huang & Reichardt, 2001; Patapoutian & Reichardt, 2001; Poo, 2001; Lu & Woo, 2005; Reichardt, 2006; Henningan *et al*, 2007; Pardon, 2010; Park & Poo, 2013).

Las neurotrofinas se encargan de la promoción, mantenimiento y desarrollo de las sinapsis (Lo, 1995; Poo, 2001). Como cualquier otra proteína secretada, las neurotrofinas surgen como precursores o proneurotrofinas (30-35 kDa), las cuales son proteolíticamente disociadas para producir proteínas maduras (12-13 kDa) (Lu & Woo, 2005). Pro-NGF, pro-NT-3 Y pro-NT-4/5 son empaquetadas en vesículas constitutivas antes de su secreción; por otra parte pro-BDNF es empaquetado en vesículas reguladas de manera secretoria es decir, las vesículas son procesadas y secretadas de manera dependiente de actividad, aunque también se ha dicho que tienen secreción constitutiva independiente de la actividad neuronal (Allen & Dawbarn, 2006; Balaratnasingam & Janca, 2012).

Las acciones celulares de las neurotrofinas se encuentran mediadas por dos tipos de receptores transmembranales (**Figura 4**), el receptor de baja afinidad p75 NTR y los receptores de alta afinidad Trk (Lessman, 1998; Kaplan & Miller, 2000; Patapoutian & Reichardt, 2001; Poo, 2001; Lu & Woo, 2005; Henningan *et al*, 2007; Pardon, 2010).

Todas las neurotrofinas se unen con similar afinidad al p75 NTR, sin embargo cada neurotrofina se une de manera preferencial y activa un receptor Trk (Barbacid, 1995; Lo, 1995; Lu & Woo, 2005; Henningan *et al*, 2007); NGF se une preferentemente a TrkA, tanto BDNF como NT4/5 muestran afinidad por TrkB y la NT3 se une de manera preferencial a TrkC (Lo, 1995; Poo, 2001; Henningan *et al*, 2007; Musumeci & Minichiello, 2011; Park & Poo, 2013) sin embargo, esta neurotrofina también puede unirse aunque con menor afinidad, a los receptores TrkA y TrkB (Barbacid, 1995; Murray & Holmes, 2011; Musumeci & Minichiello, 2011).

Los receptores Trk y p75 a menudo se encuentran en una misma célula coordinando y modulando los efectos de las neurotrofinas, ambos actúan de manera paradójica debido a que son capaces de incrementar o suprimir la acción del otro (Kaplan & Miller, 2000).

La unión de las neurotrofinas a su receptor Trk desencadena eventos de señalización que promueven la supervivencia neuronal, mientras que la unión al receptor p75 activa vías que afectan la supervivencia celular (Dawbarn & Allen, 2003; Lu & Woo, 2005), lo anterior puede desencadenar procesos de apoptosis y muerte celular (Biebel & Barde, 2000; Kaplan & Miller, 2000; Dawbarn & Allen, 2003; Lu & Woo, 2005).



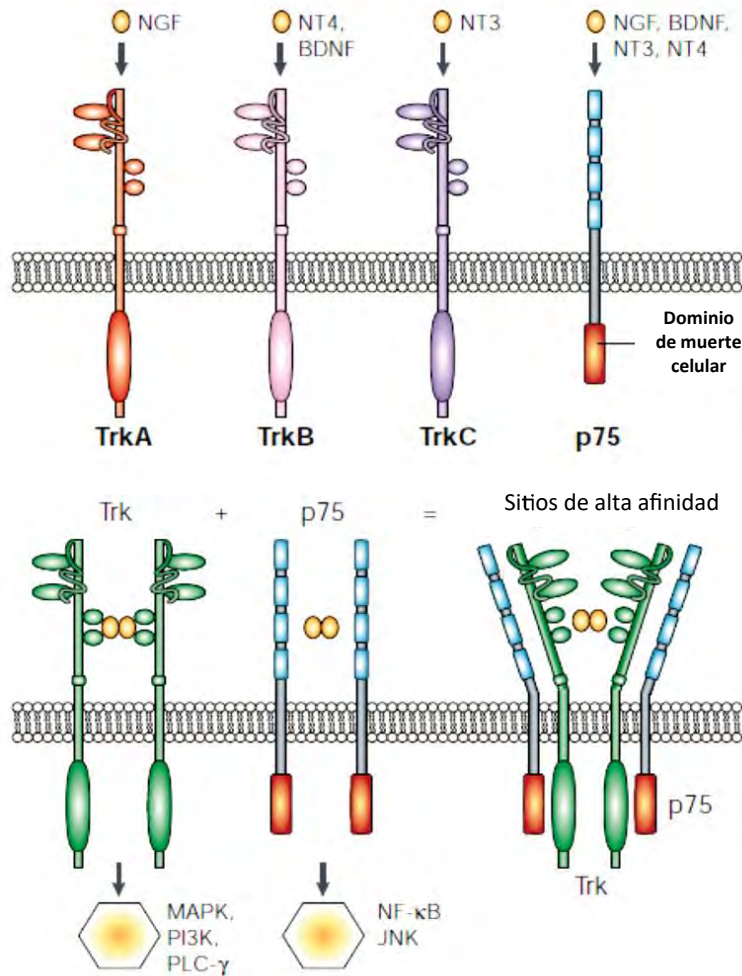


Figura 4. Esquema de las neurotrofinas y sus receptores Trk y p75. Arriba se muestra la unión de las neurotrofinas a sus dos diferentes tipos de receptores. Cada neurotrofina se une de manera preferencial a un receptor Trk, sin embargo todas las neurotrofinas se unen con similar afinidad al receptor de baja afinidad p75. Abajo se muestra que la unión a estos diferentes receptores desencadena la activación de diferentes cascadas de señalización intracelular. Cabe resaltar que las interacciones entre los receptores Trk y p75 pueden generar cambios en la afinidad de unión por las neurotrofinas (Modificado de Chao, 2003).

1.8 Mecanismos de señalización mediados por receptores

La unión de alguna neurotrofina a su receptor Trk resulta en la dimerización del mismo receptor. Los residuos de la tirosina se autofosforilan en el dominio citoplásmico y se activa la cinasa (Poo, 2001), las tirosinas fosforiladas actúan como sitio de unión para moléculas de señalización (Henningan *et al*, 2007) que a su vez son activadas mediante fosforilación (Poo, 2001) y posteriormente desencadenan diferentes vías de señalización intracelular (Henningan *et al*, 2007). Dichas vías son capaces de modificar eventualmente



la expresión de genes, así como la síntesis de proteínas (Poo, 2001), promoviendo de esta manera la supervivencia y/o diferenciación de las poblaciones neuronales (Huang & Reichardt, 2001), además de la plasticidad sináptica (Poo, 2001).

Las cascadas de señalización intracelular que activan las neurotrofinas incluyen: la vía Ras/ERK (proteína cinasa reguladora de señalización extracelular), la vía del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K/ Akt), y la vía de la fosfolipasa C (PLC- γ 1) (Biebel & Barde, 2000; Huang & Reichardt, 2001; Patapautian & Reichardt, 2001; Dawbarn & Allen, 2003; Alberch *et al*, 2004).

En cuanto al receptor de baja afinidad p75, es capaz de modificar de forma selectiva la conformación de los receptores Trk, actuando de manera independiente a través de NF- κ B, Akt y JNK (Allen & Dawbarn, 2006); esto, evidentemente modifica la afinidad y especificidad de unión al ligando, teniendo importantes consecuencias (Huang & Reichardt, 2003). El p75 es capaz de interactuar con diferentes proteínas adaptadoras que se encuentran asociadas tanto a la inducción de apoptosis como de supervivencia celular (Allen & Dawbarn, 2006).

1.9 Vías de señalización mediadas por neurotrofinas

1.9.1 Vía de señalización MAPK/ERK o Ras/ERK

Ras regula la diferenciación neuronal. En muchas neuronas Ras también promueve la supervivencia neuronal principalmente a través de dos vías: PI3K o MAPK/ERK (Patapoutian & Reichardt, 2001). El incremento en la actividad de Ras y de ERK influye en eventos de transcripción, estos eventos incluyen la inducción del factor de transcripción CREB mismo que tiene efectos sobre el ciclo celular, el crecimiento de neuritas y la plasticidad sináptica (Chao, 2003).

1.9.2 Vía de señalización PI3K/Akt

La fosforilación del receptor Trk en el residuo tirosina cercano al dominio transmembranal, crea un sitio de unión para Shc. Esto a su vez conduce a la activación de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y por consiguiente a la fosforilación de los fosfolípidos del inositol presentes en la posición 3', lo anterior resulta en un cambio en la composición local de la membrana. Como consecuencia, Akt se transloca hacia la membrana plasmática y se vuelve activa. La actividad de Akt genera un incremento en la traducción de proteínas a través de las vías mTOR-p70S6 cinasa y 4E-BP1, esto propicia un incremento en el crecimiento axonal. Adicionalmente, Akt activada promueve la supervivencia neuronal mediante la inhibición del factor de transcripción FKHL1 que se encarga de regular la expresión de genes proapoptóticos (Deinhardt & Chao, 2014).



1.9.3 Vía de señalización PLC- γ 1

La activación de esta vía es una consecuencia directa de la activación del receptor Trk (Segal, 2003). El receptor Trk a su vez, es capaz de fosforilar y activar la vía PLC- γ 1, la cual actúa hidrolizando fosfatidilinosítoles para generar inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 induce la liberación del Ca^{2+} almacenado, incrementando los niveles de Ca^{2+} citoplásmico y por consiguiente activando múltiples vías de señalización activadas por calcio (Patapoutian & Reichardt, 2001). Adicionalmente, el incremento de Ca^{2+} intracelular puede potenciar la liberación de neurotransmisor permitiendo que esta vía actúe tanto en pre como en postsinapsis para modular la función sináptica y la plasticidad. En otras palabras, dicha vía permite la modificación selectiva de las sinapsis y también proporciona un mecanismo mediante el cual las neurotrofinas inducen la expresión de genes los cuales pueden interferir con la actividad eléctrica (Segal, 2003).

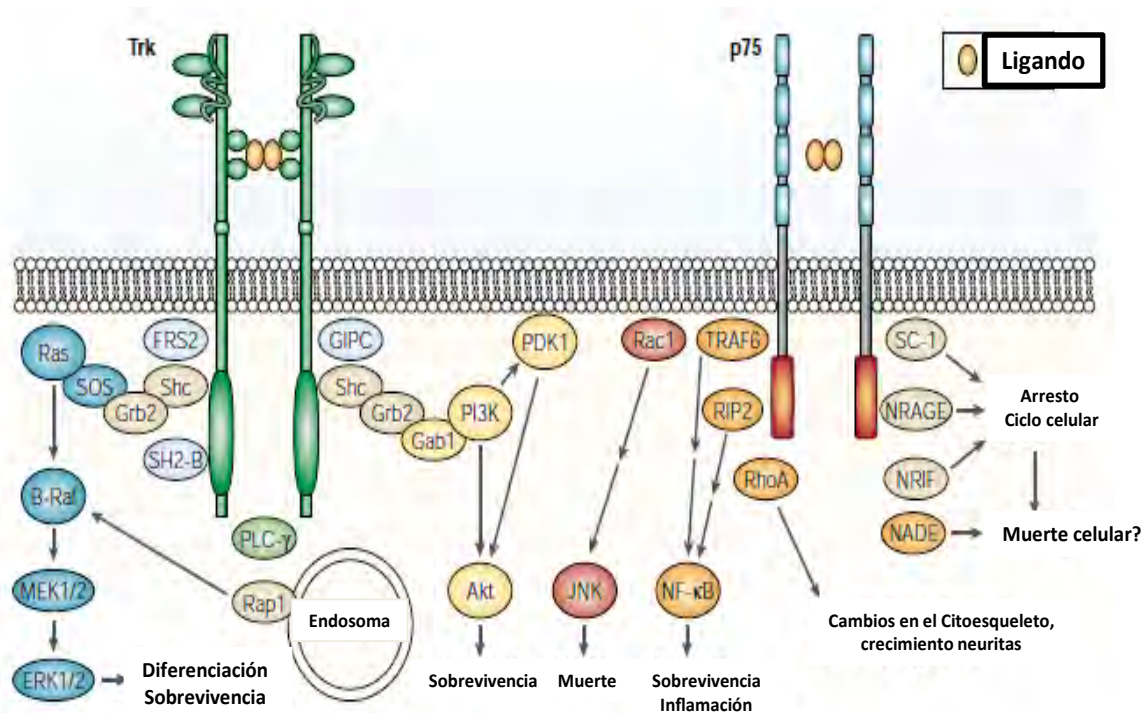


Figura 5. Esquema de las cascadas de señalización intracelular activadas por la unión de las neurotrofinas a sus receptores. Los receptores Trk promueven la diferenciación y supervivencia celular a través de la activación de las vías ERK, PI3K y PLC- γ 1. Los miembros de la familia Trk reclutan e incrementan la fosforilación de PLC- γ 1, lo que conduce a la activación de PI3K y ERK. El p75 NTR predominantemente favorece la activación de NF- κ B y JNK, dichas respuestas se encuentran mediadas a través de proteínas adaptadoras que se unen al dominio citoplasmático de p75; estas proteínas incluyen al factor de interacción neurotrofina-receptor (NRIF), ejecutor de muerte celular asociado a neurotrofinas (NADE), proteína de interacción con el receptor tipo 2 (RIP 2), entre otras las cuales pueden ejercer efectos sobre la apoptosis, la supervivencia, elongación de las neuritas y detención del crecimiento (Modificado de Chao, 2003).



1.10 Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)

El BDNF es una proteína dimérica pequeña que mediante la unión a sus receptores específicos (TrkB y p75NTR) actúa de manera parácrina y autócrina para controlar una gran variedad de procesos cerebrales (Zuccato & Cattaneo, 2007); éstos incluyen el desarrollo, crecimiento, diferenciación y mantenimiento de los sistemas neuronales, la actividad sináptica, plasticidad neuronal y actividades mediadas por neurotransmisores (Zuccato & Cattaneo, 2007; Balaratnasingam & Janca, 2012; Andero *et al*, 2014). En primer lugar BDNF es sintetizada en forma de pro-BDNF, una proteína precursora de aproximadamente 32 kDa, que después es transformada en la forma madura y biológicamente activa de aproximadamente 14 kDa de peso (Zuccato & Cattaneo, 2007).

Aunque BDNF se encuentra ampliamente distribuida dentro del sistema nervioso de los mamíferos, es de particular abundancia en ciertas regiones, éstas incluyen: la corteza cerebral, el prosencéfalo, el núcleo estriado, el hipocampo, el hipotálamo, el tallo o tronco cerebral y el cerebelo (Zuccato & Cattaneo, 2007; Nagahara & Tuszynski, 2011); en estas poblaciones neuronales, BDNF se expresa dentro del núcleo, el soma, el citoplasma y las dendritas (Zuccato & Cattaneo, 2007).

Dentro de todas las neurotrofinas, BDNF destaca por sus elevados niveles de expresión y sus potentes efectos sobre las sinapsis, teniendo importantes efectos estructurales y funcionales que van desde el corto hasta el largo plazo, tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias y en diferentes regiones cerebrales (Lu *et al*, 2014). Muchos aspectos de la biología celular del BDNF son regulados por medio de la actividad neuronal (Lu *et al*, 2014). Dicho de otro modo, la secreción de BDNF es regulada de manera dependiente de actividad (Thomas & Davies, 2005). Las interacciones sinérgicas entre la actividad neuronal y la plasticidad sináptica inducida por BDNF la convierten en reguladora ideal y esencial durante procesos celulares que subyacen a mecanismos complejos (Lu *et al*, 2014) como los procesos de aprendizaje y memoria. De hecho, numerosos estudios señalan que BDNF desempeña un papel esencial durante la potenciación a largo plazo (LTP) (Lu *et al*, 2014), una forma de plasticidad sináptica asociada a la formación y consolidación de la memoria a largo plazo (Thomas & Davies, 2005).

Algunos estudios proveen fuerte evidencia sobre la relación que existe entre los déficits en la expresión de BDNF, así como la pérdida de señalización, y la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la enfermedad de Huntington (Lu *et al*, 2014; Dawbarn & Allen, 2003).



1.11 Enfermedad de Huntington (EH)

El mejor ejemplo que existe sobre el papel que desempeña BDNF sobre las enfermedades neurodegenerativas, lo otorga la enfermedad de Huntington (Zuccato & Cattaneo, 2009).

La EH se caracteriza por la presencia de movimientos coreicos rápidos e incesantes (Hernández-Echeagaray *et al*, 2012), generalmente acompañados por alteraciones psiquiátricas y cognitivas (Cepeda *et al*, 2007; Novak & Tabrizi, 2011; Hernández-Echeagaray *et al*, 2012). Se trata de una enfermedad genética de carácter autosómico dominante ocasionada por una expansión de la repetición del triplete citosina-adenina-guanina (>35 repeticiones CAG) en el gen IT15 HTT que codifica para la proteína huntingtina (Borrell-Pagés *et al*, 2006; Cepeda *et al*, 2007; Walker, 2007; Gil & Rego, 2008; Zuccato & Cattaneo, 2009; Novak & Tabrizi, 2011; Ross & Tabrizi, 2011; Samadi *et al*, 2013; Nopoulos, 2016); Existe una correlación inversa entre el número de repeticiones CAG y la edad de aparición de la enfermedad: a mayor número de repeticiones CAG menor será la edad en la que se manifiestan los síntomas (Novak & Tabrizi, 2011; Ross & Tabrizi, 2011; Zheng & Diamond, 2012).

Como principal consecuencia de esta mutación genética, las neuronas MSN GABAérgicas del núcleo estriado y en menor grado las neuronas piramidales de la corteza cerebral se afectan selectivamente (Davies & Ramsden, 2001; Cepeda *et al*, 2007; Gil & Rego, 2008; Zuccato & Cattaneo, 2009). Las primeras neuronas en morir son las MSN GABAérgicas que proyectan al GP y que contienen encefalina (vía indirecta) (Davies & Ramsden, 2001; Alberch *et al*, 2002; Gil & Rego, 2008). Como éstas ejercen un efecto inhibitorio en el movimiento, es de esperarse que la pérdida de sus aferencias sea la causa subyacente de los movimientos incontrollables observados en las etapas tempranas de la EH (Gil & Rego, 2008). Por otra parte, en etapas tardías de la enfermedad, las neuronas que proyectan a la SNr y que contienen sustancia P además de dinorfina (vía directa) son afectadas (Davies & Ramsden, 2001; Alberch *et al*, 2002; Gil & Rego, 2008), esto explicaría por qué en etapas tardías existe distonia, rigidez, bradicinesia (Novak & Tabrizi, 2011) y finalmente acinesia (Vonsattel *et al*, 2011). En contraste con lo anterior, se ha observado que las interneuronas que contienen neuropéptido Y, somatostatina y NADPH diaforasa, así como las interneuronas GABAérgicas positivas a parvalbúmina y las interneuronas colinérgicas son poblaciones relativamente preservadas en el tejido postmortem de pacientes afectados por la EH (Davies & Ramsden, 2001; Alberch *et al*, 2002; Gil & Rego, 2008).

La alteración de la huntingtina es un aspecto clave dentro de la EH (Sari, 2011). La huntingtina (htt) es una proteína ubicuamente expresada (Landles & Bates, 2004; Saudou & Humbert, 2008; Zheng & Diamond, 2012; Samadi *et al*, 2013) que bajo condiciones normales desempeña diversas funciones vitales; durante el desarrollo embrionario participa en la gastrulación y la neurogénesis, y durante la etapa adulta es de suma importancia para la supervivencia neuronal; en neuronas, la htt participa como una proteína de naturaleza antiapoptótica. Así mismo, se encuentra involucrada en procesos de transcripción celular (e. g. regula la producción de BDNF), transporte axonal y tráfico



vesicular (Zuccato *et al*, 2001; Landles & Bates, 2004; Borrell-Pagés *et al*, 2006; Gil & Rego, 2008; Saudou & Humbert, 2008; Zuccato *et al*, 2010; Zheng & Diamond, 2012), por mencionar algunos. La pérdida de funcionalidad normal y la ganancia de la función tóxica contribuyen a que la huntingtina mutada (htt^m) interactúe de forma anómala con otras proteínas (Sawa *et al*, 2003; Gil & Rego, 2008; Saudou & Humbert, 2008); bajo estas condiciones patológicas es de esperarse que múltiples vías de señalización intracelular sean afectadas.

A pesar de los avances que se tienen en la investigación sobre la EH, el mecanismo mediante el cual la htt^m causa degeneración selectiva sobre las MSN no ha sido completamente dilucidado (Sawa *et al*, 2003; Cepeda *et al*, 2007; Reddy *et al*, 2009; Gardoni & Bellone, 2015). Sin embargo, se han propuesto diversas vías y mecanismos para tratar de explicar las posibles causas de la progresión de la enfermedad, éstas incluyen: desregulación transcripcional, formación anómala de agregados proteicos y su interacción con otras proteínas, activación de caspasas, sobreactivación de receptores NMDA, desbalance homeostático del ión Ca²⁺, bioenergética mitocondrial y transporte axonal anormales (Beal & Ferrante, 2004; Saudou & Humbert, 2008; Reddy *et al*, 2009).

Otras alteraciones observadas en el transcurso de la enfermedad son: alteraciones metabólicas, excitotoxicidad, estrés oxidativo, falla mitocondrial, daño en ADN (Hernández-Echeagaray *et al*, 2012), alteraciones electrofisiológicas (Saudou & Humbert, 2008; Cepeda *et al*, 2014), alteraciones en las concentraciones de neurotransmisores (e. g. dopamina) (André *et al*, 2010; Cepeda, *et al*, 2014) y deficiencia en el soporte trófico (Samadi *et al*, 2013). En conjunto, estas alteraciones pudieran desencadenar una o más formas de muerte celular como apoptosis, necrosis y/o autofagia (Hernández-Echeagaray *et al*, 2012).

1.11.1 Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro y Enfermedad de Huntington

La importancia del BDNF para la supervivencia de las MSN se encuentra ampliamente documentada (Zuccato *et al*, 2010). El hecho de que BDNF promueva la actividad de las sinapsis corticoestriatales y la supervivencia de las neuronas estriatales que mueren durante la EH, ha conducido a la idea de la hipótesis neurotrófica la cual propone que existe una alteración en la producción de BDNF, contribuyendo así a la degeneración del estriado y por ende a la progresión de la enfermedad (Zuccato & Cattaneo, 2007; Fumagalli *et al*, 2008; Wu *et al*, 2010; Zuccato *et al*, 2010; Samadi *et al*, 2013).

Descubrimientos biológicos y moleculares apuntan la estrecha relación que existe entre la htt normal y el BDNF; BDNF se encuentra co-localizado junto con la htt en las neuronas corticales que proyectan al estriado y, a pesar de que algunos reportes señalan la existencia de transcripción de RNAm de BDNF en neuronas estriatales adultas (Zuccato *et al*, 2010), otros diversos estudios han establecido que la mayor parte del BDNF estriatal (aproximadamente un 95%) es producido en corteza y transportado de forma anterógrada



a través de la vía corticoestriatal hacia las MSN (**Figura 5A**) (Altar *et al*, 1997; Alberch *et al*, 2002; Zuccato & Cattaneo, 2009; Zuccato *et al*, 2010; Samadi *et al*, 2013).

Por tanto, las MSN son dependientes del BDNF proveniente de la corteza y dependen de la integridad de la señalización estriatal (**Figura 5B**) (Zuccato & Cattaneo, 2007). Cabe destacar que el decremento en los niveles de BDNF cortical ocurre en las etapas tempranas de la enfermedad y es progresivo (Zuccato & Cattaneo, 2009), lo anterior es corroborado por diversos estudios realizados tanto en pacientes post mortem como en diferentes modelos celulares y murinos de la enfermedad, en ellos se ha observado una reducción significativa en los niveles de expresión del BDNF estriatal y cortical (Zuccato & Cattaneo, 2007; Zuccato & Cattaneo, 2009; Samadi *et al*, 2013).

Cuando existe una prolongada exposición a toxinas (la httm puede ser considerada como una toxina) se desensibiliza la capacidad de la corteza de reaccionar para dirigir ciertas modificaciones. Este proceso podría comenzar con la sobreexpresión de BDNF, como una respuesta local para proteger a la corteza de sí misma y de su blanco estriatal, sin embargo a final de cuentas existiría un decremento en la producción de BDNF cortical correlacionado con la disminución de la huntingtina normal. A saber, la httm participa reduciendo la actividad transcripcional de los promotores de BDNF, reduciendo así la transcripción génica y decrementando la producción del BDNF cortical (Zuccato & Cattaneo, 2007). Además de afectar el transporte vesicular de BDNF (Zuccato & Cattaneo, 2009; Zuccato *et al*, 2010), la httm altera la liberación del glutamato corticoestriatal (y posiblemente la de otros neurotransmisores e. g. dopamina) mediante la interrupción del transporte axonal, a largo plazo esto se traduce en excitotoxicidad (Miller & Bezprozvanny, 2010).



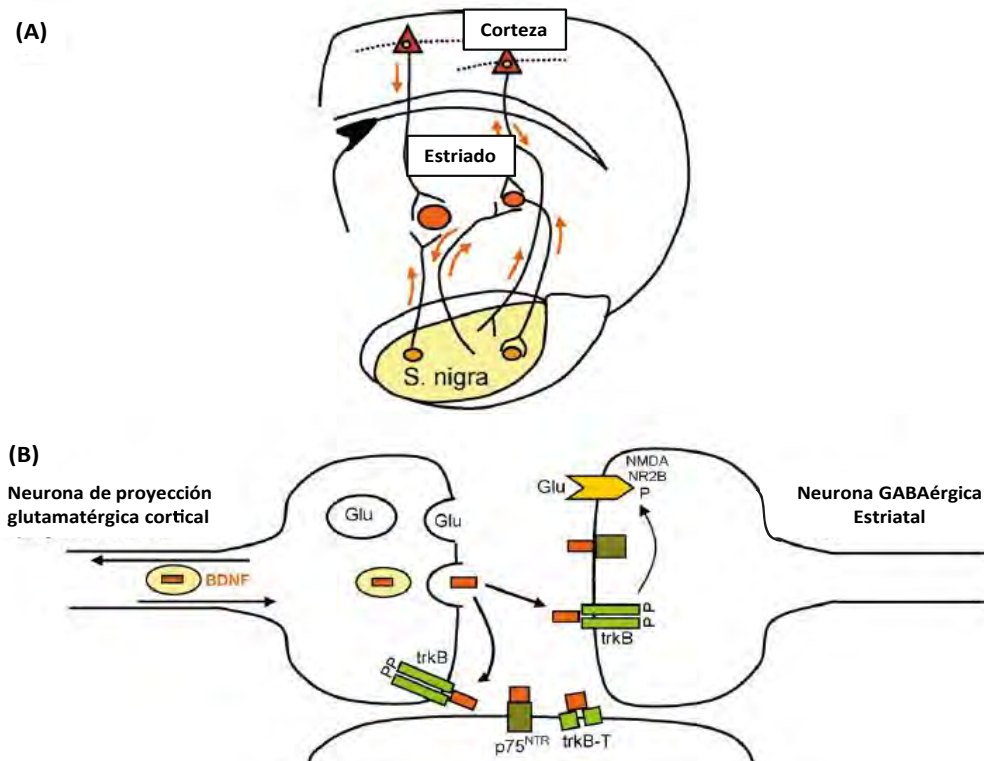


Figura 5. Esquema del BDNF en la sinapsis corticoestriatales. **(A)** BDNF presente en las vías de los GB. Las flechas naranjas indican el transporte anterógrado y retrógrado de BDNF. **(B)** Las conexiones axodendríticas entre neuronas de proyección glutamatérgicas corticales y neuronas GABAérgicas estriatales. BDNF es liberado desde la terminal presináptica en respuesta a un estímulo despolarizante, las vesículas de BDNF son difundidas a través de la hendidura sináptica para activar los receptores TrkB ubicados en la terminal postsináptica. BDNF activa, de manera autócrina, al receptor TrkB presente en la membrana plasmática de la presinapsis, incrementando de este modo la liberación de neurotransmisor (Glu) a través de distintos mecanismos (Modificado de Zuccato & Cattaneo, 2007).

1.11.2 Modelo farmacológico de la EH

La disfunción mitocondrial es una de las alteraciones observadas en la EH (Brouillet *et al*, 2005; Wu *et al*, 2010; Hernández-Echeagaray *et al*, 2012; Mendoza *et al*, 2014) y es bien sabido que la existencia de fallas asociadas a la bioenergética o al metabolismo energético se encuentran estrechamente asociadas con los mecanismos celulares que subyacen a la neurodegeneración (Espíndola *et al*, 2012); particularmente deficiencias en los complejos mitocondriales II, III y IV pudieran desempeñar un papel crucial en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas y en modelos animales de neurodegeneración (Brouillet *et al*, 1999; Halliwell, 2001; Estrada-Sánchez *et al*, 2008; Túnez *et al*, 2010; Hernández-Echeagaray *et al*, 2011; Hernández-Echeagaray *et al*, 2012).



Diversos modelos animales han tratado de explicar la histopatología que ocurre en la EH, uno de ellos consiste en la administración de ácido 3-nitropropiónico (3-NP), el cual al inhibir de manera irreversible a la SDH en el complejo II mitocondrial imita las alteraciones observadas en el cerebro post mortem de pacientes con EH. En el laboratorio ha sido observado que los animales tratados con 3-NP generan cambios en los niveles de expresión de las neurotrofinas y sus receptores (Espíndola *et al*, 2012). Así mismo la expresión de RNAm de BDNF también se ve afectada en la corteza (Zuccato & Cattaneo, 2007; Túnez *et al*, 2010; Espíndola *et al*, 2012).

El 3-NP es una toxina sintetizada de forma natural por algunas especies de hongos (*Aspergillus flavus*; *Astragalus*, *Arthrimum*) y plantas (*Indigofera endecapylla*) (Túnez *et al*, 2010); Su mecanismo de acción es mediante la inhibición específica e irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) del complejo II mitocondrial (Beal *et al*, 1993; Pang & Geddes, 1997; Brouillet *et al*, 1999; Kim *et al*, 2000; Brouillet *et al*, 2005; Wu *et al*, 2010; Hernández-Echeagaray *et al*, 2011; Espíndola *et al*, 2012; Hernández-Echeagaray *et al*, 2012; Mendoza *et al*, 2014; Brouillet, 2014).

La inhibición de la SDH desencadena una enorme reducción en la síntesis de ATP lo que conlleva a la muerte preferencial del tejido estriatal por procesos de excitotoxicidad (Beal *et al*, 1993; Pang & Geddes, 1997; Brouillet *et al*, 2005; Túnez *et al*, 2010; Hernández-Echeagaray *et al*, 2012). Conjuntamente a la deficiencia de los complejos mitocondriales, existe pérdida del potencial de membrana mitocondrial y una redistribución del citocromo C (Brouillet *et al*, 1999; Kim *et al*, 2000; Brouillet *et al*, 2005; Túnez & Santamaría, 2009; Túnez *et al*, 2010; Brouillet, 2014).

A grandes rasgos, cuando se inhibe la SDH mediante la aplicación de 3-NP se genera estrés oxidativo (EO), caracterizado por la excesiva producción de especies reactivas en oxígeno y el agotamiento de los sistemas antioxidantes endógenos. Además de haber sido observado en el modelo de 3-NP, el daño producto del EO también ha sido observado en un sinnúmero de procesos neurodegenerativos (Pang & Geddes, 1997; Kim *et al*, 2000; Halliwell, 2001; Cornelli, 2009; Túnez *et al*, 2010).

Hay que destacar que el ión calcio desempeña un papel importante durante la excitotoxicidad debido a que el 3-NP altera su homeóstasis, esto desencadena que el Ca^{2+} almacenado internamente sea liberado hacia el citosol y por consiguiente la vía Ca^{2+} /calmodulina es activada con la subsecuente producción de óxido nítrico (NO); Asimismo, el incremento de las concentraciones de Ca^{2+} extracelular promueve la apertura de canales dependientes de voltaje asociados a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), cuyo umbral y sensibilidad a ligando disminuyen con la presencia de 3-NP, promoviendo de esta manera la existencia de eventos asociados a excitotoxicidad como la activación de proteasas involucradas en procesos de muerte celular (e. g. calapaína) y la propia excitotoxicidad mediada por glutamato (Pang & Geddes, 1997; Kim *et al*, 2000; Halliwell, 2001; Brouillet *et al*, 2005; Estrada-Sánchez *et al*, 2008; André *et al*, 2010; Túnez *et al*, 2010).



Un punto importante referente a lo anterior, es que los niveles de glutamato se encuentran regulados mediante la vía de transportadores dependientes de sodio y la actividad de éstos depende en gran medida del gradiente de Na^+ transmembranal generado por la ATPasa dependiente de Na^+/K^+ (Estrada-Sánchez *et al*, 2008; Túnez *et al*, 2010). Por ende, es de esperar que un desbalance en el equilibrio y control de todos estos componentes afecte la homeóstasis glutamatérgica propiciando la activación y estimulación excesiva de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA, desencadenando así la excitotoxicidad y muerte celular (Pang & Geddes, 1997; Kim *et al*, 2000; Estrada-Sánchez *et al*, 2008; Túnez *et al*, 2010).

Otra de las alteraciones observadas al administrar 3-NP es el aumento de los niveles de DA, esto es importante debido a que se potencian los efectos tóxicos sobre las neuronas GABAérgicas es decir, la DA endógena contribuye al daño excitotóxico por medio de la inhibición de la recaptura de glutamato (Kim *et al*, 2000; André *et al*, 2010; Túnez *et al*, 2010; Gardoni & Bellone, 2015; Nieto-Mendoza & Hernández-Echeagaray, 2015), lo anterior también ha sido ampliamente observado en pacientes con EH (André *et al*, 2010; Cepeda *et al*, 2014).

En cuanto a las alteraciones en la transmisión sináptica, el 3-NP administrado en dosis subcrónicas es capaz de modificar la excitabilidad de las sinapsis corticoestriatales, disminuir la liberación de neurotransmisor y reducir los efectos moduladores de las neurotrofinas sobre la transmisión sináptica corticoestriatal (Mendoza *et al*, 2014).

Debido a lo anterior, el 3-NP es un modelo de gran utilidad pues facilita el estudio de los posibles mecanismos de degeneración estriatal asociados a déficits energéticos, además de que representa un modelo eficaz para desarrollar y poner a prueba nuevas terapias que permitan modificar el curso de la EH (Kim *et al*, 2000; Brouillet *et al*, 2005; Wu *et al*, 2010) pues, a pesar de los múltiples esfuerzos realizados por diversos grupos de investigación, aún no existe cura alguna para la EH; sin embargo, diferentes compuestos como los factores neurotróficos (e. g. BDNF) y ciertos antioxidantes están siendo considerados como posibles terapias alternativas, debido a su enorme potencial como neuroprotectores (Sari, 2011).



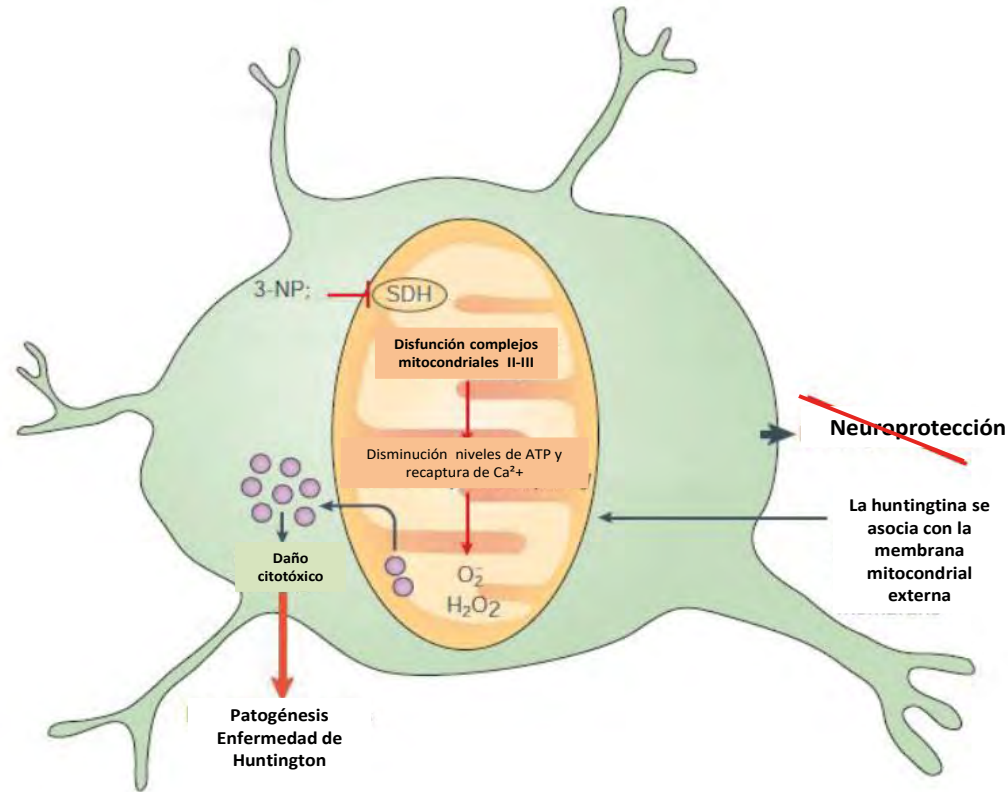


Figura 6. Esquema de la toxina mitocondrial 3-NP y su unión irreversible a la SDH que forma parte del complejo II mitocondrial. Esto desencadena una enorme reducción en la síntesis de ATP y por consiguiente se genera estrés oxidativo, caracterizado por la excesiva producción de especies reactivas en oxígeno; aunado a lo anterior existe la alteración en la homeóstasis del ion calcio y el agotamiento de los sistemas antioxidantes endógenos, estas alteraciones también han sido observadas en la EH. Se cree que ciertas moléculas son capaces de ejercer un efecto neuroprotector (Modificado de Beal & Ferrante, 2004).

1.12 Antioxidantes

Los antioxidantes exógenos proporcionados por la dieta constituyen una clase muy popular de suplementos capaces de neutralizar los radicales libres producto del EO (Halliwell, 2001; Aruoma, 2003; Cornelli, 2009; Gutteridge & Halliwell, 2010). Dentro de estos antioxidantes un grupo muy particular es el de los fitoquímicos definidos como aquellos compuestos provenientes de plantas con propiedades antioxidantes y alimenticias, muy distintas a las de las vitaminas y minerales (Revisado en Sánchez & Mendoza, 2003). Dentro de los principales fitoquímicos con actividad antioxidante comprobada se encuentran los polifenoles (Moure *et al*, 2001; Chu *et al*, 2014).

Los polifenoles son metabolitos secundarios producidos por las plantas que participan en muchas y diversas actividades biológicas esenciales para la supervivencia de las mismas.



Éstos brindan protección en contra de patógenos e insectos, además de minimizar los efectos nocivos de la luz ultravioleta. Así mismo, actúan como antioxidantes removiendo los RL producidos durante la fotosíntesis (Shakibaei *et al*, 2009; Marques *et al*, 2009; Wu *et al*, 2013; Chu *et al*, 2014; Moosavi *et al*, 2015).

La propiedad antioxidante de los polifenoles es atribuida a las estructuras químicas que poseen (Chu *et al*, 2014). En el presente estudio nos enfocaremos particularmente en el polifenol resveratrol debido a que es una molécula que ha demostrado poseer diversas propiedades biológicas. Un extenso número de evidencia sugiere que puede ser potencialmente utilizado en el tratamiento de diversas patologías con efectos secundarios moderados o nulos (Marques *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012; Wu *et al*, 2013; Tellone *et al*, 2015). Dentro de estas patologías se encuentran las enfermedades neurodegenerativas (Marques *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012; Wu *et al*, 2013; Moosavi *et al*, 2015; Tellone *et al*, 2015).

1.12.1 Resveratrol

El Resveratrol (3',4',5-trihidroxi-trans-estilbeno) es un compuesto polifenólico perteneciente a la clase de los estilbenos (Wenzel & Somoza, 2005; Marques *et al*, 2009; Shakibaei *et al*, 2009; Wu *et al*, 2013; Chu *et al*, 2014; Moosavi *et al*, 2015; Tellone *et al*, 2015). En plantas, la mayoría de los estilbenos actúan como fitoalexinas antifúngicas, compuestos usualmente sintetizados en respuesta a daño o infección (Wenzel & Somoza, 2005; Shi *et al*, 2008; Marques *et al*, 2009; Shakibaei *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012; Tellone *et al*, 2015).

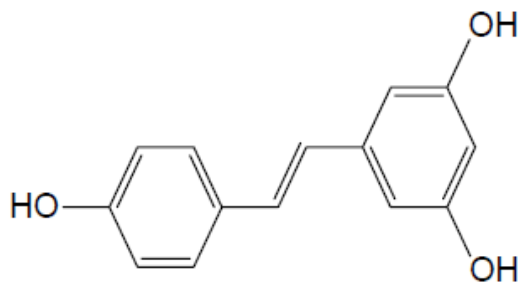


Figura 7. Estructura química del Trans-Resveratrol, la isoforma estable y biológicamente activa del Resveratrol (Tomado de Moosavi *et al*, 2015).



Las principales fuentes de Resveratrol proporcionadas por la dieta incluyen las uvas, la cáscara de las uvas, el vino, los cacahuates (Wenzel & Somoza, 2005; Shi *et al*, 2008; Shakibaei *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012; Wu *et al*, 2013; Tellone *et al*, 2015) y diferentes tipos de bayas (Marques *et al*, 2009; Wu *et al*, 2013; Tellone *et al*, 2015).

Dentro de los diversos efectos biológicos que posee el Resveratrol, destaca su habilidad como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, actividad quimiopreventiva (Wenzel & Somoza, 2005; Shi *et al*, 2008; Marques *et al*, 2009; Shakibaei *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012), efectos sobre el metabolismo, protector cardiovascular (Shi *et al*, 2008; Marques *et al*, 2009; Shakibaei *et al*, 2009), mediador de muerte celular como inhibidor/inductor de apoptosis (Shakibaei *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012), neuroprotector (Parker *et al*, 2005; Kumar *et al*, 2006; Li *et al*, 2010; Rahvar *et al*, 2011; Marques *et al*, 2009; Wu *et al*, 2013; Tellone *et al*, 2015), etc.

Debido a que los efectos neuroprotectores del Resveratrol han sido reportados en un sinnúmero de artículos, para el presente estudio nos enfocaremos en los antecedentes más relevantes.

Parker *et al* (2005), realizaron los primeros estudios utilizando modelos de citotoxicidad inducida por fragmentos de polyQ evidenciando que el tratamiento con Resveratrol, es capaz de ejercer un efecto neuroprotector tanto en neuronas de *C. elegans* como en líneas celulares derivadas del estriado de ratones knock-in HdhQ111, comprobando además que lo anterior es mediante la activación de unas enzimas denominadas sirtuinas.

Kumar *et al* (2006), probaron que el pretratamiento con Resveratrol (5-10 mg/kg) mejoró significativamente los déficits de las funciones motoras y cognitivas, además de prevenir la reducción de la actividad de la SDH y reducir el EO inducido mediante el tratamiento sistémico con 3-NP, un modelo de degeneración estriatal. A partir de estas observaciones, los autores postularon que dentro de los mecanismos de acción del Resveratrol posiblemente se encuentren involucradas la modulación y preservación de las funciones mitocondriales.

Li *et al* (2010), demostraron *in vivo* que el tratamiento crónico con Resveratrol (30 mg/kg) ejerce efecto neuroprotector en un modelo de isquemia cerebral mediante la modulación de la liberación de diversos neurotransmisores y neuromoduladores. A grandes rasgos, el estudio demostró que los efectos neuroprotectores del Resveratrol en contra de la excitotoxicidad fueron por una parte, mediante el incremento significativo en los niveles de los neurotransmisores inhibitorios GABA, Gly y Tau; y por otra parte mediante la reducción de la liberación del neurotransmisor excitatorio Glu y del neuromodulador Asp.

Rahvar *et al* (2011), evidenciaron que el Resveratrol (20 mg/kg) incrementa la expresión de RNAm de BDNF en células hipocampales de rata de manera dosis dependiente y como consecuencia ejercer un efecto neuroprotector independiente de sus propiedades antioxidantes. Con lo anterior se demuestra que el Resveratrol posiblemente sea capaz de



ejercer algunos de sus efectos benéficos mediante la modulación de numerosas vías de señalización celular y por ende mediante la interacción con las moléculas de señalización de dichas vías.

Acorde con lo anterior, Zhang *et al* (2012) mostraron que el Resveratrol produce efectos neurotróficos de manera dosis dependiente (25, 50 y 100 μ M) sobre las células dopaminérgicas en cultivos primarios de neuronas-glía a través de la liberación del GDNF y el incremento de BDNF astroglial.

Posteriormente Li *et al* (2015), demostraron que el pretratamiento con Resveratrol (40 mg/kg) restauró de manera efectiva la plasticidad sináptica en un modelo de hipoperfusión cerebral crónica debido a que éste fue capaz de rescatar la inhibición de la LTP, restaurar el deterioro de las espinas dendríticas y por ende restaurar la plasticidad sináptica al igual que el aprendizaje y memoria. Además, demostraron que este pretratamiento es capaz de incrementar la actividad de PKA y promover la fosforilación de un factor de transcripción crucial dentro de los procesos de memoria, el CREB.

En estudios recientes, Naia *et al* (2016) postulan que en cultivos primarios corticoestriatales de embriones de ratones transgénicos YAC128 y en cultivos de linfoblastoma humano derivados de pacientes con EH el tratamiento con Resveratrol (0.5-5 μ M para el primero y 1-5 μ M para el segundo) fue capaz de incrementar la actividad de la histona deacetilasa y los niveles de importantes enzimas para la homeóstasis energética, como la PGC-1 α y TFAM, incrementando de esta manera la biogénesis de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y, consecuentemente incrementando la función mitocondrial. Aún más, los autores demostraron *in vivo* que la administración de Resveratrol (1 mg/kg) por un periodo de 28 días induce la deacetilación de la histona K9H3 tanto en corteza como en estriado de ratones YAC128, mejorando de esta manera la coordinación motora de los animales. Este estudio es importante porque es el primer estudio en proveer evidencia sobre la capacidad que posee el Resveratrol de inducir la recuperación de la coordinación motora en un modelo mamífero de la EH que presenta atrofia estriatal.



2. JUSTIFICACIÓN

La EH es una enfermedad neurodegenerativa de origen genético cuya principal consecuencia es la pérdida selectiva y progresiva de las MSN GABAérgicas de proyección que conforman la región del cerebro conocida como núcleo estriado (Hernández-Echeagaray *et al*, 2012).

En el presente estudio fue utilizada la toxina mitocondrial Ácido 3-nitropropiónico (3-NP) debido a que es un modelo capaz de replicar de manera similar los síntomas neurológicos, los cambios conductuales, bioquímicos, morfológicos y neuropatológicos observados en la EH (Beal *et al*, 1993; Kim *et al*, 2000; Túnez *et al*, 2010; Hernández-Echeagaray *et al*, 2011; Brouillet, 2014; Dey & De, 2015). La gran utilidad de este modelo consiste en facilitar el estudio de los posibles mecanismos de degeneración estriatal asociados a déficits energéticos, además de representar un modelo eficaz para desarrollar y poner a prueba nuevas terapias que permitan modificar el curso de la EH (Kim *et al*, 2000; Brouillet *et al*, 2005; Wu *et al*, 2010) pues, a pesar de los múltiples esfuerzos realizados por diversos grupos de investigación, aún no existe cura alguna para la EH.

Una de estas posibles terapias alternativas es el uso de ciertas moléculas antioxidantes con potencial neuroprotector (Sari, 2011). En el presente estudio la molécula antioxidante utilizada fue el polifenol Resveratrol debido a que un extenso número de evidencia sugiere que posee diversas propiedades biológicas, así como un efecto potencialmente neuroprotector con efectos secundarios moderados o nulos (Marques *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012; Wu *et al*, 2013; Tellone *et al*, 2015).



3. HIPÓTESIS

Si el daño oxidativo se encuentra asociado a procesos y modelos de neurodegeneración, entonces el tratamiento con un antioxidante como el Resveratrol podría atenuar el proceso neurodegenerativo mediante la neuroprotección del tejido y esto a su vez podría mejorar la respuesta sináptica poblacional.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar electrofisiológicamente la actividad glutamatérgica cortico-estriatal para dilucidar si los diferentes tratamientos con el polifenol Resveratrol mejoran la respuesta sináptica poblacional en el modelo experimental de la EH inducido con ácido 3-nitropropiónico.

Específicos

- Evaluar las curvas de estimulación Intensidad-Amplitud en los diferentes tratamientos con el polifenol.
- Estudiar la actividad sináptica glutamatérgica cortico-estriatal en rebanadas tratadas con los diferentes grupos de tratamientos con el polifenol.
- Evaluar el efecto modulador del BDNF en la actividad sináptica poblacional en rebanadas provenientes del tratamiento combinado de Resveratrol y 3-NP.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental fue dividido en cuatro etapas: 1) Selección de los tratamientos, 2) Obtención del tejido cerebral, 3) Registros electrofisiológicos y 4) Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Etapas 1. Animales y Tratamientos

Todos los fármacos utilizados en el presente estudio fueron obtenidos de Sigma Aldrich (3-NP (N5636) y Resveratrol (R5010)).

Los experimentos fueron realizados de acuerdo con los reglamentos internacionales de cuidado animal. Se utilizaron ratones macho de la cepa C57/BL6 (Harlan, México) con una edad de 30-35 días de vida al inicio de cada tratamiento. Los individuos se alojaron en cajas de acrílico cristal transparente, a temperatura ambiente, con un ciclo de 12/12 horas luz/oscuridad, con libre acceso al agua y al alimento. Se formaron al azar un total de seis grupos experimentales, los cuales son descritos a continuación.

Grupo I. Animales Control

Se les administró el vehículo del fármaco (DMSO al 1% disuelto en solución PBS) vía intraperitoneal (i.p.) a la misma hora durante un periodo de 5 días. La evaluación de los registros electrofisiológicos fue realizada 48 horas posteriores a la administración de la última dosis con el vehículo.

Grupo II. Modelo de la EH inducido con ácido 3-NP

La toxina mitocondrial 3-NP fue disuelta en solución PBS y administrada vía i.p. a una concentración de 15 mg/kg durante un periodo de 5 días. La dosis utilizada fue acorde con el protocolo experimental del laboratorio sustentado por estudios previos en los que se establece que dicha concentración es suficiente para generar daño en el tejido estriatal sin embargo, no es suficiente para generar alteraciones motoras (Rodríguez *et al*, 2010; Hernández-Echeagaray *et al*, 2012). Lo anterior es de suma importancia debido a que estas bajas dosis subcrónicas nos permiten replicar las etapas tempranas de la EH.

La evaluación de los registros electrofisiológicos fue realizada 48 horas posteriores a la administración de la última dosis con la toxina. Este diseño experimental permitió asegurar que el 3-NP ya no se encontraba presente y que el daño que estaba siendo evaluado era producto de la inhibición mitocondrial. Si las evaluaciones hubieran sido realizadas en presencia de 3-NP, es altamente probable que los efectos isquémicos de la neurotoxina hubiesen sido evaluados y no el daño neuronal producto de la inhibición mitocondrial (Mendoza *et al*, 2014).

Grupo III. Tratamiento con Resveratrol

El antioxidante (20 mg/kg) fue disuelto en una solución PBS y DMSO al 1%, lo anterior de acuerdo con el diseño experimental realizado por Nagai *et al* en 2014; Debido a la



fotosensibilidad que posee el Resveratrol (Shi *et al*, 2008) en todos y cada uno de los tratamientos individuales y conjuntos, la dosis fue preparada al momento del tratamiento en un tubo eppendorf ámbar y posteriormente fue administrada i.p. El periodo de tratamiento con el antioxidante fue de 5 días y 48 horas después de la última dosis se realizaron los registros electrofisiológicos.

Grupo IV. Tratamiento combinado de Resveratrol (20 mg/kg) y 3-NP (15 mg/kg)

La toxina y el antioxidante fueron administrados i.p. a la par por un periodo de 5 días y 48 horas después se realizaron los registros electrofisiológicos.

Grupo V. Pretratamiento Resveratrol (20 mg/kg) y post 3-NP (15 mg/kg)

El antioxidante fue administrado i.p. por un periodo de 5 días y 24 horas después de la última dosis con Resveratrol, a los individuos se les administró 3-NP por 5 días más. Dos días después de la última dosis con 3-NP se realizaron los registros electrofisiológicos.

Grupo VI. Pretratamiento Resveratrol (20 mg/kg) y tratamiento conjunto Resveratrol (20 mg/kg)+ 3-NP (15 mg/kg)

El Resveratrol fue administrado i.p. a los individuos por un periodo de 5 días y 24 horas después de la última dosis con Resveratrol se les administró conjuntamente por 5 días más Resveratrol y 3-NP. A las 48 horas después de la última dosis conjunta de Resveratrol y 3-NP se realizaron los registros electrofisiológicos.

Etapa 2. Obtención del tejido cerebral

Para la obtención del tejido cerebral los ratones fueron colocados en una cámara de anestesia, la cual contenía una torunda empapada con éter; después de la anestesia los ratones fueron sacrificados por decapitación y se procedió a extraer el cerebro. Una vez extraído el cerebro, éste fue inmerso en una solución fisiológica artificial saturada con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ (pH 7.4) a una temperatura de 4 °C. La finalidad de dicha solución fue la de simular el líquido cerebro-espinal, el contenido de ésta fue: CaCl₂ (2mM), NaCl (125 mM), KCl (3mM), MgCl₂ (1 mM), NaHCO₃ (26 mM), ácido ascórbico (0.2 mM), tiourea (0.2 mM) y glucosa (10 mM). Los bulbos olfatorios y el cerebelo fueron desechados, mientras que los hemisferios cerebrales fueron separados y colocados en el vibratomo (Pelco© 102, 1000 Plus, USA), todo el tiempo se mantuvieron inmersos en la solución anteriormente mencionada. A partir de cortes sagitales se obtuvieron rebanadas de 400 µm de espesor. Las rebanadas que contenían estriado y corteza cerebral fueron incubadas en solución fisiológica a temperatura ambiente y oxigenación constante por un periodo aproximado de 60 minutos, esto antes de ser llevadas a la cámara de registro electrofisiológico.

Etapa 3. Registros electrofisiológicos

En la cámara de registro electrofisiológico las rebanadas se mantuvieron bajo el influjo constante de la solución fisiológica oxigenada y a una temperatura aproximada de 32-34°



C. Adicionalmente fueron agregados 10 μM de bicuculina con la finalidad de inhibir la transmisión GABAérgica inhibitoria. En la cámara de registro, dos electrodos (uno de estimulación y uno de registro) fueron colocados sobre la rebanada con una distancia aproximada de 0.3-0.5 mm entre sí. El electrodo de estimulación fue colocado cerca del cuerpo calloso y el electrodo de registro fue colocado en la parte dorsal del núcleo estriado (**Figura 8A**).

3.1 Método de registro de Potenciales de campo

El registro de potenciales de campo es una herramienta electrofisiológica comúnmente utilizada para estudiar respuestas excitatorias en tejido cerebral; éstos son registros extracelulares de corrientes iónicas asociadas con la actividad de un grupo o población de neuronas (Bargas *et al*, 1999). Por consiguiente, todos los registros fueron realizados con la finalidad de observar cambios en las corrientes iónicas, llamadas espigas poblacionales o potenciales de campo.

Al realizar cada uno de los registros, la intensidad del estímulo seleccionada fue la implementada para evaluar la modulación sináptica. Dicha intensidad fue el 50% de la corriente que produjo la respuesta máxima, para ello fueron realizadas curvas intensidad amplitud. Una vez que se determinó la intensidad de la corriente se procedió a evaluar la respuesta sináptica con el protocolo de estimulación por pulsos pareados.

3.2 Método para evaluar la modulación presináptica: Protocolo por pulsos pareados

Para evaluar la inhibición y la facilitación presinápticas o ambas, fue implementado el protocolo de facilitación por pulsos pareados, el cual consiste en dos estímulos de igual magnitud (intensidad y duración) separados por una corta ventana de tiempo; en los experimentos realizados fue de aproximadamente de 50 milisegundos (ms) cada uno (**Figura 8B**).

En todos los casos, una vez aislada la actividad GABAérgica y estabilizada la respuesta sináptica glutamatérgica, ésta fue grabada por un lapso de aproximadamente 25 minutos como control. En cuanto al Grupo IV una vez concluido este lapso se procedió a evaluar la respuesta sináptica en presencia de la neurotrofina BDNF a una concentración de 50 ng/mL.

3.2.1 Apreciaciones metodológicas para comprender el protocolo por pulsos pareados

Este protocolo es una forma de plasticidad sináptica a corto plazo resultado de la probabilidad de liberación del neurotransmisor en respuesta a dos estímulos dados muy cercanos en el tiempo que puede ser explicado de acuerdo a la "Teoría del calcio residual. El protocolo básicamente postula que un primer estímulo genera una respuesta a la que llamamos S1, la cual es generada principalmente como resultado de la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, dichos canales se ubican en la presinapsis y ocasionan un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, lo que a su vez propicia que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana y el neurotransmisor sea liberado al espacio sináptico por medio de exocitosis. Debido a que los sistemas de



recaptura del Ca^{2+} son más lentos que el transporte por medio de canales dependientes de voltaje, al aplicar un segundo estímulo S2, este generalmente poseerá una mayor amplitud pues el Ca^{2+} del segundo estímulo es integrado (sumado) al primero, así la entrada de Ca^{2+} es mayor en la segunda respuesta, y por consiguiente existe una mayor probabilidad de liberación del neurotransmisor; a esto se le llama facilitación por pulso pareado. La contraparte de esta facilitación por pulso pareado (PPF, por sus siglas en inglés) es la depresión por pulso pareado (PPD, por sus siglas en inglés), que ocurre cuando la intensidad del primer estímulo es demasiado grande, esto quiere decir que el Ca^{2+} que entra con el primer estímulo agota el contenido de las vesículas que contienen al neurotransmisor, de tal manera que cuando se aproxima un segundo estímulo no hay más neurotransmisor que pueda ser liberado y se genera la depresión.

La existencia de un cambio en la relación de la respuesta sináptica evocada por el pulso pareado es aceptado como una indicación de modificaciones presinápticas de la transmisión sináptica (e. g. incremento o decremento en la liberación de neurotransmisor) (Katz & Miledi, 1968).

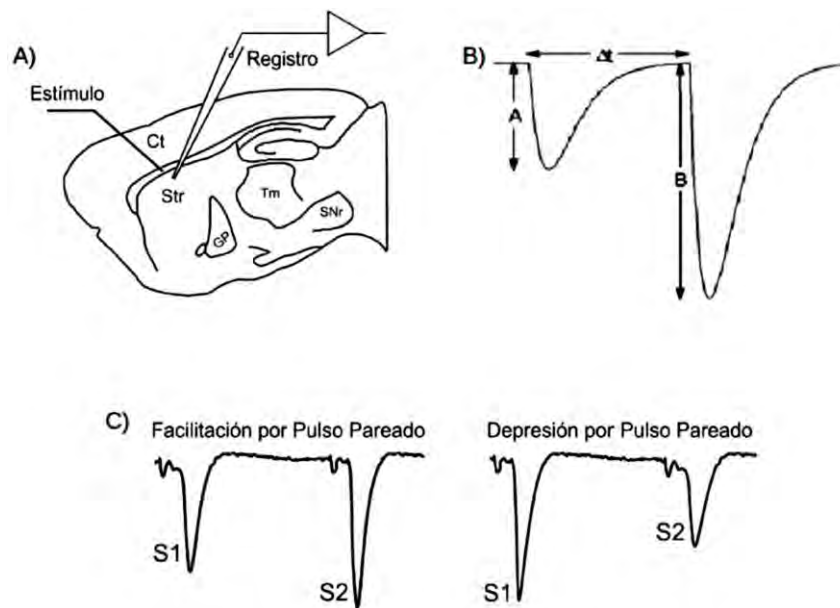


Figura 8. Esquema representativo del registro electrofisiológico de los potenciales de campo y algunos de sus componentes. En **A** se observa del lado izquierdo un electrodo de estimulación posicionado sobre el cuerpo calloso con la finalidad de estimular las aferencias provenientes de la corteza (Ct) que llegan al núcleo estriado (Str); Así mismo, sobre el estriado dorsal se observa el electrodo encargado de registrar los potenciales de campo. En **B** se esquematiza el protocolo por pulso pareado en el cual ambas espigas (A y B) representan respuestas sinápticas obtenidas dando dos estímulos de igual magnitud, separados por una corta ventana de tiempo. En **C** se ejemplifica la facilitación y la depresión por pulso pareado. Como puede observarse durante la PPF la amplitud de la segunda respuesta (S2) es mayor que la primera (S1) mientras que durante la PPD la amplitud de la segunda respuesta es menor que la primera (Tomado de Vivar Cortés, 2016).



Etapla 4. Análisis de los datos obtenidos

Los datos obtenidos a partir de los registros electrofisiológicos fueron procesados, analizados y graficados con el software Origin 9.1 (USA). De acuerdo a la naturaleza de los datos, éstos fueron analizados: para datos paramétricos se utilizaron la Prueba t de dos colas, Análisis de Varianza (ANOVA), Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y el Método de comparaciones múltiples Holm-Sidak. La significancia estadística fue establecida en $p < 0.050$.

Las gráficas de los cursos temporales fueron obtenidas normalizando al 100% el número de experimentos de cada grupo, mientras que las gráficas de las curvas intensidad vs amplitud se obtuvieron graficando los promedios de cada grupo con su respectivo error estándar.



6. RESULTADOS

Cada registro de los potenciales de campo se obtuvo estimulando la zona dorsal del núcleo estriado; con la finalidad de aislar la actividad glutamatérgica proveniente de la corteza, se utilizó un antagonista de los receptores GABA_A llamado bicuculina a una concentración de 10 μ M.

Previo a cualquier evaluación, en cada uno de los experimentos se realizó una curva intensidad vs amplitud (**Figura 9**) con la finalidad de poder determinar la relación entre la intensidad del estímulo y la magnitud de la respuesta, con base en lo anterior se pudo determinar la intensidad umbral y de saturación. En todos los casos se aplicó una corriente *in crescendo* hasta encontrar el nivel de respuesta máximo; cabe señalar que la cantidad de corriente aplicada fue variable según el tratamiento. El motivo para realizar estas curvas es debido a que se requería conocer el umbral de estimulación necesario para obtener la amplitud media de las espigas poblacionales y con lo anterior asegurar que la respuesta no se encontraba saturada al momento de realizar alguna evaluación como la realizada con el Grupo IV.

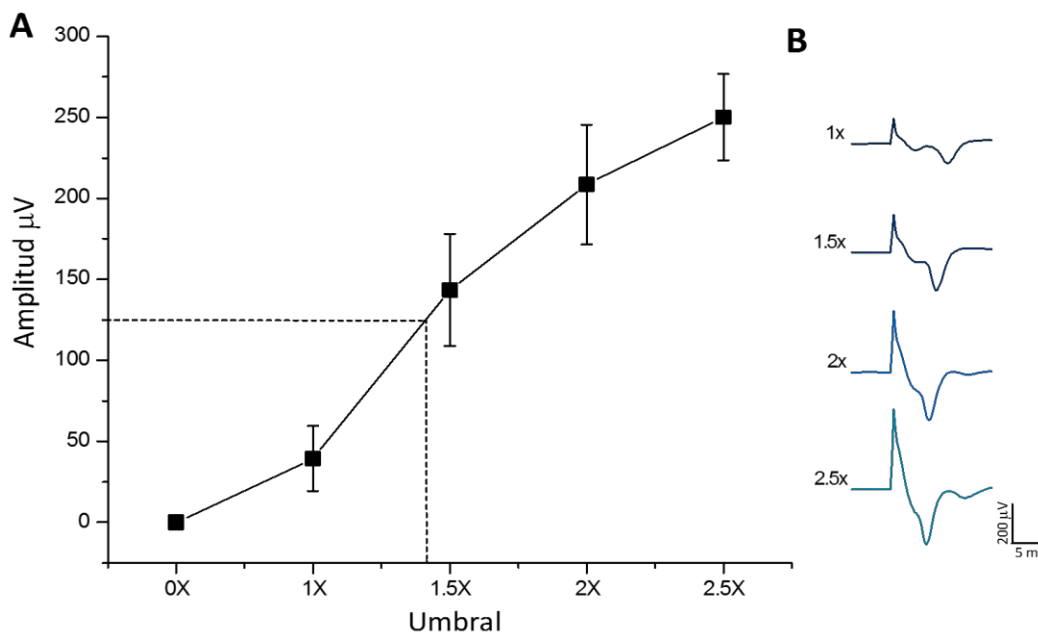


Figura 9. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta: Grupo Control. En **A)** se observa la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 del Grupo control (Grupo I). La intensidad de la respuesta se encuentra expresada en múltiplos umbral señalados con la letra "x", mientras que la amplitud se encuentra expresada en μ V. Las líneas punteadas indican la intensidad necesaria para producir la mitad de la amplitud máxima. En **B)** se observan los trazos representativos de la curva intensidad vs amplitud, del lado izquierdo se muestran los múltiplos umbral a los que corresponde cada trazo ($n=4$; Prom \pm ES).



Registro de la actividad glutamatérgica cortico-estriatal en los diferentes tratamientos y pre tratamientos con el polifenol Resveratrol

Posterior a determinar el umbral de estimulación necesario para obtener la amplitud media de las espigas poblacionales en cada uno de los tratamientos, se realizaron cursos temporales control para asegurar que el tejido se encontraba en buen estado y era capaz de mantener una amplitud estable a través del tiempo.

En la **Figura 10** pueden apreciarse la curva intensidad vs amplitud, el curso temporal y los trazos representativos del Grupo I o control. La **Figura 11** ilustra la curva intensidad vs amplitud, el curso temporal y los trazos representativos del Grupo tratado con 3-NP (Grupo II). En la **Figura 12** se observan la curva intensidad vs amplitud, el curso temporal y los trazos representativos del Grupo tratado únicamente con Resveratrol (Grupo III). En la **Figura 13** se muestran la curva intensidad vs amplitud, el curso temporal y los trazos representativos del Grupo conjuntamente tratado con Resveratrol y 3-NP (Grupo IV). La **Figura 14** muestra la curva intensidad vs amplitud, el curso temporal y los trazos representativos del Grupo pretratado con Resveratrol y pos tratado con 3-NP (Grupo V). Finalmente, en la **Figura 15** se muestra la curva intensidad vs amplitud, el curso temporal y los trazos representativos del Grupo pretratado con Resveratrol y pos tratado conjuntamente con Resveratrol y 3-NP (Grupo VI).

Con base en los datos obtenidos a partir de las curvas intensidad vs amplitud de cada uno de los diferentes grupos tratados, se realizaron análisis comparativos de los voltajes requeridos para generar los diferentes umbrales (**Tabla 1**). En la **Figura 16** se muestra la curva intensidad vs amplitud de la respuesta de los diferentes tratamientos realizados con el polifenol Resveratrol.



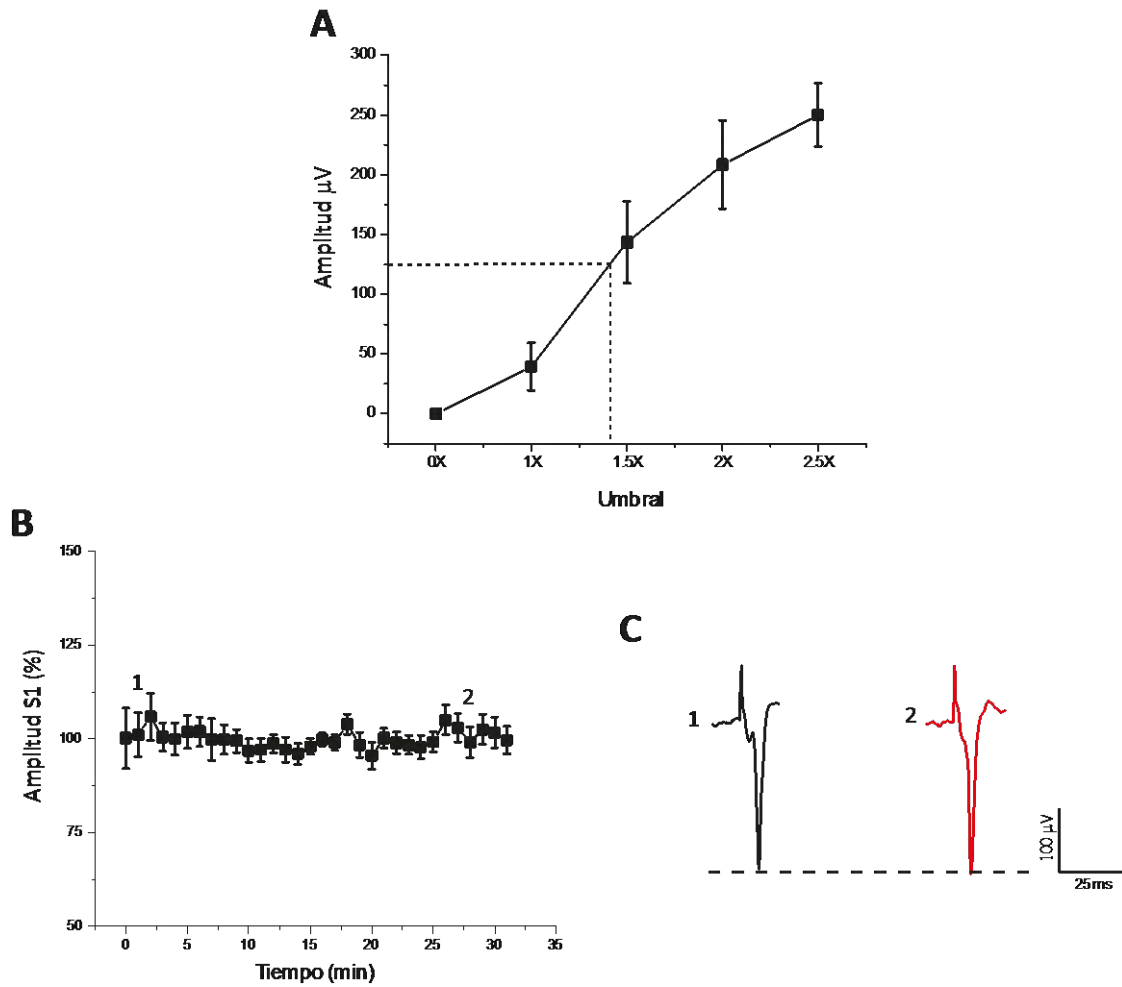


Figura 10. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta y Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo I Control. En **A)** se observa la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 del Grupo I. La intensidad de la respuesta se encuentra expresada en múltiplos umbral señalados con la letra “x”, mientras que la amplitud se encuentra expresada en µV. Las líneas punteadas indican la intensidad necesaria para producir la mitad de la amplitud máxima. En **B)** se muestra el curso temporal de las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje. En **C)** se muestran los trazos representativos del curso temporal. Los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo. Como puede apreciarse, dichas espigas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo (n=9; Prom±ES).



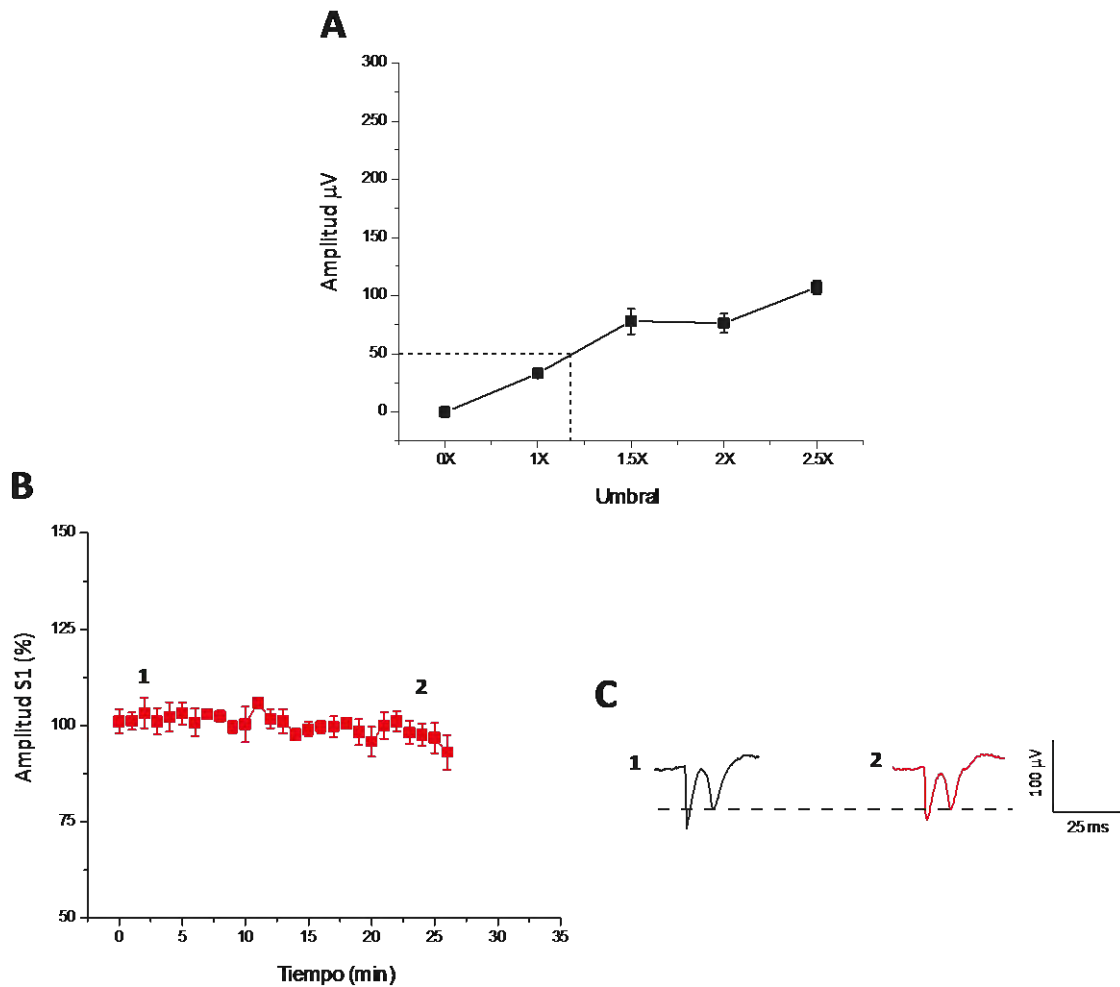


Figura 11. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta y Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo II tratado con la toxina mitocondrial 3-NP (15 mg/kg). En A) se observa la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 del Grupo II. La intensidad de la respuesta se encuentra expresada en múltiplos umbral señalados con la letra “x”, mientras que la amplitud se encuentra expresada en µV. Las líneas punteadas indican la intensidad necesaria para producir la mitad de la amplitud máxima. En B) se muestra el curso temporal de las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje. En C) se muestran los trazos representativos del curso temporal. Los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo. Como puede apreciarse, dichas espigas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo (n=5; Prom±ES).



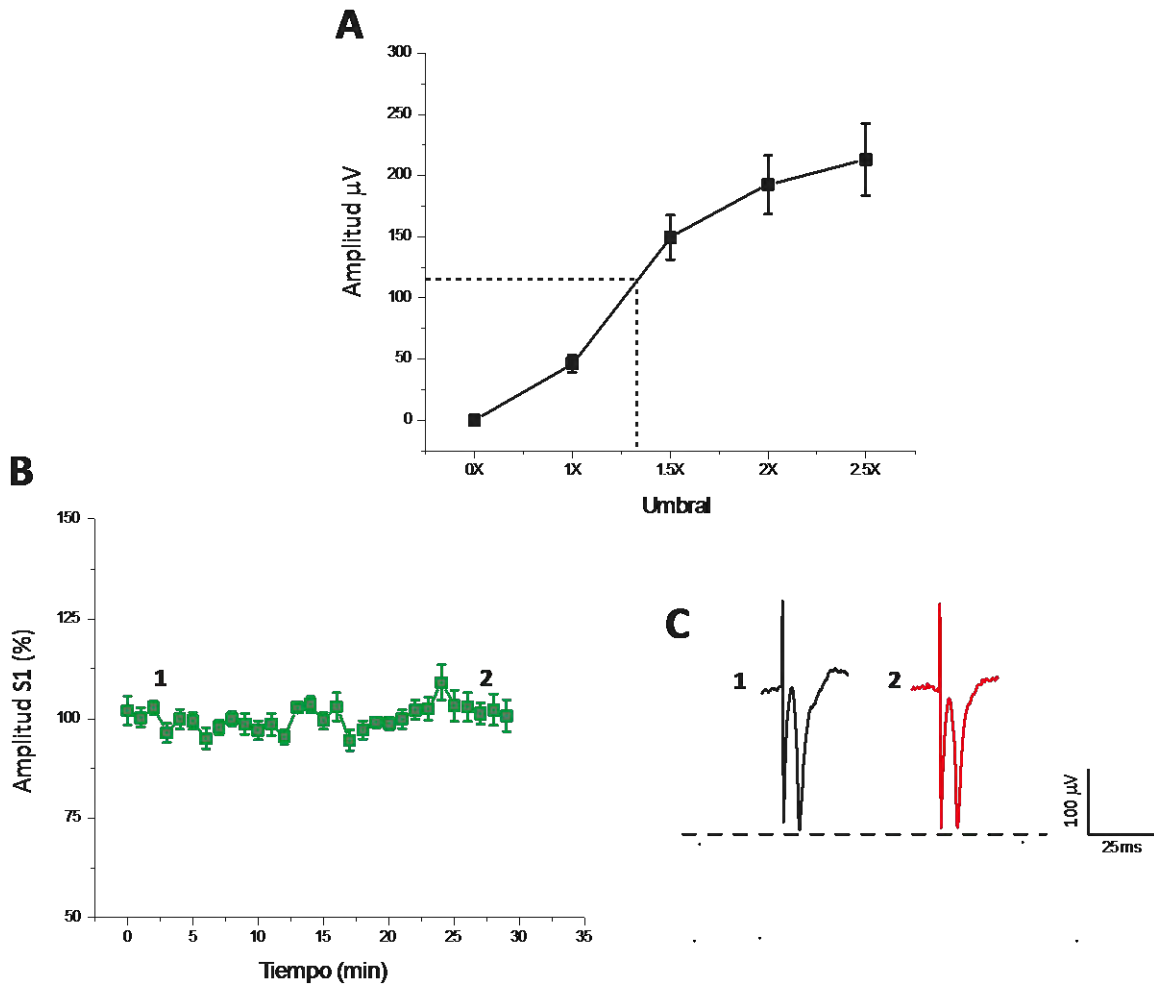


Figura 12. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta y Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo III tratado con Resveratrol (20 mg/kg). En **A)** se observa la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 del Grupo III. La intensidad de la respuesta se encuentra expresada en múltiplos umbral señalados con la letra "x", mientras que la amplitud se encuentra expresada en μV . Las líneas punteadas indican la intensidad necesaria para producir la mitad de la amplitud máxima. En **B)** se muestra el curso temporal de las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje. En **C)** se muestran los trazos representativos del curso temporal. Los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo. Como puede apreciarse, dichas espigas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo ($n=10$; Prom \pm ES).



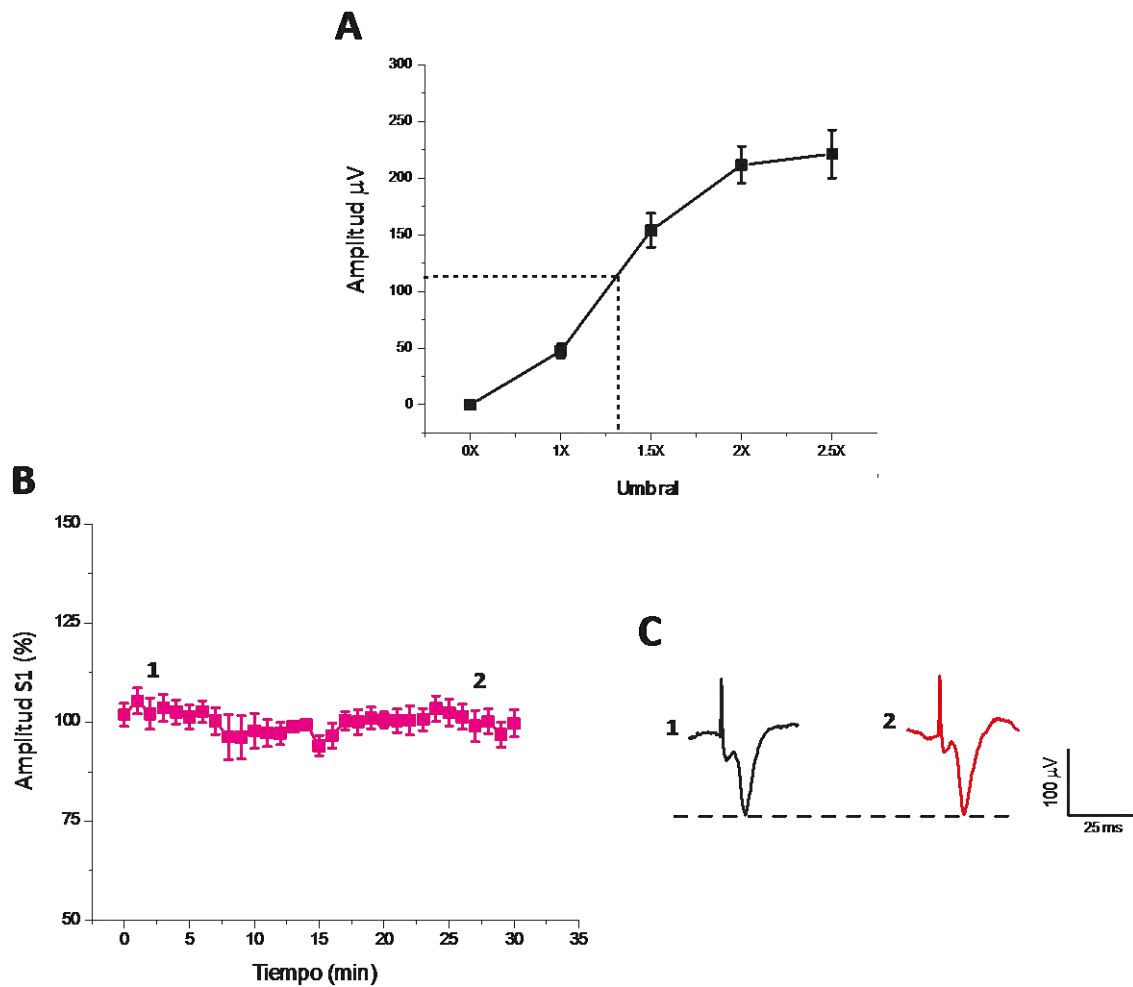


Figura 13. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta y Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo IV conjuntamente tratado con Resveratrol (20 mg/kg) y 3-NP (15 mg/kg). En **A**) se observa la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 del Grupo IV. La intensidad de la respuesta se encuentra expresada en múltiplos umbral señalados con la letra “x”, mientras que la amplitud se encuentra expresada en μV . Las líneas punteadas indican la intensidad necesaria para producir la mitad de la amplitud máxima. En **B**) se muestra el curso temporal de las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje. En **C**) se muestran los trazos representativos del curso temporal. Los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo. Como puede apreciarse, dichas espigas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo (n=10; Prom \pm ES).



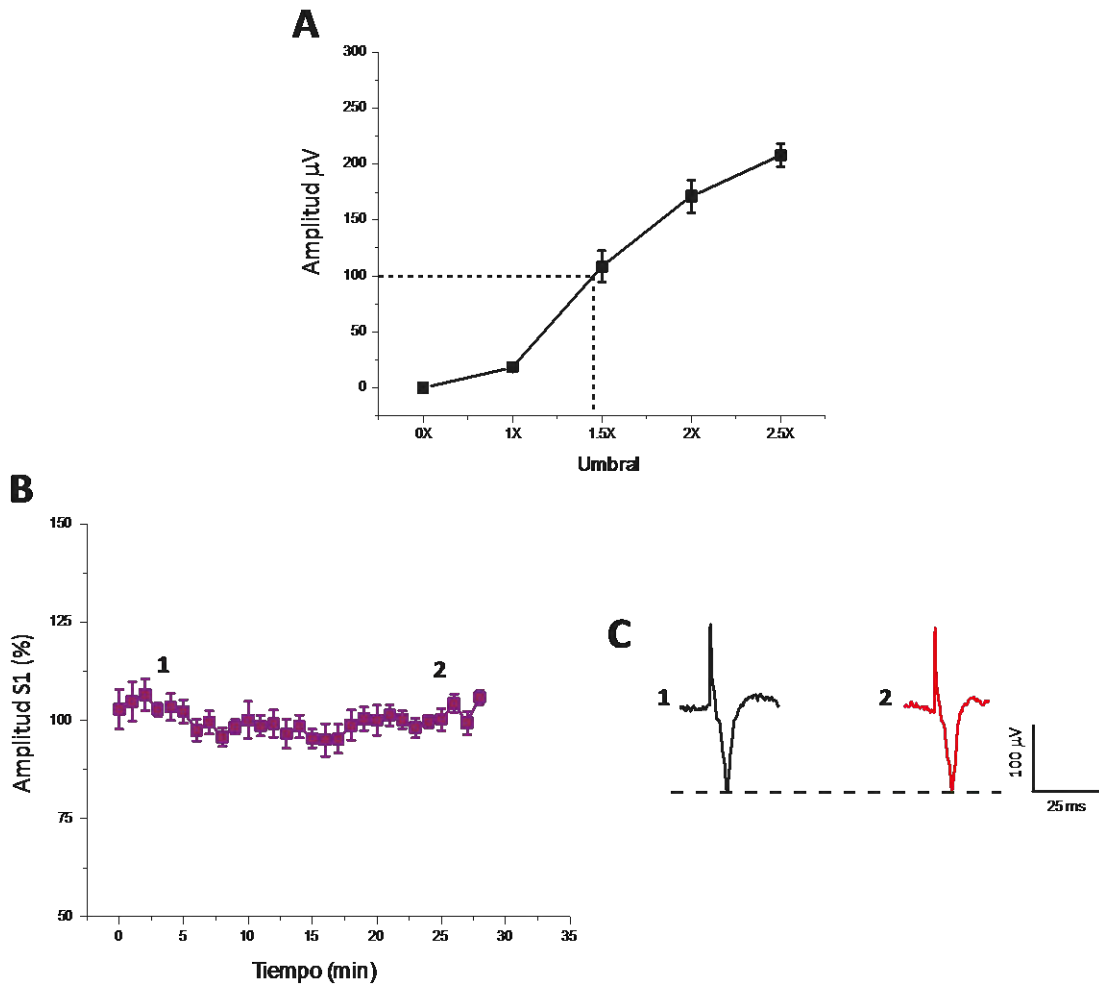


Figura 14. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta y Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo V pretratado con Resveratrol (20 mg/kg) y pos tratado con 3-NP (15 mg/kg). En **A)** se observa la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 del Grupo V. La intensidad de la respuesta se encuentra expresada en múltiplos umbral señalados con la letra “x”, mientras que la amplitud se encuentra expresada en μV . Las líneas punteadas indican la intensidad necesaria para producir la mitad de la amplitud máxima. En **B)** se muestra el curso temporal de las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje. En **C)** se muestran los trazos representativos del curso temporal. Los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo. Como puede apreciarse, dichas espigas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo ($n=8$; Prom \pm ES).



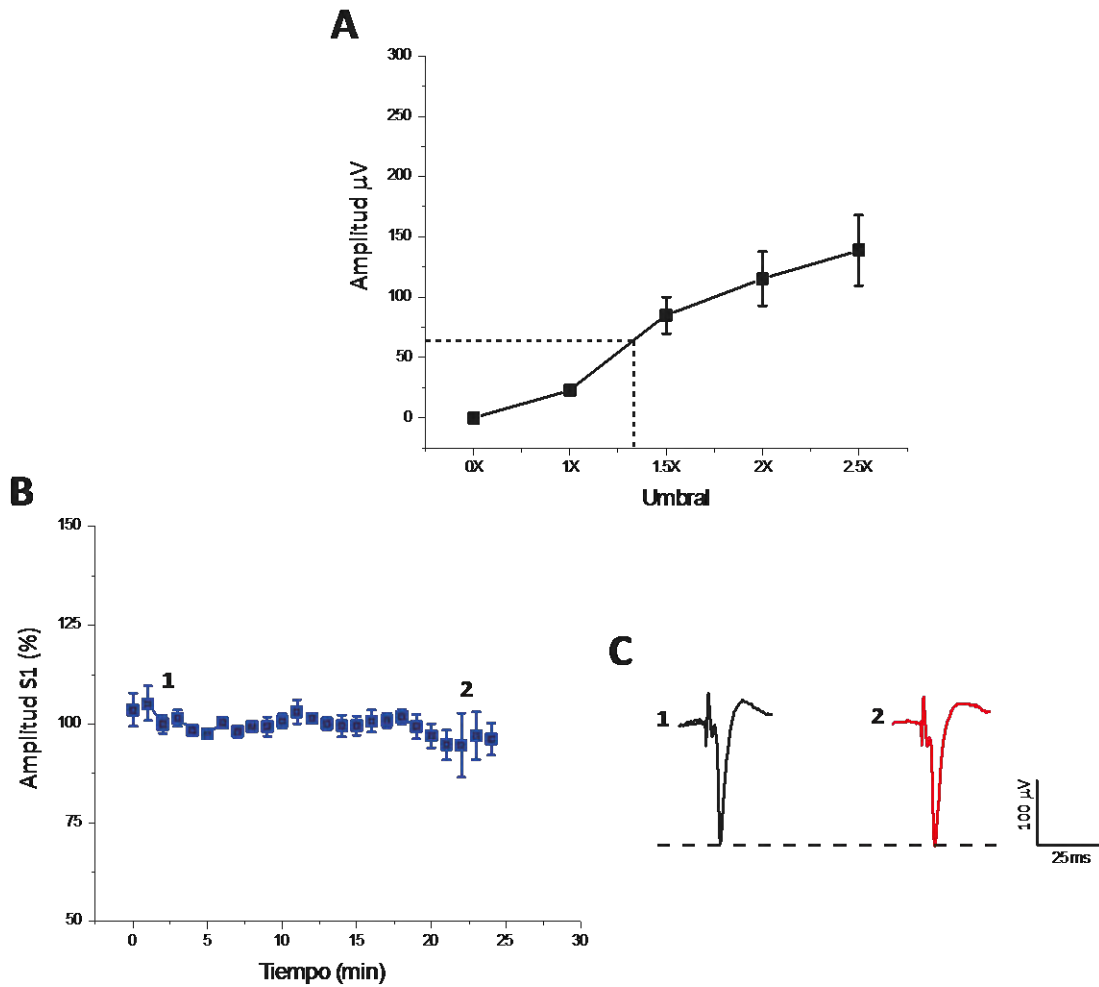


Figura 15. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta y Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo VI pretratado con Resveratrol (20 mg/kg) y pos tratado conjuntamente con Resveratrol (20 mg/kg) y 3-NP (15 mg/kg). En **A**) se observa la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 del Grupo VI. La intensidad de la respuesta se encuentra expresada en múltiplos umbral señalados con la letra “x”, mientras que la amplitud se encuentra expresada en µV. Las líneas punteadas indican la intensidad necesaria para producir la mitad de la amplitud máxima. En **B**) se muestra el curso temporal de las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje. En **C**) se muestran los trazos representativos del curso temporal. Los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo. Como puede apreciarse, dichas espigas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo (n=6; Prom±ES).



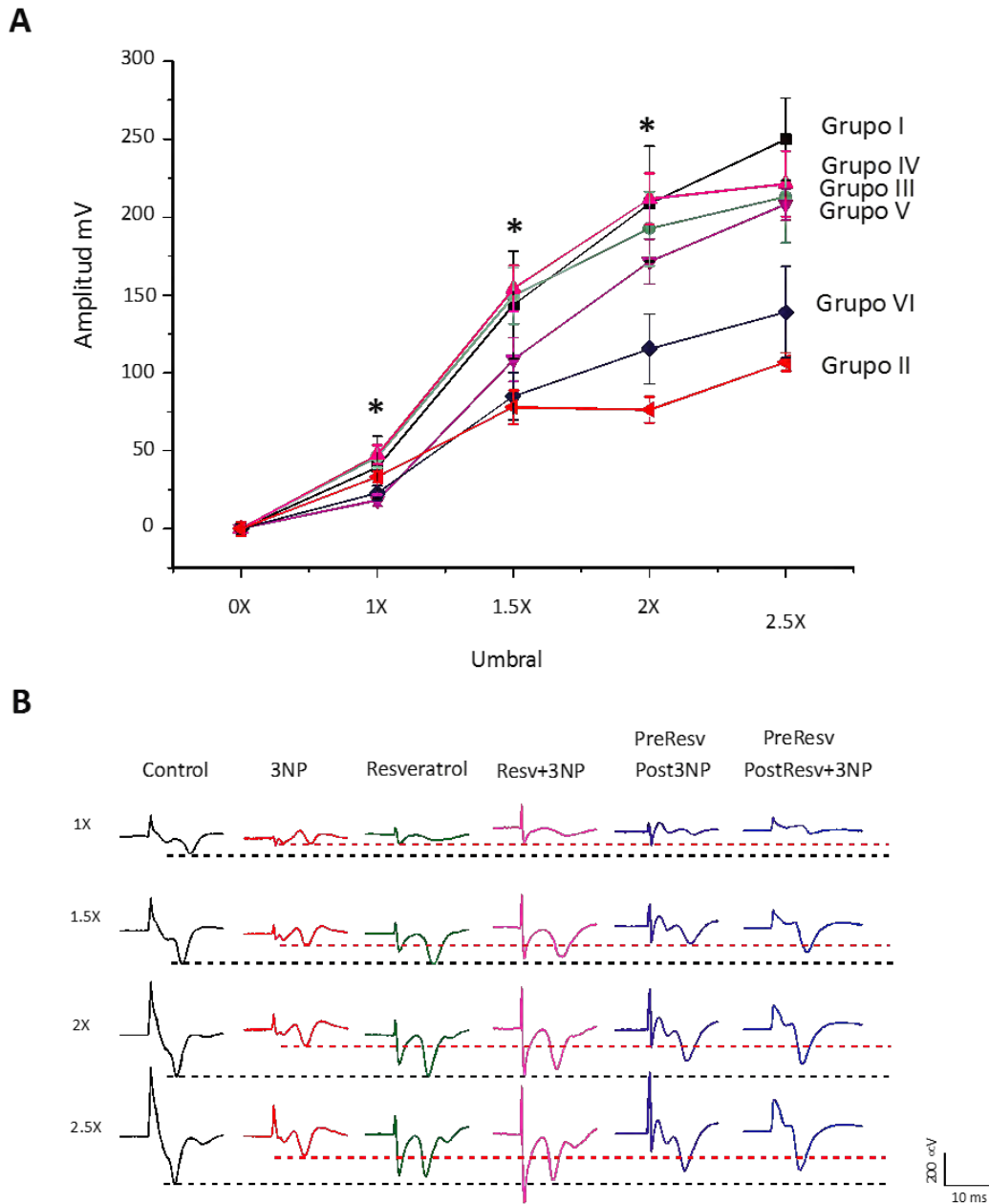


Figura 16. Curva intensidad vs amplitud de la respuesta de los diferentes tratamientos realizados con el polifenol Resveratrol. En **A**) podemos observar la intensidad necesaria para evocar la amplitud máxima de los potenciales poblacionales S1 de cada uno de los tratamientos realizados; *Diferente significativamente con respecto al control, $p < 0.050$. En **B**) se aprecian los trazos representativos de cada uno de los diferentes tratamientos. Del lado izquierdo observamos la intensidad de la respuesta expresada en múltiplos umbral señalados con la letra "x". En la parte inferior derecha observamos la amplitud expresada en μ V y el tiempo expresado en ms. En color negro se muestra el Grupo I (n=4; Prom \pm ES), en rojo se observa el Grupo II (n=6; Prom \pm ES), en verde se muestra el Grupo III (n=11; Prom \pm ES), en rosa se puede observar el Grupo IV (n=17; Prom \pm ES), en violeta se muestra el Grupo V (n=9; Prom \pm ES) y finalmente en azul se aprecia el Grupo VI (n=5; Prom \pm ES). Las líneas punteadas en color negro indican comparación con respecto al control, mientras que las líneas punteadas en color rojo indican comparación con respecto al 3-NP.



El análisis por método de comparación múltiple entre los diferentes tratamientos vs Grupo Control (**Figura 17; Tabla 1**), arroja como resultado que existe diferencia significativa entre los voltajes requeridos para generar 1x del Grupo III y el Grupo V ($F_{5, 46} = 2.665$; $p < 0.034$; $n = 11$, Resveratrol: 47.809 ± 7.556 vs $n = 9$, PreResveratrol/Post3-NP: 18.222 ± 3.677 ; $p < 0.050$). Por otra parte, el análisis indica que existe diferencia significativa para generar 1.5x únicamente entre el Grupo IV y el Grupo II ($F_{5, 46} = 2.902$; $p < 0.023$; $n = 17$, Resveratrol y 3-NP: 154 ± 14.794 vs $n = 6$, 3-NP: 77.889 ± 10.872 ; $p < 0.050$). De igual manera, el análisis indica que existe diferencia significativa para generar 2x entre los grupos: Grupo I y Grupo II ($F_{5, 46} = 4.911$; $p < 0.001$; $n = 4$, Control: 214.750 ± 39.390 vs $n = 6$, 3-NP: 76.321 ± 8.427 ; $p < 0.050$); Grupo II y Grupo III ($F_{5, 46} = 4.911$; $p < 0.001$; $n = 6$, 3-NP: 76.321 ± 8.427 vs $n = 11$, Resveratrol: 197.127 ± 25.655 ; $p < 0.050$); Grupo III y Grupo IV ($F_{5, 46} = 4.911$; $p < 0.001$; $n = 11$, Resveratrol: 197.127 ± 25.655 vs $n = 17$, Resveratrol y 3-NP: 211.705 ± 16.323 ; $p < 0.050$). Finalmente, haciendo comparaciones entre las medias de los voltajes requeridos para generar 2.5x en los grupos I y II, el análisis indica que existe diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.0232$).

El análisis por método de comparación múltiple entre los diferentes tratamientos vs Grupo 3-NP (**Figura 17; Tabla 1**), arroja como resultado que no existe diferencia significativa entre los voltajes requeridos para generar 1x ($F_{5, 46} = 2.665$; $p < 0.034$). Por otra parte, el análisis indica que sí existe diferencia significativa para generar 1.5x entre los grupos: Grupo II y Grupo III ($F_{5, 46} = 2.902$; $p < 0.023$; $n = 6$, 3-NP: 77.889 ± 10.872 vs $n = 11$, Resveratrol: 154.036 ± 19.056 ; $p < 0.050$); Grupo II y Grupo IV ($F_{5, 46} = 2.902$; $p < 0.023$; $n = 6$, 3-NP: 77.889 ± 10.872 vs $n = 17$, Resveratrol y 3-NP: 154.137 ± 14.794 ; $p < 0.050$). De igual manera, el análisis indica que existe diferencia significativa para generar 2x entre casi todos los grupos: Grupo I y Grupo II ($F_{5, 46} = 4.911$; $p < 0.001$; $n = 4$, Control: 214.750 ± 39.39 vs $n = 6$, 3-NP: 76.321 ± 8.427 ; $p < 0.050$); Grupo II y Grupo III ($F_{5, 46} = 4.911$; $p < 0.001$; $n = 6$, 3-NP: 76.321 ± 8.427 vs $n = 11$, Resveratrol: 197.127 ± 25.655 ; $p < 0.050$); Grupo II y Grupo IV ($F_{5, 46} = 4.911$; $p < 0.001$; $n = 6$, 3-NP: 76.321 ± 8.427 vs $n = 17$, Resveratrol y 3-NP: 211.705 ± 16.323 ; $p < 0.050$); Grupo II y Grupo V ($F_{5, 46} = 4.911$; $p < 0.001$; $n = 6$, 3-NP: 76.321 ± 8.427 vs $n = 9$, PreResveratrol/Post3-NP: 171.444 ± 14.433 ; $p < 0.050$). Finalmente, el análisis indica que no existe diferencia significativa para generar 2.5x entre ningún grupo ($F_{5, 29} = 2.172$; $p < 0.085$).



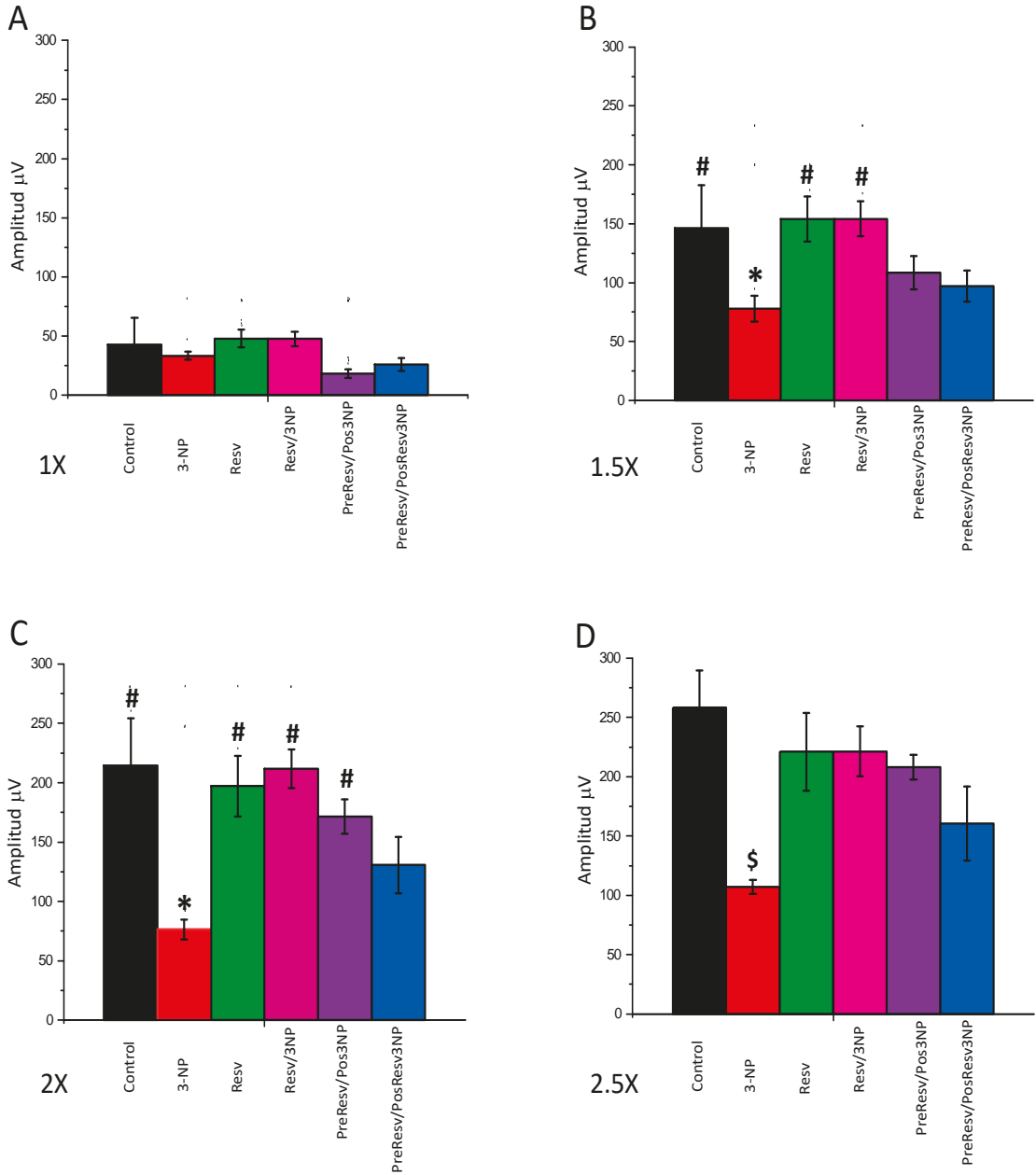


Figura 17. Gráfica de barras de las diferentes curvas intensidad vs amplitud de la respuesta de los diferentes tratamientos realizados con el polifenol Resveratrol. En **A)** podemos observar la diferencia que existe entre los voltajes requeridos para generar 1x en cada uno de los distintos tratamientos. En **B)** se muestra la diferencia que existe entre los voltajes requeridos para generar 1.5x de cada uno de los distintos tratamientos. En **C)** se aprecia la diferencia que existe entre los voltajes requeridos para generar 2x entre los diferentes tratamientos. Finalmente en **D)** se observa la diferencia que existe entre los voltajes requeridos para generar 2.5x en cada uno de los distintos tratamientos. *Diferencia significativa respecto al control, $p < 0.050$; #Diferencia significativa respecto a 3-NP, $p < 0.050$; \$Diferencia significativa respecto al control, $p < 0.0232$.



Grupo	Tratamiento	N	1X	1.5X	2X	2.5X
			Prom ± ES	Prom ± ES	Prom ± ES	Prom ± ES
I	Control	4	42.5±22.9	146±36.2	214±39.3	258.5±31
II	3-NP	6	33.27±3.4	77.8±10.8	76±8.4	107±5.9
III	Resveratrol	11	47.8±7.55	154±19	197.1±25.6	221±32.6
IV	Resveratrol y 3-NP	17	47.4±6	154.1±14.7	211.7±16.3	221.2±20.9
V	Pre Resv/Post 3-NP	9	18.2±3.6	108.5±14.1	171.4±14.4	208.1±10.2
VI	Pre Resv/Post Resv y 3-NP	5	25.8±5.2	97±13.1	130.6±23.6	160.5±31.1

Tabla 1. Representa los valores de las Curvas intensidad vs amplitud de la respuesta de los diferentes tratamientos realizados con el Resveratrol. La intensidad de la respuesta es expresada en múltiplos umbral señalados con la letra “x”. El promedio de la amplitud de la respuesta es expresado en μV .

Efecto de la Neurotrofina BDNF sobre la transmisión sináptica cortico-estriatal del grupo de ratones tratados con Resveratrol y 3-NP (Grupo VI).

En el caso del Grupo tratado con Resveratrol y 3-NP (Grupo IV), una vez que fue determinado el umbral de estimulación necesario para obtener la amplitud media de las espigas poblacionales y para tener la certeza de que los cambios observados en la amplitud de las respuestas poblacionales eran producto de la neurotrofina y no de una inestabilidad en los registros, se realizaron cursos temporales control, los cuales consisten básicamente en registros de larga duración capaces de mostrar que la amplitud de las respuestas sinápticas se mantiene estable a lo largo del tiempo.

Posterior al registro del curso temporal control fueron adicionados en el medio 50 ng/mL de la neurotrofina BDNF e inmediatamente fue evaluada la respuesta sináptica poblacional. Con base en el comportamiento observado en presencia de la neurotrofina, el Grupo IV fue dividido en 2 subgrupos.

En la **Figura 18** se muestra el subgrupo que consta del 34% de experimentos en los que BDNF generó un incremento sobre la modulación sináptica glutamatérgica. Se puede observar que la amplitud de la respuesta S1 incrementa un $27.359 \pm 2.189\%$ en presencia de la neurotrofina, lo cual es estadísticamente significativo como se puede apreciar en la gráfica de barras de la **Figura 20A** ($t_9 = -12.501$, $p < 0.001$; Control Grupo IV: 97.076 ± 1.998 ; BDNF: 124.435 ± 1.582).

En la **Figura 19** se muestra el subgrupo que consta del 66% de los experimentos en los que BDNF generó un decremento sobre la modulación sináptica glutamatérgica. Se puede observar que la amplitud de la respuesta S1 disminuye un 15.361 ± 2.128 en presencia de la neurotrofina, lo cual es estadísticamente significativo como se puede apreciar en la gráfica de barras de la **Figura 20B** ($t_9 = 7.219$, $p < 0.001$; Control Grupo IV: 100.114 ± 0.617 ; BDNF: 84.754 ± 1.877).



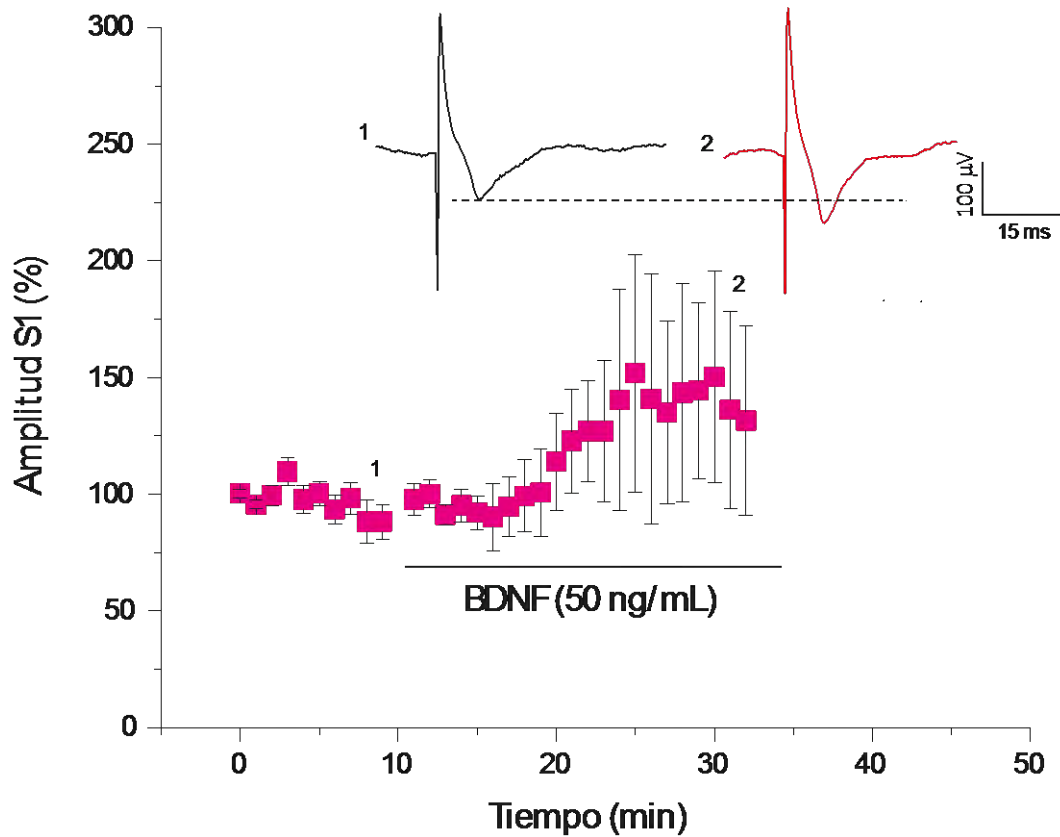


Figura 18. Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo tratado con Resveratrol y 3-NP (Grupo IV) en el que la neurotrofina BDNF generó un incremento estadísticamente significativo ($t_9 = -12.501$; $p < 0.001$) sobre la modulación de la transmisión sináptica. Se muestran las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje en presencia de la neurotrofina. Se puede apreciar que BDNF genera un efecto al incrementar la modulación de las sinapsis glutamatérgicas un $27.359 \pm 2.189\%$ con respecto al control ($n=4$; $\text{Prom} \pm \text{ES}$). La parte superior de la figura muestra en color negro y con número 1, un trazo representativo del curso temporal antes de adicionar la neurotrofina; En rojo y con número 2 se muestra un trazo representativo del curso temporal después de adicionar la neurotrofina. En la parte inferior los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo.



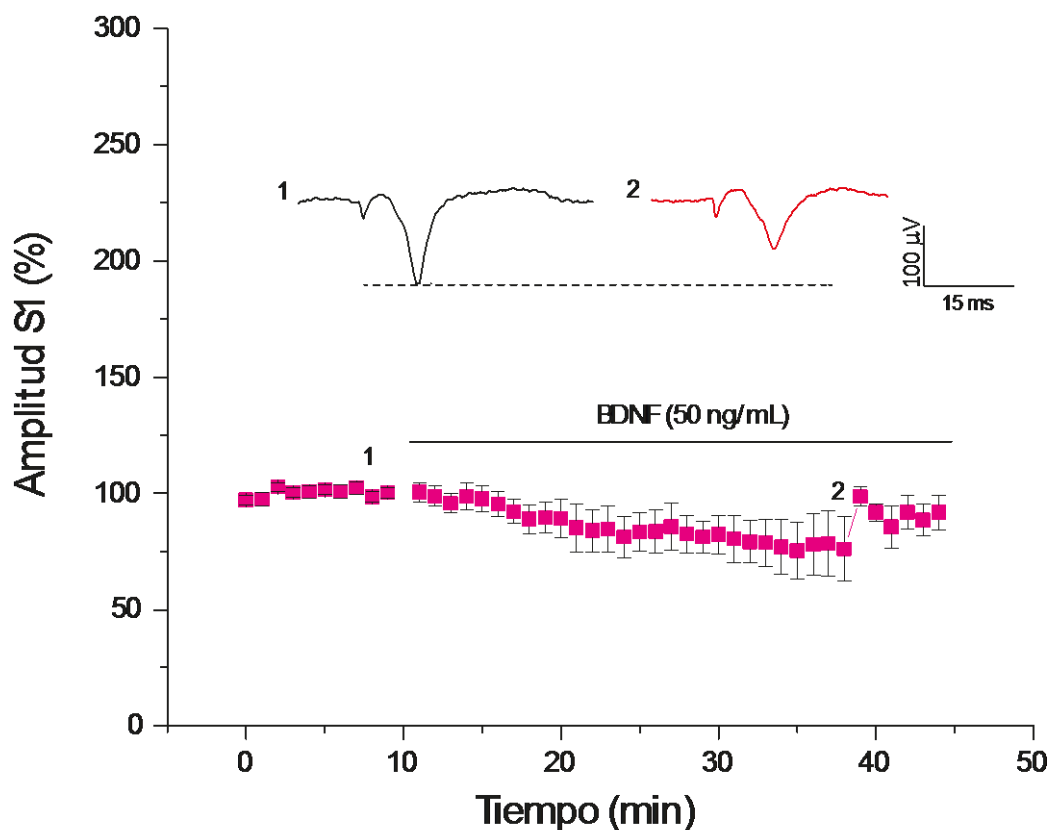


Figura 19. Curso temporal de los potenciales cortico-estriatales del Grupo tratado con Resveratrol y 3-NP (Grupo IV) en el que la neurotrofina BDNF generó una disminución estadísticamente significativa ($t_9=7.219$; $p<0.001$) sobre la modulación de la transmisión sináptica. Se muestran las espigas poblacionales normalizadas en porcentaje en presencia de la neurotrofina. Se puede apreciar que BDNF genera un efecto al decrementar la modulación de las sinapsis glutamatérgicas un $15.361\pm 2.128\%$ con respecto al control ($n=8$; Prom \pm ES). La parte superior de la figura muestra en color negro y con número 1, un trazo representativo del curso temporal antes de adicionar la neurotrofina; En rojo y con número 2 se muestra un trazo representativo del curso temporal después de adicionar la neurotrofina. En la parte inferior los números 1 y 2 representan la sección de donde fue obtenido cada trazo representativo.



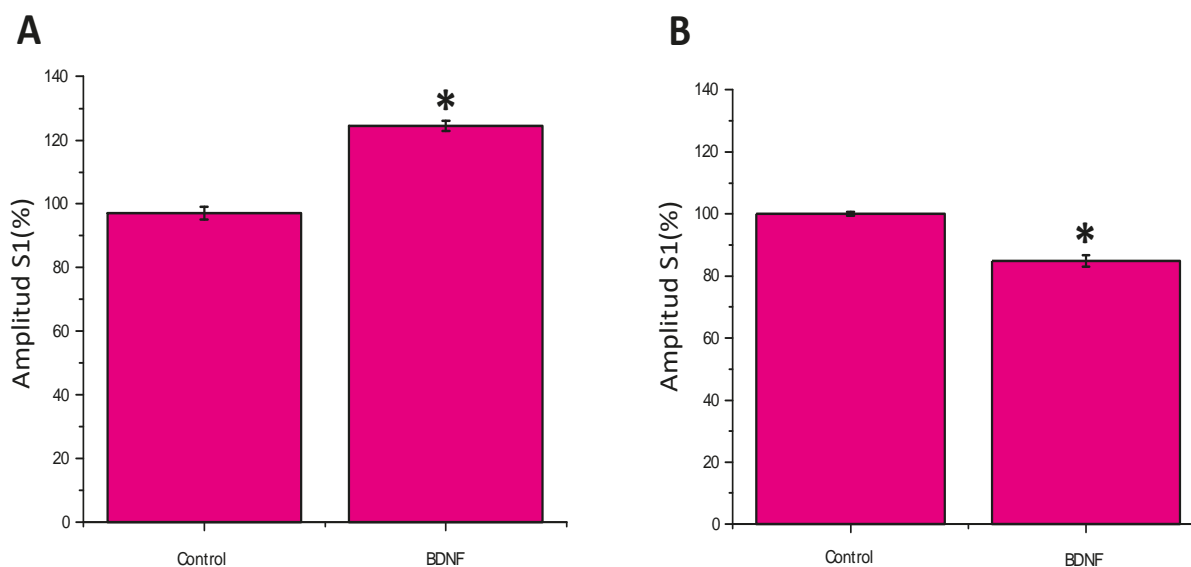


Figura 20. Gráfica de Barras de los subgrupos del Grupo tratado con Resveratrol y 3-NP (Grupo IV) en los que BDNF generó efecto. Se muestran las diferencias significativas existentes de cada condición. En **A)** se aprecia la gráfica de barras del subgrupo en el que BDNF generó un incremento estadísticamente significativo con respecto al control (* $p < 0.001$; $n = 4$; $\text{Prom} \pm \text{ES}$), mientras que en **B)** se aprecia la gráfica de barras del subgrupo en el que BDNF generó una disminución estadísticamente significativa con respecto al control (* $p < 0.001$; $n = 8$; $\text{Prom} \pm \text{ES}$).

Análisis del protocolo por pulso pareado del efecto de la neurotrofina BDNF sobre la transmisión sináptica cortico-estriatal de los subgrupos obtenidos a partir del Grupo tratado con Resveratrol y 3-NP (Grupo IV).

Con los datos obtenidos a partir de los cursos temporales del protocolo por pulso pareado, se llevó a cabo un análisis de los datos de cada subgrupo obtenido a partir del Grupo IV, el cual permitió inferir si el mecanismo de acción era pre o postsináptico, lo anterior de acuerdo con los valores del cociente de ambas espigas ($S2/S1$), en donde el cociente de la amplitud de la segunda espiga se divide entre la amplitud de la primera espiga.

De acuerdo con las bases teóricas y experimentales en las que se fundamenta este protocolo, se asume que si existe una modificación en el cociente $S2/S1$ antes y después de la administración de la neurotrofina entonces el cambio es de naturaleza presináptico; por otro lado, si las amplitudes de ambas respuestas se modifican en la misma proporción y la relación del cociente $S2/S1$ no cambia, entonces se trata de un mecanismo postsináptico.



En la **Figura 21** se muestra el análisis del cociente S2/S1 antes y después de la administración de la neurotrofina en el subgrupo que consta de los experimentos en los que BDNF generó un incremento sobre la modulación sináptica glutamatérgica; se puede apreciar que no hubo un cambio estadísticamente significativo del PPR antes y después de la administración con BDNF ($t_3= 0.983$, $p<0.398$; Control Grupo IV: 1.462 ± 0.96 ; BDNF: 1.357 ± 0.135), por lo que se infiere que en este subgrupo el mecanismo de acción de la neurotrofina es de naturaleza postsináptica.

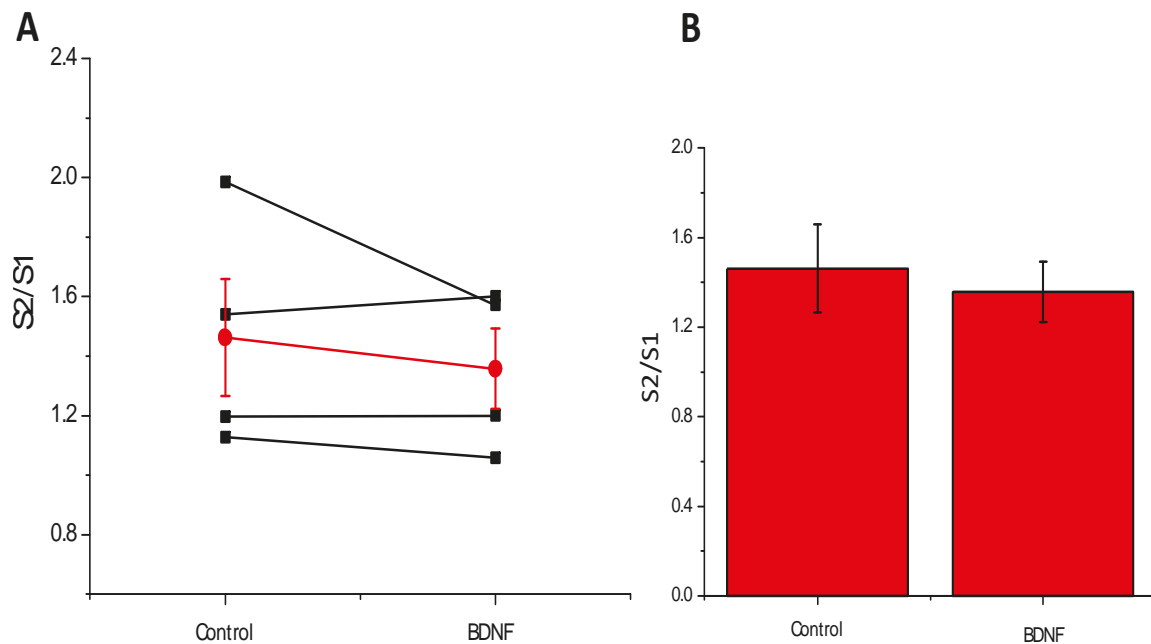


Figura 21. Cociente del protocolo por pulso pareado (S2/S1) antes y después de la administración de BDNF en el subgrupo en el que la neurotrofina generó un incremento sobre la modulación de la transmisión sináptica. En A) Se muestra el cociente S2/S1 de los últimos 10 minutos obtenidos previo a la administración de BDNF y los últimos 10 minutos obtenidos durante la administración de la neurotrofina. Las líneas negras representan los valores S2/S1 de cada uno de los experimentos y la línea roja muestra el promedio de los valores. **En B)** Se puede apreciar cómo el cociente antes y durante la administración de BDNF no se ve modificado de manera estadísticamente significativa ($p<0.398$; $n=4$; Prom \pm ES).



En la **Figura 22** se muestra el análisis cociente S2/S1 antes y después de la administración de la neurotrofina en el subgrupo que consta de los experimentos en los que BDNF disminuye la modulación sináptica glutamatérgica; se observa que no hubo un cambio estadísticamente significativo del PPR antes y después de la administración con BDNF ($t_6 = -1.525$, $p < 0.178$; Control Grupo IV: 1.210 ± 0.0556 ; BDNF: 1.416 ± 0.165), por lo que se infiere que en este subgrupo el mecanismo de acción del BDNF también es de naturaleza postsináptica.

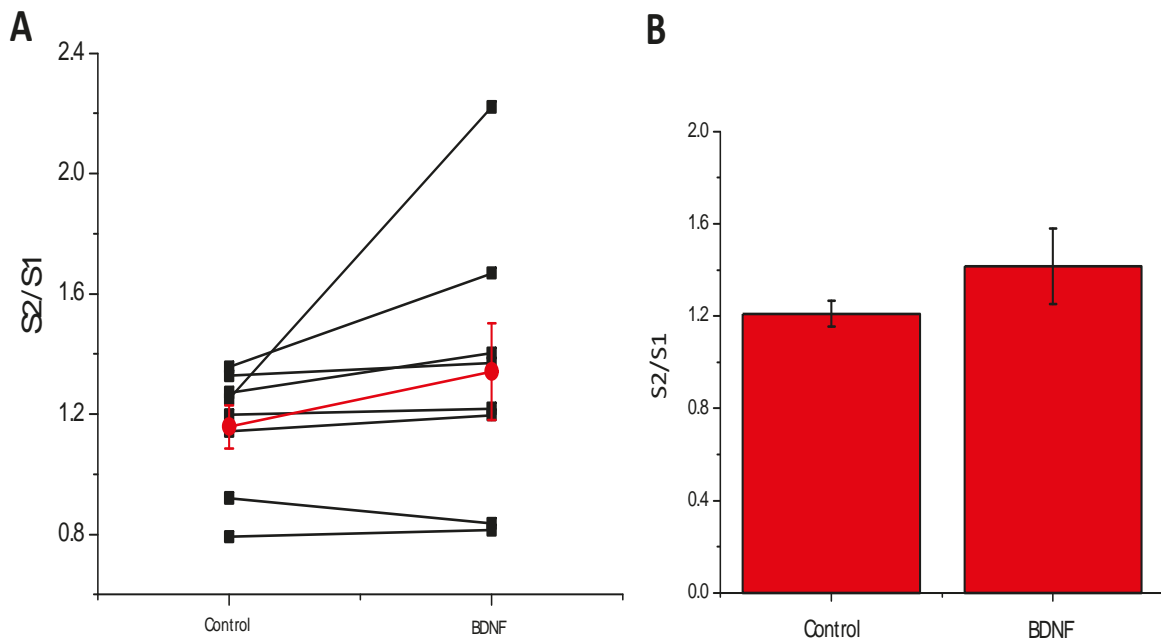


Figura 22. Cociente del protocolo por pulso pareado (S2/S1) antes y después de la administración de BDNF en el subgrupo en el que la neurotrofina generó una disminución sobre la modulación de la transmisión sináptica. En **A)** se muestra el cociente S2/S1 de los últimos 10 minutos obtenidos previo a la administración de BDNF y los últimos 10 minutos obtenidos durante la administración de la neurotrofina. Las líneas negras representan los valores S2/S1 de cada uno de los experimentos y la línea roja muestra el promedio de los valores. En **B)** se puede apreciar cómo el cociente antes y durante la administración de BDNF no se ve modificado de manera estadísticamente significativa ($p < 0.178$; $n = 8$; $\text{Prom} \pm \text{ES}$).

Los experimentos realizados en este estudio muestran que la administración sistémica de Resveratrol a una concentración de 20 mg/kg tuvo un efecto neuroprotector frente a la toxina mitocondrial 3-NP. A pesar de que la mayoría de los experimentos mostraron una reducción en la amplitud de la respuesta sináptica poblacional se obtuvo una población donde hubo incremento en la respuesta sináptica en presencia de la neurotrofina BDNF. A continuación se hará una breve discusión sobre estos resultados.



7. DISCUSIÓN

Efecto neuroprotector del Resveratrol frente a la toxina mitocondrial 3-NP

El tratamiento *in vivo* con la toxina mitocondrial 3-NP (Grupo II) generó cambios en la transmisión sináptica corticoestriatal. Los registros electrofisiológicos realizados en el tejido estriatal proveniente de animales tratados con 3-NP mostraron modificación en los umbrales de estimulación requeridos para generar una espiga poblacional de la misma amplitud que la requerida en una rebanada estriatal proveniente de tejido control (Grupo I). Este efecto del 3-NP ha sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Kudo *et al*, 2014; Mendoza *et al*, 2014; Nieto-Mendoza & Hernández-Echeagaray, 2015).

Las espigas poblacionales son el resultado de la sincronía de muchos potenciales de acción, la amplitud que poseen depende en gran medida de tres factores: 1) la descarga sincrónica de las células (sincronización poblacional), 2) distribución de la población neuronal activa y 3) la resistencia del tejido. Por tanto, el tamaño de la espiga poblacional registrada depende de la población neuronal que se encuentre activa (Johnston & Wu, 1995).

La alta intensidad de estimulación requerida para producir esta sincronización en el tejido tratado con 3-NP indica una reducción en el número de células capaces de sincronizarse y responder al estímulo. Lo anterior concuerda con los datos obtenidos previamente por integrantes del laboratorio (Ruelas, 2010; Mendoza *et al*, 2014; Gómez Pineda, 2015 & Vivar Cortés, 2016) quienes reportaron que la disfunción mitocondrial altera la modulación y la transmisión sináptica corticoestriatal. Específicamente se ha reportado que el bloqueo mitocondrial mediante el tratamiento *in vivo* con dosis bajas y la administración subcrónica de 3-NP, reduce la liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales, además de afectar la disponibilidad de neurotrofinas, la arborización dendrítica y la longitud de las neuronas espinosas medianas de proyección estriatal (Espíndola *et al*, 2012; Mendoza *et al*, 2014).

En el presente estudio se utilizó el polifenol Resveratrol, un antioxidante ampliamente estudiado en otras patologías degenerativas. El tratamiento *in vivo* con Resveratrol (Grupo III) por sí solo no generó cambios en la transmisión sináptica corticoestriatal. Con lo anterior se infiere que el Resveratrol a una concentración de 20 mg/kg no afecta el número de células capaces de sincronizarse ante la estimulación. Esto es de vital relevancia en el presente estudio debido al hecho de que se ha reportado que un antioxidante puede suprimir o facilitar procesos apoptóticos (Halliwell, 2000) de manera dosis y tipo celular dependiente (Tellone *et al*, 2015); en este caso la dosis de Resveratrol implementada, no facilita dichos procesos apoptóticos en el tejido corticoestriatal.



Los datos obtenidos a partir de los tratamientos *in vivo* del Grupo IV (Tratamiento conjunto de Resv y 3-NP) y V (Pretratamiento con Resv y pos tratamiento junto con 3-NP) muestran que los umbrales de estimulación para generar una espiga poblacional son mayores a los requeridos por el grupo control (Grupo I), sin embargo estos no son estadísticamente significativos. Por otra parte, en ambos casos al comparar dichos umbrales de estimulación con los requeridos por el grupo tratado con 3-NP resulta que estos valores son menores de manera estadísticamente significativa, lo anterior sería indicativo de que al menos en parte, en ambos grupos el Resveratrol estaría atenuando el daño producido por la toxina mitocondrial.

Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Kumar *et al* (2006) quienes reportan que el pretratamiento con Resveratrol (5 y 10 mg/kg) es capaz de prevenir la reducción de la actividad de la SDH así como reducir el estrés oxidativo inducido mediante la administración sistémica con la toxina 3-NP. Los autores señalan que estos efectos son posiblemente debido a las propiedades antioxidantes que posee el Resveratrol mediante el incremento en los niveles de GSH (un antioxidante endógeno) y el decremento en la peroxidación lipídica contribuyendo de esta manera a la neuroprotección en contra de la neurotoxicidad inducida con 3-NP.

Otro de los principales mecanismos neuroprotectores del Resveratrol frente a la excitotoxicidad inducida con 3-NP puede ser su efecto sobre el glutamato y sus diferentes tipos de receptores. En este sentido, Gao *et al* (2006) mostraron que de manera dosis dependiente el Resveratrol es capaz de inhibir la transmisión sináptica glutamatérgica excitatoria en neuronas hipocampales de rata, mediante la inhibición de los receptores glutamatérgicos postsinápticos NMDA, AMPA y KA, siendo NMDA y KA los receptores más sensibles frente al polifenol. Por otra parte, Chang *et al* (2009) mostraron que de manera dosis dependiente, el Resveratrol es capaz de ejercer un efecto presináptico inhibitorio sobre la liberación de glutamato presente en las terminales corticales de rata. Los autores atribuyen este efecto a la capacidad que tiene el Resveratrol de generar un decremento sobre la activación de la vía de señalización intracelular MAP cinasa, que subsecuentemente disminuiría la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje (tipo N y P/Q), inhibiendo de esta manera la liberación del glutamato. Asimismo de Almeida *et al* (2007) reportaron que el Resveratrol en bajas concentraciones (25 y 50 μ M) incrementa la recaptura de glutamato en cultivos de astrocitos provenientes de rata, dicha propiedad es de suma importancia debido a que la recaptura del glutamato por parte de los astrocitos es uno de los principales mecanismos de defensa que posee el cerebro frente al EO.

Adicionalmente a los efectos antioxidantes y su capacidad neuroprotectora frente a la excitotoxicidad mediada por glutamato, diversos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, señalan que el Resveratrol podría actuar mediante la interacción directa con la mitocondria, modulando diversas vías de señalización intracelular como la AMPK, SIRT 1 y PGC-1 α (Pasinetti *et al*, 2011), asociadas a la bioenergética, supervivencia y muerte celular. Aunque se desconocen las vías o mecanismos exactos mediante los cuales el



Resveratrol modula la dinámica y funciones mitocondriales, se cree que éstos tienen que ver con la regulación de factores de transcripción que activan o reprimen la expresión de genes asociados a la mitocondria, ocasionando de esta manera alteraciones en la fisiología mitocondrial (de Oliveira *et al*, 2016).

Aunque el 3-NP es un inhibidor altamente específico de la SDH que forma parte del complejo II mitocondrial (Hernández-Echeagaray *et al*, 2012) la toxina también afecta la actividad de los complejos mitocondriales I y III; en ese sentido se ha mostrado que el Resveratrol es capaz de actuar de manera directa modulando el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), sistema que incluye a los complejos I y III mitocondrial. De hecho, se ha descrito que en bajas concentraciones el Resveratrol es capaz de modular los rangos NAD^+/NADH ocasionando un incremento en la actividad del complejo I mitocondrial; este incremento, favorece la generación de NAD^+ , responsable de la activación de algunos miembros de la familia de las sirtuinas como por ejemplo SIRT3, que se encarga de la regulación de numerosas proteínas mitocondriales asociadas a múltiples vías de señalización involucradas en la bioenergética así como la supervivencia y muerte celular (Desquirit-Dumas *et al*, 2013). Asimismo se ha descrito que el Resveratrol mejora e incrementa la expresión y actividad de la SIRT1, otro miembro de la familia de sirtuinas en el hipocampo de rata, previniendo de esta manera el estrés oxidativo y la apoptosis inducida mediante un modelo de radiación (Li *et al*, 2014). Con respecto a la interacción del Resveratrol con el complejo III mitocondrial, de acuerdo con Zini *et al* (2002) el Resveratrol es capaz de disminuir la actividad de dicho complejo en el cerebro de ratas. Esta propiedad es especialmente interesante debido a que el complejo III es el sitio donde se generan las sustancias reactivas de oxígeno; los investigadores resaltan que mediante el decremento en la actividad de este complejo el Resveratrol estaría inhibiendo la producción de sustancias reactivas en oxígeno además de favorecer su remoción.

En cuanto a los datos obtenidos a partir del Grupo VI (Pre tratamiento con Resveratrol y pos tratamiento conjunto de Resveratrol y 3-NP) se observó que los umbrales de estimulación requeridos para generar una espiga poblacional fueron mucho mayores que los obtenidos por el grupo control (Grupo I) siendo estos valores estadísticamente significativos. Por otra parte, al comparar dichos umbrales de estimulación con los requeridos por el grupo tratado por 3-NP resulta que estos valores son menores sin embargo no son estadísticamente significativos, lo anterior sería indicativo de que particularmente en este grupo el Resveratrol parece no poseer efecto alguno sobre la toxicidad inducida por 3-NP. Estos resultados son paradójicos debido a que se esperaría que una prolongada exposición al antioxidante pudiera favorecer la protección ante la toxina, sin embargo las observaciones realizadas indican que el Resveratrol bajo estas condiciones no tiene efecto antioxidante y por ende neuroprotector frente al 3-NP. De hecho se sabe que elevadas concentraciones de antioxidantes generalmente no son buenas pudiendo ocasionar daño celular más que protección (Halliwell, 2000).



Efecto del tratamiento con Resveratrol sobre la transmisión sináptica cortico-estriatal en presencia de BDNF.

El objetivo de valorar la modulación sináptica del BDNF en tejido de animales tratados con Resveratrol fue para evaluar si los antioxidantes preservan los niveles de las neurotrofinas como resultado de su mecanismo de neuroprotección.

Las evaluaciones electrofisiológicas en presencia del Resveratrol, mostraron que la neurotrofina modula de manera diferencial la respuesta sináptica aún bajo las mismas condiciones experimentales.

En un 34% de los experimentos realizados en el Grupo IV la amplitud de la respuesta S1 incrementa de manera estadísticamente significativa en presencia de la neurotrofina. Sin embargo en el 66% de los experimentos realizados con el Grupo IV la amplitud de la respuesta S1 disminuyó significativamente en presencia de la neurotrofina, lo cual no había sido observado previamente. Lo anterior probablemente es debido a la presencia de las dos diferentes poblaciones de MSN presentes en el estriado que poseen distintas propiedades intrínsecas como su región de proyección, colaterales axonales y neuroquímica (Kreitzer & Malenka, 2008; Bolam *et al*, 2009).

Otra de las posibles explicaciones para dichos resultados es el mecanismo mediante el cual el Resveratrol modula la transmisión sináptica excitatoria glutamatérgica corticoestriatal, afectando de esta manera la modulación del BDNF. De acuerdo con los datos obtenidos por Wang *et al* (2016) el Resveratrol (10-20 μM) es capaz de atenuar *in vitro* la actividad de las neuronas corticales mediante la apertura de los canales de potasio de gran conductancia activados por calcio (BK_{Ca}) y del cierre de canales de sodio activados por voltaje regulando de esta manera la excitabilidad de las neuronas corticales. Por otra parte se ha observado que el incremento de la actividad de los BK_{Ca} en células del hipocampo potencia la protección frente a la excitotoxicidad. La activación de los canales BK_{Ca} ocasiona la hiperpolarización de la membrana plasmática y disminuye la excitabilidad neuronal (Piwońska *et al*, 2016). Está demostrado que los BK_{Ca} se encuentran presentes en las MSN y contribuyen a la regulación de las corrientes de salida y por tanto en la excitabilidad de estas neuronas (Bargas *et al*, 1999).). La idea de que el Resveratrol esté atenuando la actividad de las neuronas corticales mediante la apertura de los canales BK_{Ca} es de vital relevancia para el presente estudio debido a que la secreción y los niveles de BDNF son regulados de manera dependiente de actividad, además de que la mayor parte del BDNF estriatal (aproximadamente un 95%) es producido en la corteza y transportado de forma anterógrada a través de la vía corticoestriatal hacia las MSN (Altar *et al*, 1997; Alberch *et al*, 2002; Zuccato & Cattaneo, 2009; Zuccato *et al*, 2010; Samadi *et al*, 2013). Así es probable que el BDNF proveniente de la corteza, disminuya la activación de sus receptores TrkB y se reduzca su efecto para modular los receptores NMDA (Carvahlo *et al*, 2007) teniendo como consecuencia una disminución en la excitabilidad neuronal como la observada en este estudio.



Éste es un mecanismo que podría ser estudiado en el futuro para poder explicar la acción del Resveratrol cuando existe un desequilibrio en la homeóstasis energética como ocurre durante procesos de isquemia, hipoxia o en este caso durante la aplicación de una toxina mitocondrial como el 3-NP.

También hay que proponer la posibilidad de que el tratamiento con Resveratrol favorece la unión de BDNF al receptor TrkB truncado permitiendo de alguna manera la activación de vías de señalización distintas a las vías clásicas teniendo como resultado una disminución en la excitabilidad de las neuronas de la vía corticoestriatal. Lo anterior implicaría un mecanismo neuroprotector completamente inesperado pero eficiente frente a la excitotoxicidad inducida con 3-NP, dicho mecanismo deberá ser evaluado en un futuro.

Efecto del tratamiento con Resveratrol sobre la transmisión sináptica cortico-estriatal en presencia de BDNF: Actividad postsináptica de BDNF

La respuesta sináptica puede ser modulada a nivel presináptico o postsinápticamente, debido a que el BDNF se encuentra co-localizado junto con su receptor TrkB en las sinapsis glutamatérgicas tanto presinápticas como postsinápticas (Carvahlo *et al*, 2007), utilizamos el protocolo por pulso pareado para determinar si los mecanismos utilizados por la neurotrofina son pre o postsinápticos.

En el estriado, a nivel postsináptico BDNF activa los receptores TrkB asociados a vías de señalización los cuales pueden fosforilar los receptores glutamatérgicos, incrementando de esta manera la amplitud de la respuesta sináptica (Vivar Cortés, 2016). Lo anterior es una explicación válida únicamente en el caso del subgrupo del Grupo IV en el que BDNF incrementa la amplitud de la respuesta sináptica. Para el caso del subgrupo del Grupo IV en el que la neurotrofina disminuyó la amplitud de la transmisión sináptica, nos permitimos inferir acorde con Aroerira *et al* (2015) que a nivel postsináptico BDNF posiblemente se une a algún receptor TrkB truncando, permitiendo de alguna manera la activación de vías de señalización distintas a las vías clásicas favoreciendo de esta manera la disminución de la excitabilidad en las neuronas de la vía corticoestriatal.



8. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el presente estudio, son indicativo de que el tratamiento con Resveratrol *in vivo* a una concentración de 20 mg/kg atenúa el daño inducido con 3-NP mediante la disminución de la actividad glutamatérgica corticoestriatal en el estriado de ratones C57/BL6, lo cual sería un mecanismo de defensa en contra de la excitotoxicidad.
- El efecto del Resveratrol sobre la modulación sináptica corticoestriatal en presencia de la neurotrofina BDNF es diferencial, incrementando la respuesta S1 de manera estadísticamente significativa en un 34% de los experimentos y disminuyendo la amplitud de la respuesta S1 de manera estadísticamente significativa en un 66% de los experimentos.
- En ambos casos, la forma en la que actúa BDNF para modular las sinapsis corticoestriatales es a través de mecanismos postsinápticos.
- Estudios adicionales serán necesarios para determinar si los diferentes tratamientos con Resveratrol modulan la actividad de BDNF en la vía corticoestriatal y mediante qué mecanismos podrían estar actuando.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Afifi, A. K. 2003, The basal ganglia: A neuronal network with more than motor function. *Semin. Pediatr. Neurol.* 10(1): 3-10.
- ❖ Alberch, J., Pérez-Navarro, E. & Canals, J. M. 2002, Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res. Bull.* 57 (6): 817-822.
- ❖ Alberch, J., Pérez-Navarro, E. & Canals, J. M. 2004, Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog. Brain Res.* 146: 195-229.
- ❖ Albin, R. L., Young, A. B. & Penney, J.B. 1989, The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12(10): 366-375.
- ❖ Allen, S. J & Dawbarn, D. 2006, Clinical relevance of neurotrophins and their receptors. *Clin. Sci. (Lond).* 110(2): 175-191.
- ❖ Altar, C. A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J. M., Acheson, A. L., Lindsay, R. M. & Wiegand, S. J. 1997, Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature.* 389 (6653): 856-869.
- ❖ Andero, R., Choi, D. C. & Ressler, K. J. 2014, BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Prog. Mol. Biol. Sci.* 122: 169-192.
- ❖ André, V. M., Cepeda, C. & Levine, M. S. 2010, Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci. Ther.* 16 (3): 163-178.
- ❖ Aroeira, R. I., Sebastião, A. M. & Valente, C. A. 2015, BDNF via truncated TrkB receptor, modulates GlyT1 and GlyT2 in astrocytes. *Glia.* 63(12): 2181-2197.
- ❖ Aruoma, O. I. 2003, Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.* 523-524: 9-20.
- ❖ Balaratnasingam, S. & Janca, A. 2012, Brain derived neurotrophic factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* 134 (1): 116-124.
- ❖ Barbacid, M. 1995, Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7(2): 148-155.
- ❖ Bargas, J., Ayala, G. X., Vilchis, C., Pineda J. C. & Galarraga E. 1999, Ca²⁺-activated



outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88 (2): 479-488.

- ❖ Bargas, J. & Galarraga E. 2008, Capítulo 3 Transmisión sináptica, en *Biología funcional de los animales II. Una neurofisiología comparada*, Eds. Fanjul, M. L & Hiriart, M., Siglo Veintiuno Eds. Pág. 86-140.
- ❖ Bateup, H. S., Santini, E., Shen, W., Birnbaum, S., Valjent, E., Surmeier, D. J., Fisone, G., Nestler, E. J. & Greengard, P. 2010. Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (33): 14845-14850.
- ❖ Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B. R. & Hyman, B. T. 1993, Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13 (10): 4181-4192.
- ❖ Beal, M. F. & Ferrante, R. J. 2004, Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (5): 373-384.
- ❖ Berninger, B. & Poo, MM. 1996, Fast actions of neurotrophic factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6(3): 324-330.
- ❖ Biebel, M. & Barde, YA. 2000, Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14 (23): 2919-2937.
- ❖ Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. & Bevan M. D. 2000, Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196 (Pt 4): 527-542.
- ❖ Bolam, J. P., Brown, M. T., Moss, J. & Magill, P. J. 2009, Basal Ganglia: Internal Organization. *Encycl Neurosci.* 2: 97-104.
- ❖ Borrell-Pagés, M., Zala, D., Humbert, S. & Saudou, F. 2006, Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol. Life Sci.* 63 (22): 2642-2660.
- ❖ Brouillet, E., Condé, F., Beal, M. F. & Hantraye, P. 1999, Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59 (5): 427- 468.
- ❖ Brouillet, E. 2014, The 3-NP model of striatal neurodegeneration. *Curr. Protoc. Neurosci.* 10; 67: 9.48: 1-14.
- ❖ Brouillet, E., Jacquard C., Bizat, N. & Blum, D. 2005, 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 95 (6): 1521-1540.



- ❖ Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini P., Marfia, G. A., Pisani, A., Sancesario, G. & Bernardi, G. 2000, Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 61(3): 231-265.
- ❖ Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. & Di Filippo, M. 2014, Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci. Rev.* 17(8): 1022-1030.
- ❖ Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A. & Ghiglieri, V. 2015, Interaction between basal ganglia and limbic circuits in learning and memory processes. *Parkinsonism Relat. Disord.* 22 (Suppl 1): S65- S68.
- ❖ Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., Santos, S. D. & Duarte, C. B. 2007, Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol.* 153 (Suppl 1): S310- S324.
- ❖ Cepeda, C., Wu, N., André, V. M., Cummings, D. M. & Levine M. S. 2007, The corticostriatal pathway in Huntington´s disease. *Prog. Neurobiol.* 81(5-6): 253-271.
- ❖ Cepeda, C., Murphy, K. P., Paret, M. & Levine, M. S. 2014, The role of dopamine in Huntington´s disease. *Prog. Brain Res.* 211: 235-254.
- ❖ Chang, Y. & Wang, S. J. 2009, Inhibitory effect of glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals by Resveratrol. *Neurochem. Int.* 54 (2): 135-141.
- ❖ Chao, M. V. 2003, Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4(4): 299-309.
- ❖ Chu, K. O., Chan, S. O., Pang, C. P. & Wang, C. C. 2014, Pro-oxidative and antioxidative controls and signaling modification of polyphenolic phytochemicals: contribution to health promotion and disease prevention? *J. Agric. Food Chem.* 62 (18): 4026-4038.
- ❖ Córdova, A. 2003, *Fisiología dinámica*. Primera edición. España. Masson, S. A.
- ❖ Cornelli, U. 2009, Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin. Dermatol.* 27 (2): 175-194.
- ❖ Davies, S. & Ramsden, D. B. 2001, Huntington´s disease. *Mol. Pathol.* 54 (6): 409-413.
- ❖ Dawbarn, D. & Allen, S. J. 2003, Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl, Neurobiol.* 29(3): 211-230.



- ❖ DeLong, M. R. & Wichmann, T. 2007, Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch. Neurol.* 64(1): 20-24.
- ❖ Deinhardt, K. & Chao, M. V. 2014, Trk receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220: 103-119.
- ❖ de Almeida L. M., Piñeiro, C. C., Leite, M. C., Brolese, G., Tramontina, F., Feoli, A. M., Gottfried, C. & Gonçalves, C. A. 2007. Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27(5): 661-668.
- ❖ de Oliveira, M. R., Nabavi, S. F., Manayi, A., Daglia, M., Hajheydari, Z. & Nabavi, S. M. 2016, Resveratrol and mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochem. Biophys. Acta.* 1860 (4): 727-745.
- ❖ Desquiret-Dumas V., Gueguen N., Leman G., Baron S., Nivet-Antoine V., Chupin S., Chevrollier A., Vessières E., Ayer A., Ferré M., Bonneau D., Henrion D., Reynier P. & Procaccio V. 2013, Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *J. Biol. Chem.* 288 (51): 36662-36675.
- ❖ Dey, A. & De, J. N. 2015, Neuroprotective therapeutics from botanicals and phytochemicals against Huntington's disease and related neurodegenerative disorders. *Journal of Herbal Medicine.* 5 (1): 1-19.
- ❖ Espíndola, S., Vílches-Flores, A. & Hernández-Echeagaray, E. 2012, 3-Nitropropionic acid modifies neurotrophin mRNA expression in the mouse striatum: 18S-rRNA in reliable control gene for studies of the striatum. *Neurosci. Bull.* 28 (5): 517-531.
- ❖ Estrada-Sánchez, A. M., Mejía-Toiber, J. & Massieu, L. 2008, Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. 39 (3): 265-276.
- ❖ Fumagalli, F., Molteni, R., Calabrese, F., Maj, P. F., Racagni, G. & Riva, M. A. 2008, Neurotrophic factors in neurodegenerative disorders. *CNS Drugs.* 22(12): 1005-1019.
- ❖ Gao, ZB., Chen, XQ. & Hu, GY. 2006, Inhibition of excitatory synaptic transmission by Trans-Resveratrol in rat hippocampus. *Brain Res.* 1111 (1): 41-47.
- ❖ Gardoni, F. & Bellone, C. 2015, Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9 (25): 1-11.



- ❖ Graybiel, A. M. 2000, The basal ganglia. *Current Biology*. 10 (14), R509 – R511.
- ❖ Gerfen, C. R. & Surmeier, D. J. 2011, Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441-466.
- ❖ Gil, J. M. & Rego, A. C. 2008, Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 27 (11): 2803-2820.
- ❖ Girault, J. A. 2012, Integrating neurotransmission in striatal medium spiny neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970: 407-429.
- ❖ Gómez Pineda V. G. 2015, La Neurotrofina-3 y la plasticidad estriatal en un modelo de neurodegeneración. Tesis de licenciatura (Biología). UNAM-FES Iztacala.
- ❖ Grittis, A. H. & Kreitzer, A. C. 2012, Microcircuitry and movement disorders. *Trends in Neurosci. Rev.* 35(9): 557-564.
- ❖ Gutteridge, J. M. & Halliwell, B. 2010, Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393 (4): 561-564.
- ❖ Halliwell, B. 2000, The antioxidant paradox. *Lancet*. 355 (9210): 1179-1180.
- ❖ Halliwell, B. 2001, Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 18 (9): 685-716.
- ❖ Hennigan, A., O'Callaghan, R. M. & Kelly, Á.M. 2007, Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem. Soc. Trans.* 35(Pt 2): 424-427.
- ❖ Hernández-Echeagaray, E., González, N., Ruelas, A., Mendoza, E., Rodríguez-Martínez, E. & Antuna-Bizarro, R. 2011, Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. *Neurol. Sci.* 32 (2): 241-251.
- ❖ Hernández-Echeagaray, E., De la Rosa-López, G. & Mendoza-Duarte, E. 2012, The use of the mitochondrial toxin 3-NP to uncover cellular dysfunction in Huntington's disease. *Huntington's disease-Core concepts and current advances*. Dr Nagehan Ersoy Tunali (Ed.), InTech.
- ❖ Hickman, C. P., Roberts, L. S., Keen, S. L., Larson, A., I'Anson, H. & Einsenhour, D. J. 2008, *Integrated Principles of Zoology* (14th ed.). USA. McGraw-Hill.
- ❖ Huang, E. & Reichardt, L. F. 2001, Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 677-736.



- ❖ Huang, E. J. & Reichardt, L. F. 2003, Trk receptors in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 609-642.
- ❖ Johnston, D. & Wu S. MS. 1995, *Fundations of cellular neurophysiology.* Cambridge: The MIT Press.
- ❖ Kaczmarek, L. K. & Levitan I. B. 1987, *Neuromodulation: The Biochemical Control of Neuronal Excitability.* New York: Oxford University Press.
- ❖ Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. 2001, *Principios de neurociencia (4ta ed.).* España. McGraw-Hill/Interamericana.
- ❖ Kaplan, D. R. & Miller, F. D. 2000, Neurtrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10(3): 381-391.
- ❖ Katz, B. & Miledi, R. 1968, The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 195 (2): 481-492.
- ❖ Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J. & Emson, P. C. 1995, Striatal interneurons: chemical, physiological & morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18(12):527-535.
- ❖ Kawaguchi, Y. 1997, Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci. Res.* 27(1): 1-8.
- ❖ Kim, G. W., Copin, J. C., Kawase, M., Chen, S. F., Sato, S., Gobbel, G. T. & Chan, P. H. 2000, Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20 (1): 119-129.
- ❖ Kreitzer, A. C. & Malenka, R. C. 2008, Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron.* 60(4): 543-554.
- ❖ Kudo, T., Loh, D. H., Tahara, Y., Truong, D., Hernández-Echeagaray, E. & Colwell, C. S. 2014, Circadian dysfunction in response to in vivo treatment with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *ASN Neuro.* 6(1): e00133.
- ❖ Kumar, P., Padi, S. S., Naidu, P. S. & Kumar, A. 2006, Effect of Resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes; possible neuroprotective mechanisms. *Behav. Pharmacol.* 17 (5-6): 485-492.
- ❖ Landles C. & Bates, G. P. 2004, Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5 (10): 958-963.



- ❖ Lessman, V. 1998, Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen, Pharmacol.* 31(5): 667-674.
- ❖ Li, C., Yan, Z., Yang, J., Chen, H., Li, H., Jiang, Y. & Zhang, Z. 2010, Neuroprotective effect of Resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. *Neurochem. Int.* 56 (3): 495-500.
- ❖ Li, H., Wang J., Wang, P., Rao, Y. & Chen L. 2016, Resveratrol reverses synaptic plasticity deficits in chronic cerebral hypoperfusion rat model. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 25 (1): 122-128.
- ❖ Li, J., Feng, L., Xing, Y., Wang, Y., Du, L., Xu, C., Cao, J., Wang, Q., Fan, S., Liu, Q. & Fan, F. 2014, Radioprotective and antioxidant effect of Resveratrol in hippocampus by activating Sirt1. *Int. J. Mol. Sci.* 15(4): 5928-5939.
- ❖ Lo, C. D. 1995, Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron.* 15(5): 979-981.
- ❖ Lu, B., Pang, P. T. & Woo, N. H. 2005, The Yin and Yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(8): 603-614.
- ❖ Lu, B., Nagappan, G. & Lu, Y. 2014, BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220: 223-250.
- ❖ Marques, F. Z., Markus, M. A. & Morris, B. J. 2009, Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41 (11): 2125-2128.
- ❖ Mendoza, E., Miranda-Barrientos, J. A., Vázquez-Roque, R. A., Morales-Herrera, E., Ruelas, A., De la Rosa, G., Flores, G. & Hernández-Echeagaray, E. 2014, In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. *Neuroscience.* 280: 156-170.
- ❖ Middleton, F. A. 2000, Basal ganglia output and cognition: Evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. *Brain Cogn.* 42(2): 183–200.
- ❖ Miller, B. R. & Bezprozvanny, I. 2010, Corticostriatal circuit dysfunction in Huntington's disease: intersection of glutamate, dopamine and calcium. *Future Neurol.* 5 (5): 735-756.
- ❖ Moosavi, F., Hosseini, R., Saso, L. & Firuzi, Omidreza. 2015, Modulation of the neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug Des. Devel. Ther.* 10: 23-42.
- ❖ Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. S., Domínguez, H., Núñez, M. J. &



Parajó, J. C. 2001, Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72: 145-171.

- ❖ Murray, P. S. & Holmes, P. V. 2011, An overview of Brain-Derived Neurotrophic Factor and implications for excitotoxic vulnerability in hippocampus. *Int. J. Pept.* Vol. 2011, Article ID: 654085, 12 pages.
- ❖ Musumeci, G. & Minichiello, L. 2011, BDNF-TrkB signalling in fear learning: from genetics to neural networks. *Rev. Neurosci.* 22 (3): 303-315.
- ❖ Nagahara, A. H. & Tuszynski, M. H. 2011, Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (3): 209-219.
- ❖ Nagai, N., Kubota, S., Tsubota, K. & Ozawa, Y. 2014, Resveratrol prevents the development of choroidal neovascularization by modulating AMP-activated protein kinase in macrophages and other cell types. *J. Nutr. Biochem.* 25 (11): 1218-1225.
- ❖ Naia, L., Rosenstock, T. R., Oliveira, A. M., Oliveira-Sausa, S. I., Caldeira, G. L., Carmo, C., Laço, M. N., Hayden, M. R., Oliveira, C. R. & Rego, A. C. 2016, Comparative mitochondrial-based protective effects of Resveratrol and nicotinamide in Huntington's disease models. *Mol. Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-016-0048-3.
- ❖ Nakano, K., Kayahara, T., Tsutsumi, T. & Ushiro, H. 2000, Neural circuits and functional organization of the striatum. *J. Neurol.* 247 [Suppl 5]: V1-15.
- ❖ Nieto-Mendoza, E. & Hernández-Echeagaray, E. 2015, Dopaminergic modulation of striatal inhibitory transmission and long-term plasticity. *Neural Plast.* 2015: 789502.
- ❖ Nopoulos, P. C. 2016, Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18 (1): 91-98.
- ❖ Novak, M. J. & Tabrizi, S. J. 2011, Huntington's disease: clinical presentation and treatment. *Int. Rev. Neurobiol.* 98: 297-323.
- ❖ Pang, Z. & Geddes, J. W. 1997, Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.* 17 (9): 3064-3073.
- ❖ Pardon, M. C. 2010, Role of neurotrophic factors in behavioral processes: implications for the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Vitam. Horm.* 82: 185-200.



- ❖ Parent, A., Côté, P. & Lavoie, B., 1995, Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog. Neurobiol.* 46(2-3): 131-197.
- ❖ Park, H. & Poo MM. 2013, Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14(1): 7-23.
- ❖ Parker, J. A., Arango, M., Abderrahmane S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H. & Néri, C. 2005, Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *37 (4): 349-350.*
- ❖ Pasinetti, G. M., Wang, J., Marambaud, P., Ferruzzi, M., Gregor, P., Knable, L. A. & Ho, Lap. 2011, Neuroprotective and metabolic effects of Resveratrol: Therapeutic implications for Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. *Exp. Neurol.* 232 (1): 1-6. Patapoutian, A. & Reichardt, L. F. 2001, Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11(3): 272-280.
- ❖ Piwońska, M., Szewczyk, A., Schröder, U. H., Reymann, K. G. & Bednarczyk, I. 2016, Effectors of large-conductance calcium-activated potassium channel modulate glutamate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Acta Neurobiol. Exp (Wars).* 76(1): 20-31.
- ❖ Poo, MM. 2001, Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(1): 24-32.
- ❖ Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O. & Williams, S. M. 2004, *Neuroscience (3rd ed.)*. USA. Sinauer Associates.
- ❖ Rahvar, M., Nikseresht, M., Shafiee, S. M., Naghibalhossaini, F., Rasti, M., Panjehshahin, M. R. & Owji, A. A. 2011, Effect of Resveratrol on the BDNF gene expression in the hippocampus of the rat brain. *Neurochem. Res.* 36 (5): 761-765.
- ❖ Reddy, P. H., Mao, P. & Manczak, M. 2009, Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain Res. Rev.* 61 (1): 33-48.
- ❖ Reichardt, L. F. 2006, Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 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. *Int. J. Biol. Sci.* 6 (3): 199-212.
- ❖ Ross, C. A. & Tabrizi, S. J. 2011, Huntington's disease: from molecular pathogenesis



to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 10 (1): 83-98.

- ❖ Ross, M. H. & Pawlina, W. 2008, *Histología: texto y atlas a color con biología celular y molecular* (5ta ed.). Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- ❖ Ruelas Callejas, 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 en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). UNAM-FES Iztacala.
- ❖ Samadi, P., Boutet, A., Rymar, W., Rawal, K., Maheux, J., Kvann, J. C., Tomaszewski, M., Beaubien, F., Cloutier, J. F., Levesgue, D. & Sadikot, A. F. 2013, Relationship between BDNF expression in major striatal afferents, striatum morphology and motor behavior in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Genes Brain Behav.* 12 (1): 108-124.
- ❖ Sánchez, M. A. & Mendoza, V. M. 2003, *Envejecimiento. Enfermedades crónicas y antioxidantes.* Primera edición. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- ❖ Sari, Y. 2011, Huntington's disease: From mutant huntingtin protein to neurotrophic factor therapy. *Int. J. Biomed. Sci.* 7 (2): 89-100.
- ❖ Saudou, F. & Humbert, S. 2008, The biology of Huntington's disease. *Handb. Clin. Neurol.* 89: 619-629.
- ❖ Sawa, A., Tomoda, T. & Bae, B. I. 2003, Mechanisms of neuronal cell death in Huntington disease. *Cytogenet. Genome Res.* 100 (1-4): 287-295.
- ❖ Segal, R. A. 2003, Selectivity in neurotrophin signalling: theme and variations. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 299-330.
- ❖ Semkova, I. & Kriegstein, J. 1999, Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res. Rev.* 30(2): 176-188.
- ❖ Shakibaei, M., Harikumar, K. B. & Aggarwal, B. B. 2009, Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol. Nut. Food Res.* 53 (1): 115-128.
- ❖ Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Yang, H. & Ji, R. 2008, Stabilization and encapsulation of photosensitive Resveratrol within yeast cell. *Int. J. Pharm.* 349 (1-2): 83-93.
- ❖ Siegel, G. J. & Chauhan, N. B. 2000, Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res. Rev.* 33(2-3): 199-227.



- ❖ Skaper, S. D. & Walsh, F. S. 1998, Neurotrophic molecules: Strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience* 12(4-5): 179-193.
- ❖ Skaper, S. D. 2008, The biology of Neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets*. 7 (1): 46-62.
- ❖ Sporns, O. 2011, *Networks of the brain*. USA. The MIT Press.
- ❖ Tellone, E., Galtieri, A., Russo, A., Giardina, B. & Ficarra, S. 2015, Resveratrol: A focus on several neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015: 392169.
- ❖ Tepper, J. M. & Bolam, P. 2004, Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (6): 685-692.
- ❖ Tepper, J. M., Abercrombie, E. D. & Bolam, J. P. 2007, Basal Ganglia Macrocircuits. *Prog. Brain Res.* 160: 3-7.
- ❖ Thomas, K. & Davies, A. 2005, Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF. *Curr. Biol.* 15 (7): R262-264.
- ❖ Tisch, S., Silberstein, P., Limousin-Dowsey, P. & Jahanshashi, M. 2004, The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatr. Clin. North Am.* 27(4): 757-799.
- ❖ Túnez, I. & Santamaría, A. 2009, Modelo de la enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico. *Rev. Neurol.* 48 (8): 430-434.
- ❖ Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De La Cruz, V. & Santamaría, A. 2010, 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules.* 15 (2): 878-916.
- ❖ Utter, A. A. & Basso, M. A. 2008, The basal ganglia: An overview of circuits and function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32(3): 333-342.
- ❖ Vivar Cortés C. I. 2016, 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. Tesis de licenciatura (Biología). UNAM-FES Iztacala.
- ❖ von Bartheld, C. S. 2006, Evolution of neurotrophic factors: Preface with historical perspective. *Brain Behav. Evol.* 68(3): 121-123.



- ❖ Vonsattel, J. P., Keller, C. & Amaya, M. P. 2008, Neurophatology of Huntington disease. *Handb. Clin. Neurol.* 89: 559-618.
- ❖ Vonsattel, J. P., Keller, C. & Cortés-Ramírez, E. P. 2011, Huntington's disease-neuropathology. *Handb. Clin. Neurol.* 100: 83-100.
- ❖ Walker, F. O. 2007, Huntington's disease. *Lancet.* 369 (9557): 218-228.
- ❖ Wang, YJ., Chan, MH., Chen, L., Wu, SN. & Chen, HH. 2016, Resveratrol attenuates cortical neuron activity: roles of large conductance calcium-activated potassium channels and voltage-gated sodium channels. *J. Biomed. Sci.* 23: 47; 1-9.
- ❖ Wenzel, E. & Somoza, V. 2005, Metabolism and bioavailability of Trans-Resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (5): 472-481.
- ❖ Wichmann, T. & Dostrovsky, J. O. 2011, Pathological basal ganglia activity in movement disorders. *Neuroscience.* 198: 232-244.
- ❖ Wilson, G. F. 2001, Cellular neuromodulation. *Encyclopedia of life sciences.* 1-8.
- ❖ Wu, CF., Yang, JY. , Wang, F. & Wang, XX. 2013, Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. 11 (1): 1-15.
- ❖ Wu, C. L., Hwang C. S., Chen, S. D., Yin, J. H. & Yang, D. I. 2010, Neuroprotective mechanisms of brain-derived neurotrophic factor against 3-nitropropionic acid toxicity: therapeutic implications for Huntingto's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201: 8-12.
- ❖ Yamada, K., Takahashi, S., Karube, F. *et al.*, 2016, Neuronal circuits and physiological roles of the basal ganglia in terms of transmitters, receptors and related disorders. *J Physiol Sci.* 15 [Epub ahead of print].
- ❖ Yoshioka, T. & Kuba, K. 2000, Introductory review: synaptic plasticity and modulation, In *Slow synaptic responses and modulation*, Eds. Kuba, K., Higashida, H., Brown, D. A., Yoshioka, T. Japan. Springer. Pages 274-296.
- ❖ Yu, W., Fu, YC. & Wang, W. 2012, Cellular and molecular effects of Resveratrol in health and disease. *J. Cell. Biochem.* 113 (3): 752-759.
- ❖ Zhang, F., Wang, YY., Liu, H., Lu, YF., Wu, Q., Liu, J. & Shi, J. S. 2012, Resveratrol produces neurotrophic effects on cultured dopaminergic neurons through prompting astroglial BDNF and GDNF release. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012: 937605.



- ❖ Zheng, Z. & Diamond, M. I. 2012, Huntington disease and huntingtin protein. *Prog. Mol. Transl. Sci.* 107: 189-214.
- ❖ Zini R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A. & Tillement, J. P. 2002, Resveratrol-induced limitation of dysfunction of mitochondria isolated from rat brain in an anoxia-reoxygenation model. *Life Sci.* 71(26): 3091-3108.
- ❖ Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., Timmusk, T., Sipione, S. & Cattaneo, E. 2001, Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science.* 293 (5529): 493-498.
- ❖ Zuccato, C. & Cattaneo, E. 2007, Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 81 (5-6): 294-330.
- ❖ Zuccato, C. & Cattaneo, E. 2009, Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 5 (6): 311-322.
- ❖ Zuccato, C., Valenza M. & Cattaneo, E. 2010, Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* 90 (3): 905-981.
- ❖ Zucker, R. S., Kullmann, D. M. & Schwarz, T. L. 2004, Chapter 8- Release of neurotransmitters, In *From molecules to networks*. Eds. Byrne, J. H & Roberts, J. L., Academic Press, Burlington. Pages 197-244.

