



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efecto protector del ácido clorogénico en un modelo
de neurodegeneración estriatal y su modulación con
la neurotrofina BDNF**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

ALAM HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de
México, 2022.



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.

**Para el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo del
proyecto IN 216721 DGAPA-UNAM**

AGRADECIMIENTOS

Las siguientes líneas son en agradecimiento a todas aquellas personas que a lo largo de este proyecto universitario participaron activamente para su culminación; familia, amigos y profesores.

En primera instancia mencionaré a la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray, directora y asesora de tesis, quien me dio la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo, me proporcionó los recursos necesarios y, dedicó parte de su tiempo a revisiones y correcciones, al igual que apoyo y empatía por las vicisitudes tomadas para llegar al término del trabajo mencionado.

A mi Madre Alicia y mi Padre Mario que, a pesar del tiempo, las dificultades y el largo trayecto que requirió la finalización de esta etapa universitaria siempre estuvieron ahí para apoyarme, animarme y regañarme. A mi hermana Fatima por siempre ser la familia que siempre quise tener, a pesar de haber tomado tiempo en entendernos nunca dejamos de apoyarnos.

A mis compañeros de laboratorio, Cesar, Belén, Victor, Mundo, Dani, Liz y Ceci, por brindar siempre su apoyo además de una cálida amistad como también hacer ameno el transcurso de la ciencia. A mis amigos de universidad, aunque los caminos nos separaron siempre vive el recuerdo de los bellos momentos que conviví con ustedes.

Azareth Morales y su madre Natividad Alvarado, por la ayuda, los ánimos y su compañía en la vida misma, su llegada a mi vida trajo un nuevo panorama a mi visión, forma de ser y aprendizaje.

Por último, pero no menos importante, al M. en C. Ernesto Mendoza, por ser el primer compañero y guía de laboratorio, siempre apreciaré su infinita paciencia, apoyo y amistad a lo largo de proyecto.

“Life is like riding a bicycle. To keep your balance, you must keep moving”

Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
El sistema nervioso	2
Ganglios basales	3
El cuerpo Estriado	4
Transmisión Sináptica y Modulación Sináptica	6
Factores Neurotróficos y sus Receptores	8
Vías de señalización activadas por Neurotrofinas	9
• Vía de señalización de PLC- γ	10
• Vía de señalización PI3K/AKT	11
• Vía de señalización Ras/ERK	11
El BDNF y su importancia en la investigación	12
La Enfermedad de Huntington	13
Patología del HD	13
El ácido 3-Nitropropionico como modelo de investigación	15
Los antioxidantes, una alternativa en la prevención de enfermedades Neurodegenerativas	16
El ácido clorogénico	17
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivo General	19
Objetivos Particulares	19
METODOLOGÍA	20
Tratamiento de los animales	20
Obtención de rebanadas	20
Registro Electrofisiológico	21
Protocolo de Pulso Pareado	22
RESULTADOS	24
El CGA aumenta la respuesta sináptica poblacional en ratones tratados con 3-NP	24
El CGA no afecta la estabilidad de los cursos temporales	27
La modulación del BDNF cambia en rebanadas tratadas con CGA	28

La administración de BDNF en tejido tratado con CGA y 3-NP modifica los mecanismos presinápticos	30
DISCUSIÓN	30
El CGA como posible protector contra el 3-NP	31
La administración de CGA disminuye el daño causado por 3-NP.	32
La estabilidad curso temporal no se ve afectada por la administración de CGA	33
Modulación del BDNF en tejido tratado con CGA y 3-NP	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

ABREVIATURAS

3-NP: Ácido 3 nitropropiónico

ACh: Acetilcolina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Akt: Proteína cinasa

AMPA: Alpha-3-amino-hidroxy-5-Methy-4-isoxazole Propionic-Acid

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ATP: Adenosín trifosfato

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

Ca²⁺: Calcio

CAG: Triplete citosina-adenina-guanina

CGA: ácido clorogénico

CREB: Proteína unidora de los elementos de respuesta al

D1: Receptores dopaminérgicos tipo D1

D2: Receptores dopaminérgicos tipo D2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EPSP: Potencial postsináptico excitador

EP: Núcleo entopeduncular

ERK: Proteína cinasa regulada por señales extracelulares

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GP: Globo pálido

GPe: Globo pálido externo

GPI: Globo pálido interno

H0-1: Heme oxigenasa 1

H₂O₂: Peróxido de Hidrogeno

HD: enfermedad de Huntington

I.P: Intraperitoneal

IP-3: inositol trifosfato

IPSP: Potencial postsináptica inhibitorio

LPO: peroxidación lipídica

MSN: Neuronas Espinosas Medianas

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso

NO₂: Óxido nítrico

NMDA: N-Methyl-D-Aspartic acid

NT-3: Neurotrofina-3

NT-4/5: Neurotrofina-4/5

NTR: Receptor de neurotrofinas p75 PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa

O₂: SuperOxido

PLC-γ fosfolipasa C-γ (PLC-γ) fosfolipasa C-γ

PPF: Facilitación por pulso pareado

PPD: Depresión por pulso pareado

S1 primer potencial de acción

S2: segundo potencial

SDH: Succinato deshidrogenasa

SNP: sistema nervioso periférico SNP

SN: Sustancia nigra

SNc: Sustancia nigra pars compacta

SNr: Sustancia nigra pars reticulata

STN: Núcleo Subtalámico

RL: Radicales Libres

ROS: especies reactivas de oxigeno

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensajero

Trk: Receptores Tirocin Cinasa

RESUMEN

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos cerebrales ricamente interconectados en el cerebro anterior y en el cerebro medio de mamíferos, aves y reptiles. El neostriado es el focus natural de atención en los ganglios basales esto porque es la estructura más larga de los ganglios basales, el estriado está formado por una clase de células conocidas como neuronas espinosas medianas (MSN) y forman 95% de la población neuronal en el estriado. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) ha surgido como uno de los mayores reguladores del desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica, sobrevivencia neuronal, y diferenciación en el desarrollo de diferentes partes del cerebro adulto, como neuronas de hipocampo; células granulares neuronales y neuronas corticales. Estas estructuras se encuentran afectadas por la enfermedad de Huntington (HD), es una afección autosómica dominante, heredable, caracterizada por la presencia de movimientos incesantes y rápidos (coreas) y demencia. Una alternativa en el tratamiento es el uso de antioxidantes como el CGA el cual presentó un efecto protector en tejido tratado por 3-NP, la curva I/A mostró que el tejido tratado solamente con CGA 5 días tuvo la mayor amplitud, al igual el tratamiento PreCGA-CGA+3-NP 10 días. La mayor modulación fue de 47% con el tratamiento CGA+3-NP 5 días; aunque el otro tratamiento PreCGA-CGA+3-NP 10 días no tuvo la misma amplitud 28%, la amplitud fue mayor en comparación de grupos tratados solo con 3-NP.

El CGA se presenta como un fuerte antioxidante en el tratamiento y posible prevención de enfermedades neurodegenerativas.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso

Desde el siglo XX, los descubrimientos de Golgi y Ramón y Cajal sentaron las bases de la neurociencia moderna, gracias a ellos, el estudio del sistema nervioso abrió un nuevo panorama de investigación; con el paso del tiempo, se descubrieron nuevas estructuras, nuevas funciones y enfermedades.

El Sistema Nervioso, aunque complejo sigue un conjunto de principios funcionales y organizacionales sencillos y se divide en dos componentes principales: el Sistema Nervioso Central que consiste en el encéfalo y la médula espinal y, el Sistema Nervioso Periférico formado nervios periféricos y ganglios (grupos neuronales), ambos sistemas se encuentran separados anatómicamente, pero funcionan interconectados.

El sistema nervioso periférico (SNP) implica las neuronas sensitivas que conectan los receptores sensitivos sobre la superficie del cuerpo o más profundo dentro de él con circuitos de procesamiento relevantes en el sistema nervioso central; los cuerpos de las células nerviosas en el SNP se localizan en los ganglios, que son simplemente acumulaciones de cuerpos de células nerviosas. (Purves *et al.*, 2008). El SNP se divide en dos elementos: Somático y Autónomo. El sistema nervioso somático el cual proporciona al SNC información sensorial acerca del estado muscular, de la posición de las extremidades y del medio ambiente externo al organismo; el sistema nervioso autónomo es el sistema motor de las vísceras, la musculatura lisa del organismo y las glándulas exocrinas. Aunque están rodeados de vainas fibrosas en su trayecto hacia diferentes partes del cuerpo, se encuentran relativamente desprotegidos y es común que resulten dañados por traumatismos (Snell, 2007)

El sistema nervioso central está constituido esencialmente por dos elementos celulares, la neurona y la neuroglia (Figura 1). Las células nerviosas se encuentran en la llamada sustancia gris, que en el encéfalo ocupa principalmente la periferia o corteza y forma grupos o núcleos en la parte central de este órgano (Quiroz-Gutiérrez *et al.*, 2006).

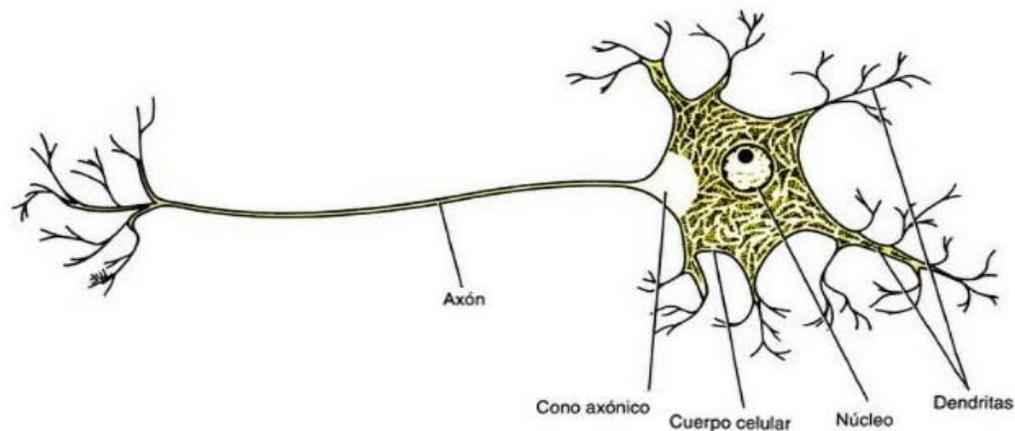


Figura 1. La neurona y sus partes. En una neurona típica se puede notar que está formada por un cuerpo celular o soma donde se encuentra el núcleo, de la periferia del cuerpo salen dos tipos de prolongaciones; unas múltiples, dendritas y otra única, el axón. Imagen tomada y modificada de Snell, 2007.

Ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos cerebrales ricamente interconectados en el cerebro anterior y en el cerebro medio de mamíferos, aves y reptiles. En muchas especies incluyendo la mayoría de los mamíferos, el núcleo del cerebro anterior de los ganglios basales son las más prominentes estructuras subcorticales telencefálicas. El largo tamaño de estos núcleos, y su similitud en función estructuras en una amplia gama de especies, hace probable que contribuyen a algunas muy esenciales funciones al plan organizado del cerebro de los vertebrados terrestres.

Los ganglios basales se encuentran en la base del telencéfalo, a través de la porción central del diencefalo, hasta el tegmento del mesencéfalo. Este complejo comprende clásicamente el estriado (el núcleo caudado y el putamen), el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra (Nieuwenhuys *et al.*, 2009). Las conexiones de los ganglios basales están vinculados a elementos sensoriales, motores, cognitivos y aparatos motivacionales del cerebro (Revisado en shepherd, 2004). El Neoestriado colecta y procesa la información de otras estructuras de los ganglios basales y virtualmente todas las regiones del córtex cerebral, así como el tálamo (Stansfield *et al.*, 2014).

Casi todas las conexiones aferentes de los ganglios basales llegan al Neoestriado, cada área del córtex proyecta a un núcleo distinto del estriado, y cada núcleo participa en una función conductual específica. Por ejemplo, el putamen está implicado fundamentalmente en el control motor; el caudado participa en el control de los movimientos oculares y en determinadas funciones cognitivas; y el Neoestriado ventral está relacionado con otras áreas corticales, que median los efectos de la emoción sobre la conducta. Las conexiones entre los ganglios basales son numerosas, pero ordenadas. Las células de distintas partes del caudado y del putamen, envían proyecciones a zonas específicas del globo pálido y la sustancia nigra (Revisado en Kandel, 1998).

El cuerpo Estriado

El neoestriado es el focus natural de atención en los ganglios basales esto porque es la estructura más larga de los ganglios basales, recipiente de la mayoría de las aferencias de entrada, y el origen de dos de las mayores vías que atraviesan los ganglios basales. (Revisado en shepherd, 2004)

El Neoestriado tiene proyecciones recíprocas con la sustancia nigra, pero no con sus otras fuentes principales de aferencia. Es decir que no hay proyecciones directas del neoestriado de vuelta a la corteza o al tálamo. Segundo, las proyecciones del neoestriado forman dos mayores vías a través de los ganglios basales. Una de estas, llamada Vía directa, que está formada por neuronas que tienen proyecciones directas al segmento interno del globo pálido (GPi) y a la sustancia nigra reticulada (SNr) y así gana acceso inmediato a la salida de los ganglios basales por el Tálamo. Si la vía directa está activa, el GPi está inhibido, el tálamo activo y por lo tanto la corteza activa. La otra vía eferente neoestriatal, llamada vía indirecta, está formada por neuronas que proyectan no más lejos que el segmento externo del glóbulo pálido (GPe). Estas neuronas pueden afectar la salida de los ganglios basales por la ruta del núcleo subtalámico (STN) y proyectar al GPi y SNr, los cuales inhiben al Tálamo y por lo tanto la corteza se inhibida (Revisado en Kandel, 1998, **Figura 2**).

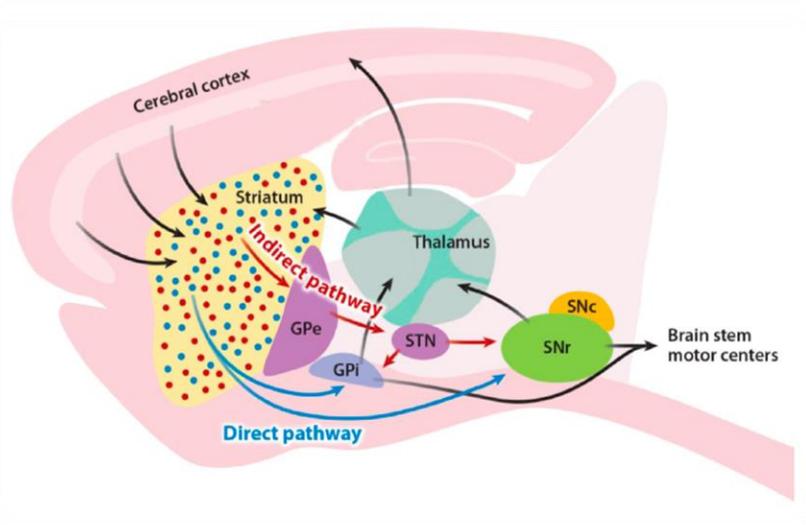


Figura 2. Modelo de la vía directa e indirecta en los ganglios basales. La vía directa (azul) inhibe al GPi y SNr, activando al Tálamo y a su vez a la Corteza; la vía indirecta (rojo) al activar al GPi el Tálamo se inhibe y por lo tanto la Corteza también. Siglas usadas en el esquema: Globo pálido externo (GPe), Globo pálido interno (GPi), Núcleo subtalámico (STN) Sustancia nigra reticulada (SNr), Sustancia nigra compacta (SNc). Imagen tomada y modificada de Nelson y Kreitzer, 2014.

El estriado está formado por una clase de células conocidas como neuronas espinosas medianas (MSN) y forman 95% de la población neuronal en el estriado (Tisch *et al.*, 2004), estas son el destino de los axones que provienen de la corteza, este tipo de célula se caracteriza por formar árboles dendríticos grandes que le permiten integrar las aferencias de distintas estructuras como corticales, talámicas y del tronco del encéfalo. Las MSN pueden ser divididas en dos poblaciones, una que sintetiza GABA y expresan sustancia P y receptores a dopamina D1, y otra que sintetiza GABA y expresa encefalina y receptores D2. Las MSN que expresan sustancia P forman parte de la vía directa mientras que, las que expresan encefalina forman parte de la vía indirecta (Nieuwenhuys *et al.*, 2009). Los axones de las MSN convergen sobre neuronas en el GP y la porción reticular de la sustancia nigra. Las neuronas MSN representan la fuente principal de eferencia del complejo de los ganglios basales (Purves *et al.*, 2008). Algunas entradas corticales proyectan a las interneuronas. Actualmente se han reconocido varios tipos de interneuronas entre las que se encuentran bien descritas las: colinérgicas, fast-spiking GABAérgicas, y óxido nítrico sintasa. (Kawaguchi *et al.*, 1997)

Transmisión Sináptica y Modulación Sináptica

Las células nerviosas son las unidades elementales de la comunicación del sistema nervioso, son las únicas células que tienen la capacidad especial de comunicarse entre ellas. Esta comunicación se logra con la sinapsis. La sinapsis permite la transmisión de señales entre las neuronas. Se conocen solamente dos mecanismos básicos de comunicación: la sinapsis eléctrica y la sinapsis química (Figura 3).

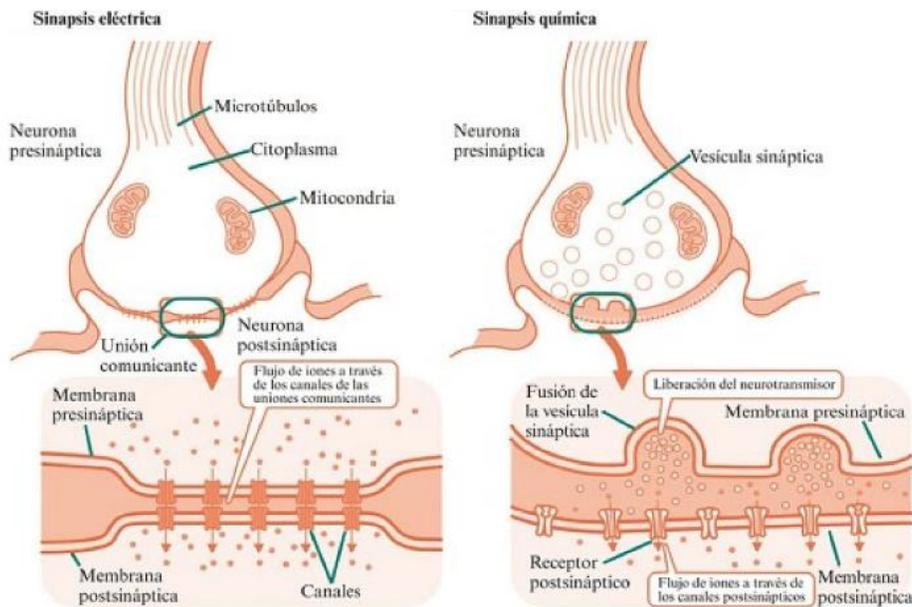


Figura 3. Sinapsis química y eléctrica. En la sinapsis eléctrica (izq.) ambas neuronas se encuentran en contacto directo, así los canales iónicos permiten un paso de sustancias químicas más rápido; por otra parte, en la sinapsis química (der.) ambas neuronas se encuentran ligeramente separadas, donde se libera sustancias químicas como neurotransmisores. Imagen tomada y modificada de Manzanero y Ángel, 2016.

La sinapsis eléctrica permite el flujo pasivo y directo de corriente eléctrica de una neurona a otra. En la transmisión eléctrica, que usualmente es bidireccional, de una neurona surge la corriente (elemento presináptico) y la neurona hacia la cual fluye esta corriente (elemento postsináptico) en este caso, así la carga eléctrica puede pasar desde cualquiera de las dos neuronas a la otra, así que ambas células pueden ser pre y postsinápticas en distintos momentos (Bargas y Galarraga, 2008). Las membranas de las dos neuronas se aproximan extremadamente conectándose por una especialización intercelular llamada unión estrecha (Purves *et al.*, 2008). Las uniones estrechas contienen canales iónicos llamados conexones, los cuales se encuentran apareados y alineados de modo que cada par de canales forma un poro lo que permite el paso de distintas sustancias simplemente por el

citoplasma de ambas neuronas. Los canales son de baja resistencia y alta conductancia, permitiendo a la transmisión eléctrica ser extraordinariamente rápida.

La sinapsis química, como su nombre lo dice es la comunicación química de dos neuronas que al unirse forman un espacio sináptico. Donde un mensajero químico se libera de las terminales sinápticas de la neurona presináptica. Este mensajero, llamado neurotransmisor cruza dicho espacio por difusión simple y llega los receptores afines a este en la neurona postsináptica en donde se ejerce su efecto (Bargas y Galarraga, 2008).

Es importante saber que la sinapsis química es la más usada en el sistema nervioso y la liberación de neurotransmisor tiene efectos que modulan el potencial de membrana de la neurona postsináptica llamado potencial sináptico. El resultado de esta modificación crea sinapsis excitadoras y sinapsis inhibitoras, la sinapsis excitadora se da cuando el neurotransmisor que se libera despolariza el potencial de membrana al umbral de disparo e incluso la hace disparar un potencial de acción, esta despolarización se le conoce como Potencial postsináptico excitador (EPSP, por sus siglas en inglés). Por el contrario, una sinapsis es inhibitora cuando el transmisor liberado por la terminal presináptica hiperpolariza a la membrana postsináptica y la aleja del potencial de umbral evitando así el disparo del potencial de acción por la neurona postsináptica, este potencial es llamado Potencial postsináptico inhibitorio (IPSP, por sus siglas en inglés) (Bargas y Galarraga, 2008).

Para entender de mejor la modulación, es necesario conocer primero que dentro de las sinapsis químicas existen dos tipos, la sinapsis rápida también llamada directa, donde el neurotransmisor se pega a los receptores-canal denominados receptores inotrópicos que atraviesan la membrana, cuando esto sucede el receptor se activa abriéndose, dejando pasar cargas iónicas y cambiando el potencial de membrana de la neurona postsináptica. La sinapsis lenta o indirecta ocurre diferente, en este caso el neurotransmisor liberado de la presinapsis no activa directamente los receptores-canal, sino que activa receptores metabotrópicos, a estos receptores se pegan la proteína G cambiando su conformación y activándose, cuando la proteína G se activa, los canales iónicos pueden activarse y por lo tanto formar un cambio en el potencial de membrana (Bargas y Galarraga, 2008).

La importancia de la sinapsis lenta radica una vez que la proteína G se activa, provoca que enzimas de membrana produzcan segundos mensajeros que a su vez activan toda una cascada de señalización intracelular. Los segundos mensajeros, activan proteínas quinasas específicas que fosforilan una variedad de proteínas celulares, movilizan iones Ca^{2+} del

almacén intracelular, e inician las reacciones que modifican el estado celular (Kandel *et al.*, 1998). En muchas neuronas la fosforilación proteica cambia la apertura o cierre de canales, aumenta o disminuye su función, la acción de modificar estas condiciones se le dice “modular”. Por lo tanto, la modulación permite intercambiar entre el aumento o disminución de la apertura de los canales iónicos en respuesta de que sinapsis química esté activada, No hay que olvidar, que también existen moléculas que no funcionan como neurotransmisores específicos, sino como neuromoduladores, estos afectan la sensibilidad de la neurona postsináptica sin producir potenciales postsinápticos. La mayoría de los neuromoduladores actúan a través de segundos mensajeros, y sus efectos duran mucho más que los neurotransmisores así, la liberación de un neuromodulador aumenta, prolonga, inhibe o limita el efecto del neurotransmisor principal sobre la neurona postsináptica (Silverthorn, 2008). Con todo lo anterior, la modulación sináptica modifica el estado bioquímico de la neurona y permite cambiar las propiedades de los canales iónicos teniendo como resultado un efecto en el potencial sináptico, esto permite a las neuronas modificar las conexiones sinápticas y su comunicación entre ellas.

Factores Neurotróficos y sus Receptores

Los factores tróficos son sustancias de naturaleza peptídica que se originan en tejidos específicos para cumplir funciones importantes como en procesos de migración, crecimiento, diferenciación y sobrevivencia de distintos tipos celulares, los factores tróficos que regulan dichos procesos en las células nerviosas se les conoce como factores neurotróficos (Castillo-Padilla y Rivas-Arancibia, 2011) . Actualmente se han identificado cuatro neurotrofinas en mamíferos; factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), y neurotrofina-4/5 (NT-4/5). Aunque ambas neurotrofinas son homologas en la secuencia de aminoácidos y en la estructura, difieren en su función. Por ejemplo, el NGF apoya la sobrevivencia y el crecimiento de neuronas simpáticas, el BDNF no puede, al contrario, sostiene la supervivencia de ciertas neuronas de los ganglios sensitivos y NT-3 apoya ambas poblaciones (Purves *et al.*, 2008). Como la mayoría de los polipéptidos, la síntesis proteica de las neurotrofinas ocurre en el retículo endoplásmico, posterior salen en forma de proneurotrofinas, son empaquetadas y secretadas en vesículas. La proneurotrofinas son procesadas junto con las vesículas por

proteasas de la familia propoteína convertasa (Lewin y Carter, 2014). El resultado es una neurotrofina madura, la cual comienza un proceso de señalización al unirse a un receptor.

Estas cuatro neurotrofinas interactúan con 4 receptores; el $p75^{NTR}$, y los receptores tirosina cinasa TrkA, TrkB y TrkC. Todas las neurotrofinas presentan una baja afinidad para el receptor $p75^{NTR}$. En cambio, los receptores tirosina cinasa tiene diferente afinidad a cada neurotrofina, así la neurotrofina NGF se une potencialmente y activa al receptor TrkA, NT-3 de igual manera activa TrkC además de poderse unir con menor afinidad a los demás receptores, por ultimo NT-4 y BDNF se enlazan y activan el receptor TrkB (**Figura 4**). Sus funciones son complejas; al encontrarse separados $p75^{NTR}$ y el receptor Trk pueden funcionar independiente, pero en neuronas que expresan ambos receptores estos mismos interactúan física y funcionalmente en formas que pueden alterar las propiedades de señalización de ambas. (Lewin y Carter, 2014).

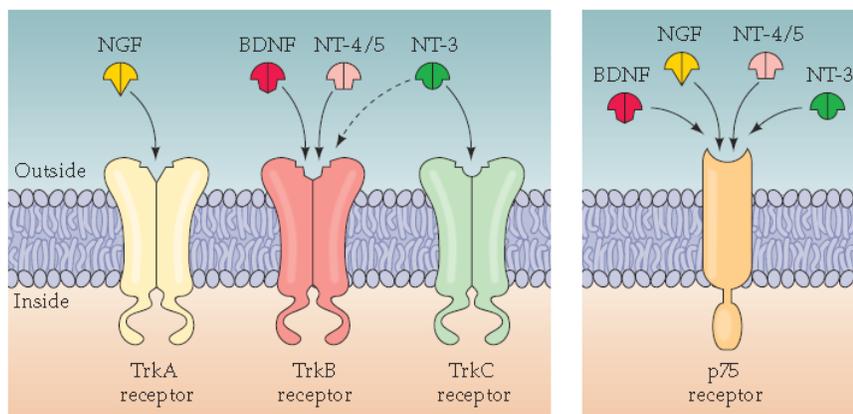


Figura 4. Las neurotrofinas y sus respectivos receptores. Se muestra la interacción de cada neurotrofina con su respectivo receptor. Imagen tomada de Purves, 2008.

Vías de señalización activadas por Neurotrofinas

Los mecanismos de señalización de los receptores Trk son estimulados por la dimerización mediada por la neurotrofina, resultando en la fosforilación del residuo de tirosina específico donde se unió la neurotrofina. Los sitios de tirosina fosforilados median la señalización a través de la creación de sitios de acoplamiento para las proteínas efectoras que inician la activación de las vías de señalización intracelular. Hay que aclarar que los receptores son específicamente activados por la neurotrofina madura y no por pro-neurotrofinas, en este

caso el receptor p75 presenta mayor afinidad a estas. El Trk fosforilado sirve como matriz para el reclutamiento de una variedad de proteínas adaptadoras y de enzimas cuyas moléculas contienen el dominio SH2, las vías mayores activadas por los receptores Trk son Ras, fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y fosfolipasa C- γ (PLC- γ) (Skaper, 2008; Taleisnik, 2006) (Figura 5).

- Vía de señalización de PLC- γ

A partir de la fosforilación, del residuo tirosina, p. ej. Y785 para el receptor TrkB. Da inicio al reclutamiento y activación de PLC- γ , la cual hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PI(4,5) P₂) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) IP₃ conduce a una liberación de Ca²⁺ intracelular, dado como resultado la activación de enzimas ca²⁺ dependientes. Estas enzimas regulan proteínas quinasas (CaM quinasas), por otra parte, la liberación de Ca²⁺ y la producción de DAG activa proteína quinasa C (PKC), la cual estimula subsecuente la Erk

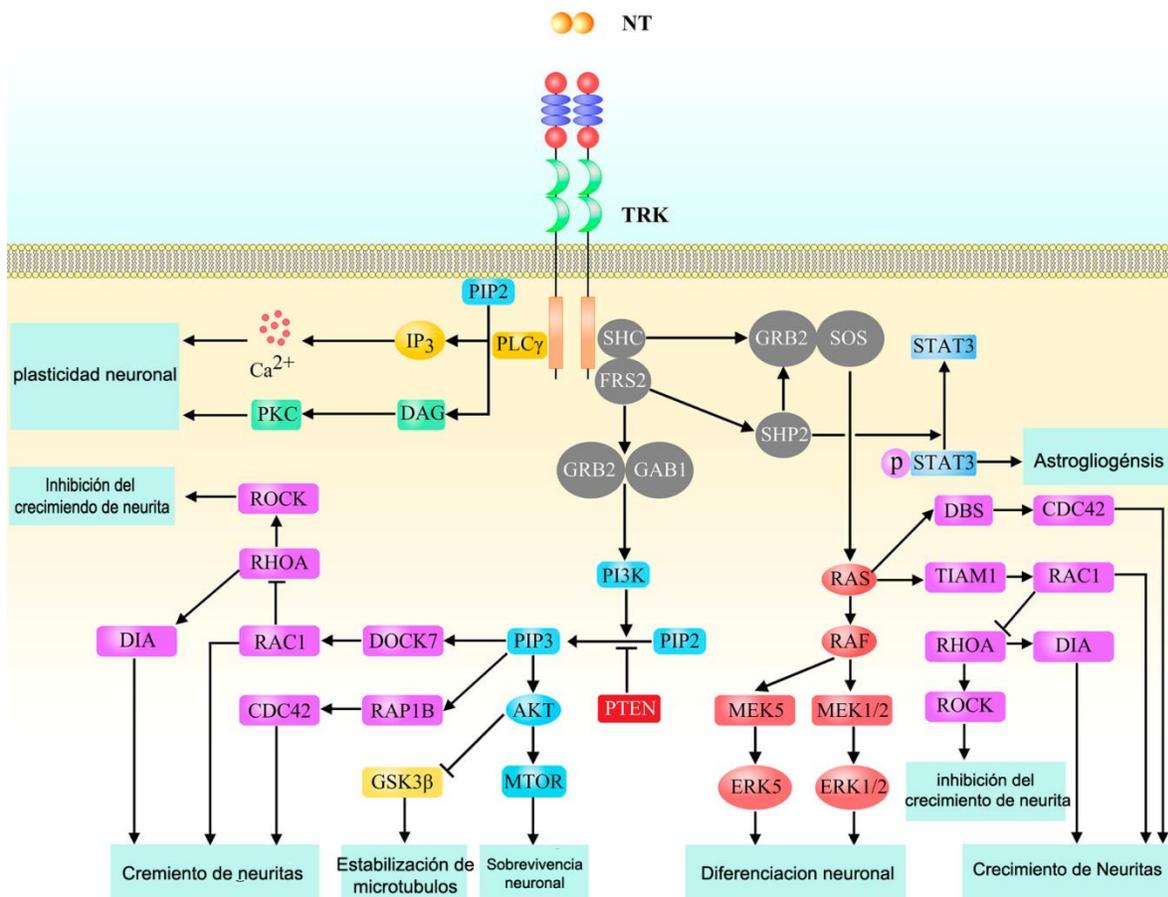


Figura 5. Las vías de señalización. Se muestran cada una de las vías posibles activadas por las neurotrofinas. Siglas usadas, neurotrofina (NT), Receptor tirosina quinasa (TRK), las vías mayor activadas por los receptores Trk son Ras, fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y fosfolipasa C- γ (PLC- γ). Imagen tomada y modificada de Pramanik *et al.*, 2016.

vía Raf. La vía PLC- γ es activada por la unión de NGF y BDNF teniendo efectos como el crecimiento de conos axonales, también se ha demostrado que la activación PLC- γ por efecto del BDNF modula en hipocampo la potenciación a largo plazo (LTP) (Pramanik *et al.*, 2016).

- Vía de señalización PI3K/AKT

Cuando el residuo de la tirosina más cercano al dominio transmembranal se fosforila (Y490 en TrkA o 515 en TrkB) se crea un sitio de unión para la Shc, esto lleva a la activación de PI3K vía Grb2 y Gabl, después, la fosforilación de (PIP2) produce (PIP3). Como consecuencia Akt se transloca a la membrana plasmática y se activa. Es importante destacar que la hidrólisis de PIP2 por la PLC- γ lleva a la producción de IP₃ y DAG. Akt tiene una actividad importante como promotor de la supervivencia neuronal esto es debido a que inhibe el sitio de transcripción del factor FKHL1, el cual regula la expresión de genes pro apoptóticos (Lewin y Carter., 2014). Tanto BDNF como NT-4/5 activan esta vía por unión al TrkB, estudios como (188) ha demostrado que la regulación del tamaño del soma, el patrón de ramificación dendrítica y la morfología de las espinas dendríticas en neuronas de hipocampo, está mediada por BDNF vía PI3K/AKT/MTOR.

- Vía de señalización Ras/ERK

La vía PI3K también puede ser mediada por RAS. Esto ocurre por el sitio de unión Shc, el cual inicia la señalización por Erk. Con esto, el complejo (Grb2) junto con SOS estimulan la activación de Ras río abajo, esta activación también produce PIP3, y el inicio de cascadas como c-Raf/MEK/Erk. Con esto, neurotrofinas como BDNF y NT-4/5 modulan neurogénesis, plasticidad sináptica y formación de la memoria por rutas como MEK5-ERK5 (Pramanik *et al.*, 2016).

El BDNF y su importancia en la investigación

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) ha surgido como uno de los mayores reguladores del desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica, sobrevivencia neuronal, y diferenciación en el desarrollo de diferentes partes del cerebro adulto, como neuronas de hipocampo; células granulares neuronales y neuronas corticales (Pramanik *et al.*, 2016).

Cómo ya se abordó en el capítulo anterior, el BDNF se produce en neuronas corticales hacia el núcleo estriado donde se une específicamente al receptor TrkB, activando vías como PLC- γ y PI3K principalmente, por lo tanto; para la estabilidad neuronal, el BDNF juega un papel importante. En enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington incluso en trastornos como esquizofrenia y depresión se ha observado un cambio en los niveles de expresión de BDNF (Angelucci *et al.*, 2005). Los ganglios basales resultan ser uno de los más afectados en los procesos de neurodegeneración, en particular el núcleo estriado ha sido objeto de amplios estudios porque se afecta en dos patologías neurodegenerativas que tienen incidencia relativamente alta: la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Hernández-Echeagaray, 2004) El tratar de revertir el daño causado por ambas condiciones resulta difícil debido a los altos costos de los fármacos actuales y que sólo logran retardar el avance de la degeneración o mitigar los síntomas que se presentan..

Debido a esto, los efectos de su uso ya han sido investigados. En el 2000, trabajos de Ferrer *et al.*, mostraron una carencia de BDNF de 53% a 83% en disecciones de pacientes post-mortem de la EH y en modelos de EH en ratones (Zuccato *et al.*, 2000). Resulta claro que el BDNF presenta una relación estrecha con el desarrollo de ciertas enfermedades neurodegenerativas. Por eso, el uso de BDNF ha mostrado ser una opción como protector. Trabajos como Li *et al.*, 1998 reportaron que la administración *in vitro* de BDNF incrementaba la transmisión glutamatérgica. De igual manera Mendoza *et al.*, observaron un mejoramiento en la modulación de la transmisión cortico-estriatal, demostrando que la administración de BDNF mejora la modulación sináptica.

Con base en lo anterior, el BDNF resulta como una vía alterna para mejorar e incluso tratar los efectos adversos de las enfermedades neurodegenerativas; dentro del laboratorio la enfermedad de Huntington juega un papel importante, pero ¿Qué es la enfermedad de Huntington?

La Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD), es una afección autosómica dominante, heredable, caracterizada por la presencia de movimientos incesantes y rápidos (coreas) y demencia. La HD afecta a las neuronas GABAérgicas de proyección del núcleo estriado lo que supondría ser la causa del corea y la pérdida de las neuronas piramidales grandes de las capas corticales profundas de asociación frontal, temporal y parietal explicaría el deterioro cognitivo y la demencia. La magnitud de la degeneración neuronal conduce a la muerte del paciente. Afecta de 4 a 10 personas de cada 100,000 sin predominio sexual (Hernández-Echeagaray, 2004). A pesar del avance en investigación, los mecanismos de muerte celular aun no son claros, diversos estudios han encontrado que la HD es el resultado de una mutación constituida por la interrumpida secuencia de trinucleótidos CAG localizados cerca de la terminal -5' en el exón 1 de la secuencia que codifica el gen de la EH, el cual comprende 67 exones (Gil y Rego., 2008). En la población normal el número de repeticiones de CAG varía de 6 a 35 repeticiones; mientras que en pacientes con la EH la expansión de trinucleótidos supera los niveles normales (40 a 121 repeticiones), mientras mayor sean las repeticiones de CAG, mayor serán las probabilidades de desarrollar la enfermedad en edades tempranas, así como síntomas más agresivos y una esperanza de vida más corta (Hernández-Echeagaray, 2014).

Patología del HD

Ya sabemos que en el desarrollo de la HD las neuronas GABAérgicas son las principales afectadas.

Se ha sugerido que la neurodegeneración estriatal en la HD pudiera resultar de los efectos combinados de disfunción metabólica, excitotoxicidad y estrés oxidativo (Cepeda *et al.*, 2006).

Nosotros nos centraremos en la excitotoxicidad y el estrés oxidativo. La excitotoxicidad se refiere a la muerte neuronal resultado de la exposición crónica a aminoácidos excitadores. Como se ha observado la corteza cerebral proyecta una entrada masiva de conexiones glutamatérgicas al neostriado. Se ha observado en la HD la activación de tres receptores glutamatérgico (AMPA, NMDA y metabotrópicos). La activación de los receptores AMPA

(Alpha-3-amino-hidroxy-5-Methy-4-isoxazole Propionic-Acid) induce el flujo de sodio el cual provoca la despolarización de la membrana, provocando la activación de los receptores NMDA (N-Methyl-D-Aspartic acid), permitiendo la entrada de calcio (Ca^{2+}) a la célula. Cuando los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G se activan, inducen la activación de segundos mensajeros como el inositol trifosfato (IP-3) que dispara la liberación de Ca^{2+} citoplasmático (Ruedas-Callejas, 2010). La entrada masiva de Calcio a la célula durante la excitotoxicidad conduce a una sobrecarga de calcio mitocondrial, alterando su actividad y la producción de ATP. La elevación de calcio intracelular activa enzimas como las proteasas, endonucleasas o fosfolipasas, especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales libres y la activación del óxido nítrico sintasa tipo I, y la consiguiente liberación de óxido nítrico, contribuyendo así a la degeneración de diferentes componentes celulares y a la muerte neuronal (Ruelas-Callejas, 2010; Tasset et al., 2009).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la generación de ROS y los sistemas antioxidantes endógenos. Las ROS son radicales libres formados por moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones impares en su átomo o en los orbitales moleculares, así el electrón impar provee a los radicales libres una gran cantidad de reactividad (Ashu y Beal, 2012). Dentro del grupo de ROS se encuentran, moléculas como oxígeno atómico, el ozono, oxígeno singulete, superóxido, peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilos, así como intermediarios nitrógeno (NO y peróxinitrito) (Ashu y Beal, 2012; Castillo-Padilla, 2011). Un exceso de ROS como resultado de una falla en la regulación de antioxidantes endógenos resulta en un daño a importantes moléculas biológicas como carbohidratos, proteínas, lípidos, DNA y RNA, lo cual conduciría a una muerte celular y daño en el tejido. Aunque los mecanismos que explican el daño oxidativo por las ROS aun no son claros, se conoce que los radicales libres provocan una lipoperoxidación al contacto con los lípidos de la membrana. En esta reacción el radical libre oxida una cadena insaturada de lípido, formando un lípido hidroperóxido y un radical alquino. El alquino reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial provocando una reacción en cadena. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y daño en su integridad (Cárdenaz-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

El ácido 3-Nitropropionico como modelo de investigación

El ácido 3-nitropropionico (3-NP) ha sido usado para estudiar la disfunción mitocondrial en relación con la HD. Tomando importancia debido a la similitud que puede alcanzar su uso con el desarrollo de la enfermedad. La administración experimental del 3-NP ha permitido observar una degeneración preferencial del putamen y núcleo caudado, de igual manera su administración en primates no-humanos produce efectos similares y, en ratones donde el estriado es también particularmente vulnerable a la administración de esta toxina (Revisado en Brouillet *et al.*, 2005; Serrano-Sánchez *et al.*, 2011). Trabajos como el de Rodriguez *et al.*, en el 2010 descubrieron que la administración de bajas dosis de 3-NP produce una patología temprana de la HD en el estriado del ratón, además de generar estrés oxidativo. Así el 3-NP puede ser usado para replicar en animales de laboratorio el fenotipo de ciertas condiciones neurodegenerativas.

Desafortunadamente, los mecanismos por el cual el 3-NP induce lesión en el estriado siguen sin conocerse completamente; estudios han descubierto que el 3-NP presenta dos señales; la primera es una selectiva inhibición de la actividad del complejo II de la cadena

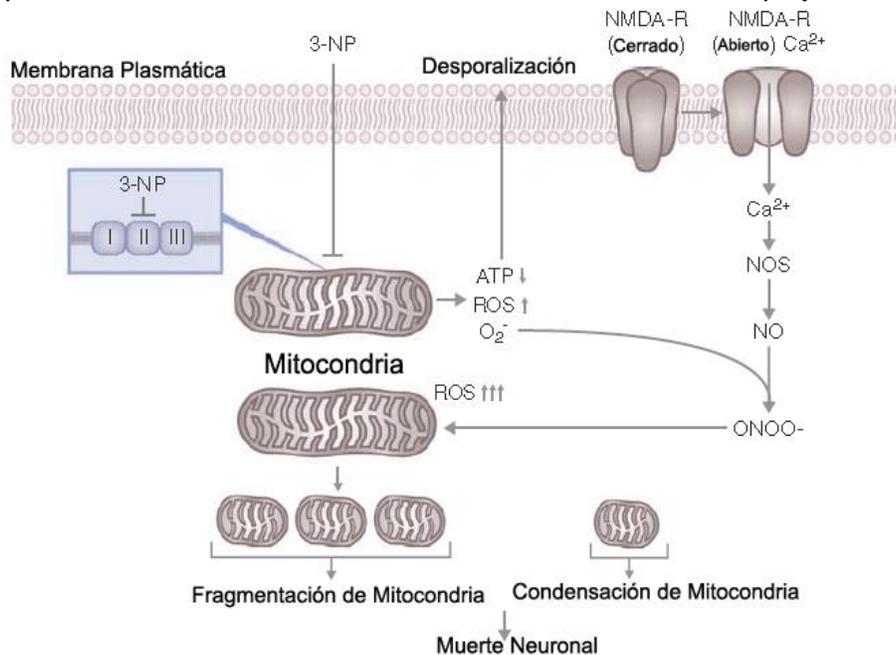


Figura 6. Modelo de acción del 3-NP en la célula. El 3-NP actúa uniéndose al complejo II de la cadena respiratoria de la mitocondria, esto provoca un desequilibrio, primero un aumento en ROS y disminución de ATP; esto activa la apertura de los canales NMDA los cuales provocan una segunda oleada de ROS, como resultado la mitocondria sufre tanto fragmentación como condensación. Terminando en la muerte de la célula. Imagen tomada y modificada de Liot *et al.*, 2009.

respiratoria y la enzima succinato deshidrogenasa (SDH); causando una rápida caída de ATP y un leve incremento de ROS, en principio esto no causa alteración en la morfología mitocondrial ni en la supervivencia neuronal; la segunda señal ocurre después por la activación de receptores NMDA los cuales causan un segundo aumento de ROS y la fragmentación mitocondrial (Figura 6). Esto resulta en una conexión entre la disfunción mitocondrial y excitotoxicidad en un modelo celular relevante para HD (revisado en Liot *et al.*, 2009).

Los antioxidantes, una alternativa en la prevención de enfermedades Neurodegenerativas

Como se abordó, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad tienen un rol importante en el desarrollo de afecciones neurodegenerativas; el tratar de revertir el daño causado por ambas condiciones resulta muchas veces difícil debido a los fármacos actuales ya que solo logran retardar el avance de la degeneración o mitigar los síntomas que se presentan. Por esto una alternativa importante es el uso de antioxidantes, dado que su uso ha demostrado efectos anti-inflamatorios, cardioprotectores, actividad anticancerígena, antimicrobianos entre otros y su empleo resulta relativamente fácil como sus costos (Moosavi *et al.*, 2016).

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, a bajas concentraciones, comparada con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell, 1990). La propiedad antioxidante se debe a que contienen una cierta cantidad de R-OH base, se puede formar un radical -OH antioxidante, para eliminar el anión superóxido y el radical hidroxilo y otras actividades de los radicales libres, protegiendo los tejidos del daño de oxidación; aunque no se sabe con certeza como funciona cada antioxidante; se han propuesto dos mecanismos de cómo funcionan en la mayoría; en el primer mecanismo un radical libre toma un átomo de hidrogeno del antioxidante, convirtiéndose esta última en radical. En el segundo mecanismo, se dona un electrón del antioxidante al radical libre, convirtiéndose en un catión radical, el cual también es estable (Leopoldini *et al.*, 2004).

El ácido clorogénico

Dentro de los antioxidantes de mayor consumo humano se encuentra el ácido clorogénico,

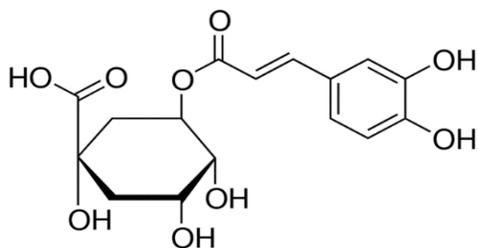


Figura 7. El ácido Clorogénico.
Estructura del ácido Clorogénico. Imagen tomada de Sigma-Aldrich. 2017.

ya que se encuentra en la mayoría de las especies de grano de café, así como en manzanas, peras, zanahorias, tomates entre otras (Sung *et al.*, 2001).

El ácido clorogénico (CGA) (Figura 7) es un polifenol, esto quiere decir que se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol. El CGA es un éster formado de ácido cafeico y el ácido quínico, importante en las plantas por la formación de las

paredes celulares como la madera y corteza. Se ha reportado que un consumo frecuente de café resulta en una mejoría de salud y prevención de enfermedades (Boyer y liu, 2004). El CGA presenta una actividad protectora contra enfermedades crónicas como inflamación, diabetes, afecciones cardiovasculares, así como efectos antibióticos y neuroprotectores (Upadhyay y Mohan-Rao, 2013); aunque este último no ha sido abordado lo suficiente para saber más de sus efectos en enfermedades neurodegenerativas en especial con la HD.

Trabajos en el 2007 de Li *et al.*, demostraron el efecto neuroprotector de cultivos de célula PC12 *in vitro* contra apoptosis inducida por metilmercurio (MeHg). El CGA suprimió la generación de ROS, disminuyó la actividad de la Glutación Peroxidasa bajando los niveles de Glutación; además de atenuar la activación de la caspasa-3 por MeHg, sugiriendo que el CGA ejerce efecto protector a través de mecanismos antioxidantes.

Kwon *et al.*, en el 2011, evaluaron el efecto neuroprotector del CGA en un modelo de amnesia inducido por escopolamina. El CGA mejoró significativamente la memoria a corto plazo en ratones tratados con escopolamina, además incrementó la duración. Los experimentos demostraron que el CGA decrementó la actividad de la malondialdehido esterasa en el hipocampo y corteza frontal, además de la inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa y la formación de radicales libres.

En 2011, los trabajos de Sato *et al.*, mostraron los efectos antioxidantes *in vivo* e *in vitro* del ácido cafeico y el CGA contra un modelo de daño isquémico. El ácido cafeico presento una significativa mejoría antioxidante contra el CGA en cultivos *in vitro* de células Caco-2. La

hidrolisis del CGA *in vivo* tiene importancia ya que resulta en el metabolito del ácido cafeico el cual tiene un mayor efecto que el CGA.

Por otra parte, Koriem y Soliman en 2014, demostraron que el CGA previene la toxicidad en hígado en un modelo de estrés oxidativo inducido por Metanfetamina, a la vez que el CGA presentó un mejor efecto contra ROS y óxido nítrico.

Con los antecedentes expuestos, en este trabajo evaluamos si el CGA exhibe un efecto protector en un modelo de neurodegeneración estriatal que imita a la HD.

Justificación

Debido a que el estrés oxidativo y la excitotoxicidad son mecanismos que actúan de forma activa en enfermedades neurodegenerativas como la HD, una alternativa y vía para el tratamiento y/o mejoramiento de esta, es el uso de antioxidantes como el CGA, por lo que conocer su importancia en un modelo de neurodegeneración estriatal resulta de gran ayuda para determinar su efectividad en el tratamiento de enfermedades.

Hipótesis

I La actividad electrofisiológica en rebanadas provenientes de ratones tratados con CGA, presentaran una mejoría en su actividad con respecto a las rebanadas solo tratadas con la toxina 3-NP.

II El efecto modulador de la neurotrofina BDNF mejorará en rebanadas provenientes de animales tratados con el CGA en comparación de las que solo se trataron con 3-NP.

Objetivo General

- Evaluar la respuesta sináptica poblacional en rebanadas de ratones C57B/L6 previamente tratados con CGA y 3-NP y su modulación con la neurotrofina BDNF.

Objetivos Particulares

- Comparar el efecto del CGA en diferentes esquemas de administración.
- Evaluar la amplitud de la respuesta sináptica poblacional de diferentes rebanadas de ratones previamente tratados con CGA y 3-NP.
- Evaluar el efecto modulador de la neurotrofina BDNF en rebanadas de ratón C57B/L6 previamente tratados con CGA y 3NP.

METODOLOGÍA

Tratamiento de los animales

Para efectuar los experimentos se usaron ratones macho C57/BL6 (Harlan Laboratories Inc., Ciudad de México, México), de 5 semanas de nacidos, los cuales fueron asignados a uno de los siguientes grupos experimentales: El primer grupo fue el grupo control (vehículo del fármaco, amortiguador de Fosfatos pH 7.4), al segundo grupo se le administró inyección intraperitoneal (i.p.) sólo CGA (100mg/kg) por 5 días consecutivos, el tercer grupo se le administró de igual manera CGA, pero por 10 días. Los siguientes grupos fueron tratados con CGA más 3-NP (15mg/kg) por 5 días y un grupo de pretratamiento el cual consistió en administrar 5 días CGA primero y después siguió una administración de CGA y 3-NP por 5 días, sumando un total de 10 días de tratamiento; al último grupo se le administró solo 3-NP por 5 días (Figura 8).

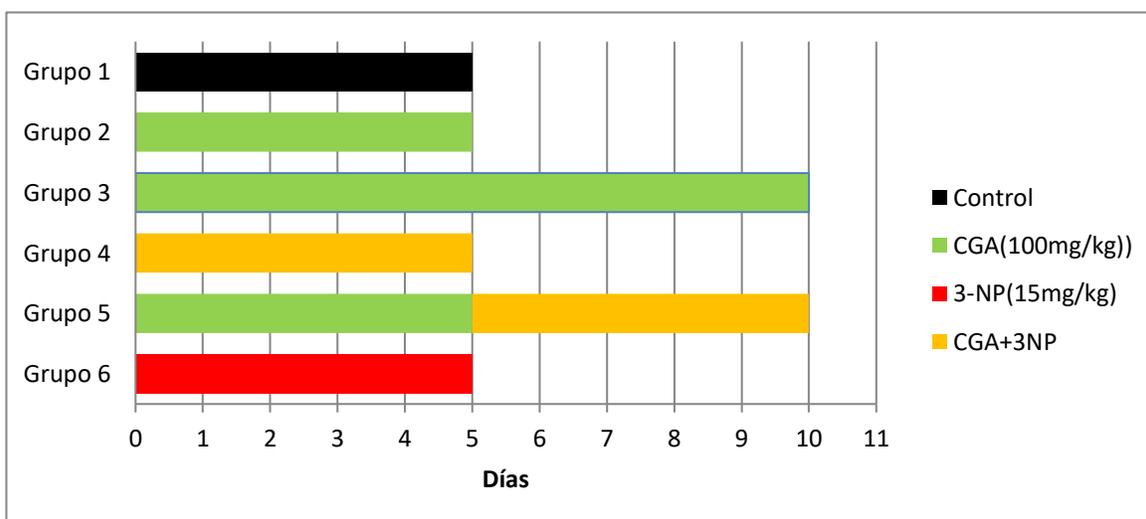


Figura 8. Organigrama de los diferentes tratamientos. Se muestra los tiempos de cada grupo.

Obtención de rebanadas

Dos días después del último día de tratamiento los ratones fueron anestesiados y poco después sacrificados por decapitación. Se extrajo el cerebro, se le retiraron los bulbos olfatorios y el cerebelo, rápidamente fue colocado en una solución salina fría (4°C) de bajo Calcio (130nM NaCl, 3mM KCl, 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃ y 10mM de glucosa; pH 7.4) con el fin disminuir el metabolismo de las neuronas y reducir el daño celular por el procedimiento.

Los dos hemisferios fueron separados y cortados de manera sagital a 400 micras en un vibratomo (Pelco® 102, 1000, Plus, USA) aún inmersas en la solución salina. Las rebanadas obtenidas de los dos hemisferios fueron colocadas a temperatura ambiente y oxigenación constante (95% O₂ y 5% CO₂) por una hora antes del registro electrofisiológico en una solución extracelular (125mM NaCl, 3mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 26mM NaHCO₃, 0.2mM tiourea, 0.2mM ácido ascórbico y 10mM glucosa; pH 7.4) la cual imita el líquido cerebroespinal.

Registro Electrofisiológico

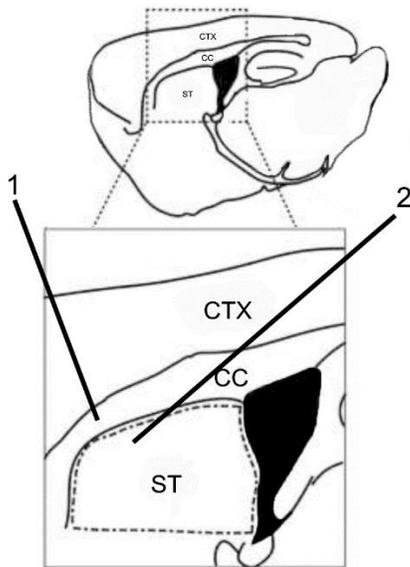


Figura 9. Registro electrofisiológico. Esquema de una rebanada de ratón, en 1 se muestra el área de estimulación, en 2 la zona de registro de la respuesta sináptica poblacional. Corteza (CTX), cuerpo calloso (CC) y estriado (ST). Imagen tomada y modificada de McCollum *et al.*, 2013.

Cada una de las rebanadas tratadas de los diferentes grupos fue colocada en una cámara de registro a temperatura de 32-34°C, con constante perfusión de la solución extracelular y oxigenada (95% O₂ y 5% CO₂) en todo momento. Se agregó al baño Bicuculina (10µM) para bloquear las respuestas inhibitorias GABAérgicas. El registro se realizó en el área dorsolateral para simular la sinapsis córtico-estriatal, se colocó un electrodo de estimulación en el cuerpo calloso y, la respuesta sináptica poblacional se registró con un segundo electrodo de borosilicato situado a una distancia no mayor 5mm (Figura 9). Se obtuvieron curvas intensidad-voltaje para conocer la condición en que se encuentran las rebanadas y obtener una respuesta poblacional media con el fin de no sobre estimular la respuesta. Una vez

obtenida la respuesta media necesaria, se hicieron cursos temporales para demostrar que la respuesta no se ve afectada con el tiempo, asegurado esto, se administró BDNF (10ng/ml) al baño y se observó su efecto en la modulación sináptica. Para saber si el efecto modulador del BDNF en la sinapsis es pre- o postsináptico se utilizó el protocolo de pulso pareado. Los registros se digitalizaron y analizaron con el software OriginPro7 y análisis estadístico fue con el programa Sigma.

Protocolo de Pulso Pareado

Es necesario conocer que el pulso pareado tiene como fundamento la teoría de Ca^{2+} residual de Katz y Miledi, 1968. Su trabajo demostró que una pequeña fracción de Ca^{2+} que entra a la terminal en respuesta al primer potencial de acción permanece por cientos de milisegundos ya que la neurona no tiene la capacidad de eliminarlo o amortiguarlo entre cada potencial de acción, este Ca^{2+} se acumula. Esta cantidad de Ca^{2+} residual es muy pequeña al principio, pero conforme entra más Ca^{2+} a la neurona pondrá en marcha la liberación de más neurotransmisor, ya que este depende de la cantidad de Ca^{2+} liberado (Debanne *et al.*, 1996).

Una entrada baja de Ca^{2+} resulta en un primer potencial de acción (S1) inicial pequeño, pero la amplitud del segundo potencial (S2) será mucho más grande ya que el Ca^{2+} residual del primer estímulo se sumará al Ca^{2+} entrante del segundo estímulo, logrando una mayor liberación de neurotransmisor, a esto se le llama facilitación; pero si en el primer estímulo existe una entrada masiva de Ca^{2+} , se liberará una cantidad grande de neurotransmisor, dejando poco o casi nada que liberar cuando suceda el segundo estímulo, así la amplitud de S1 será mucho mayor que S2, esto se le llama depresión (Bargas y Galarraga, 2008; **Figura 10**).

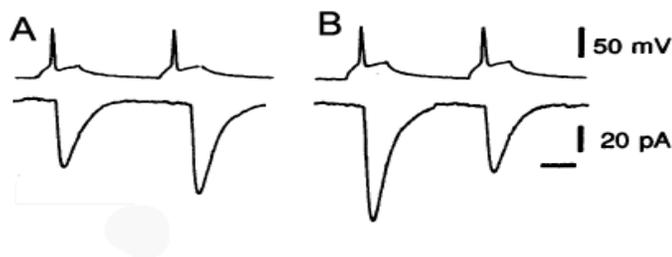


Figura 10. Facilitación y Depresión. En A se puede observar un efecto de facilitación ya que el segundo potencial es mayor que el primero, caso contrario en B donde el primer potencial es mayor que el segundo, lo que sería depresión.

El Protocolo de Pulso Pareado (PPR) nos permite saber por medio de dos estímulos sucesivos en las aferencias presinápticas si el efecto de un fármaco está en la pre- o postsinápsis. Cuando la amplitud cambia en la misma proporción en ambas respuestas S1

y S2 el efecto será post- pero si el efecto es en la presinápsis se presentará facilitación o depresión ya que cambia la proporción entre S2 y S1 (Bargas y Galarraga, 2008).

RESULTADOS

El CGA aumenta la respuesta sináptica poblacional en ratones tratados con 3-NP

Las curvas intensidad-umbral demostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.001$); los ratones tratados con CGA+3-NP y pretratamiento PreCGA-CGA+3-NP aumentaron su respuesta sináptica poblacional con respecto al tratamiento de sólo 3-NP ($P < 0.050$); de igual manera los tratamientos con solo CGA por 5 días y CGA por 10 días y control mostraron un aumento con respecto al tratamiento con 3-NP ($P < 0.050$) lo cual nos indica un comportamiento cercano al control de los diferentes tratamientos con respecto al grupo tratado de 3-NP; por otro lado no se presentaron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control, excepto el tratamiento de CGA por 5 días ($P < 0.050$) (Figura 11).

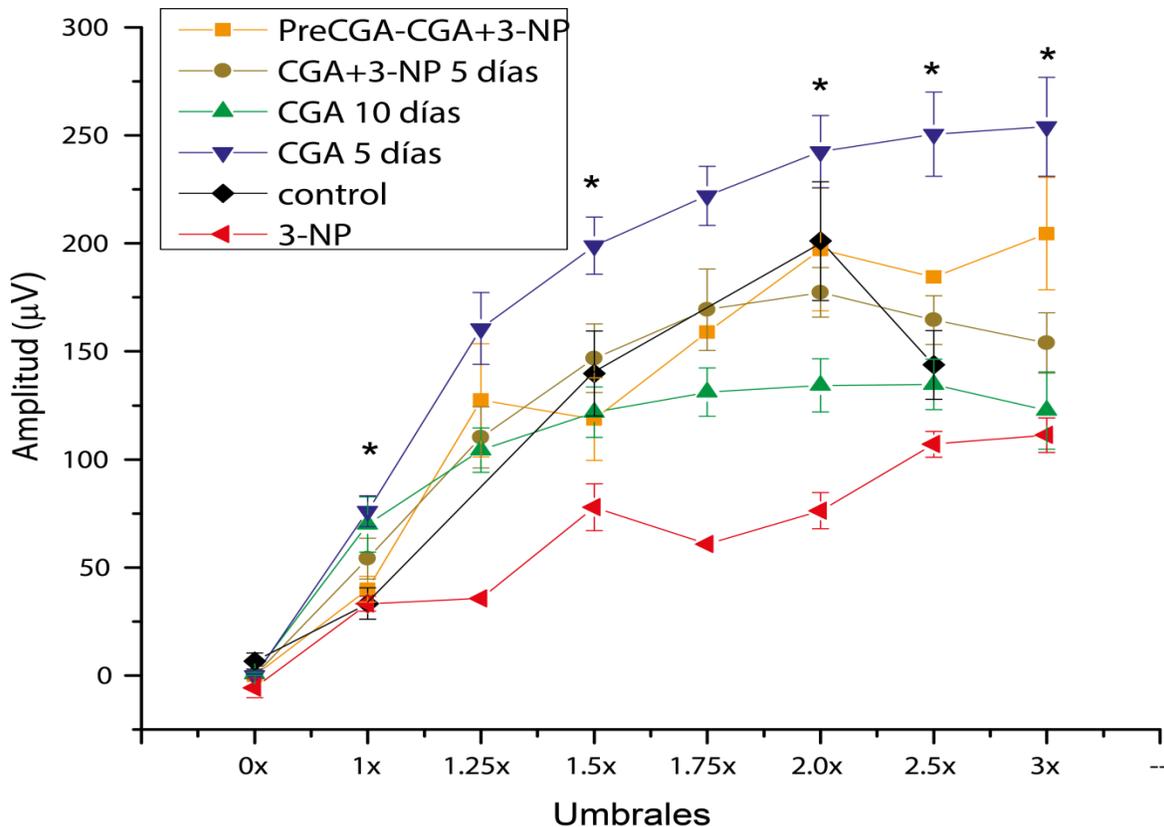


Figura 11. Curva Amplitud-Umbral. Curva hecha para demostrar las diferencias significativas de cada tratamiento, nótese que los grupos tratados (PreCGA-CGA+ 3-NP $n=9$; CGA+3-NP $n=9$; CGA 10 días $n=9$; CGA 5 días $n=9$) aumentaron su respuesta sináptica poblacional con respecto al 3-NP ($n=9$, $*P < 0.050$). Solo el grupo tratado con CGA por 5 días presento diferencias significativas con respecto al control ($n=7$, $P < 0.050$).

De manera más detallada, al analizar cada umbral de cada condición se observaron cambios significativos por parte del grupo CGA 5 días con respecto al 3-NP en los umbrales 1x, 1.25x, 2x y 3x (*P<0.050); así como diferencias con respecto al control solo en el umbral 2.5x (P<0.050) y solamente se presentó diferencia significativa con respecto al tratamiento de CGA por 10 días en el umbral 3x (##P<0.050) (Figura 12).

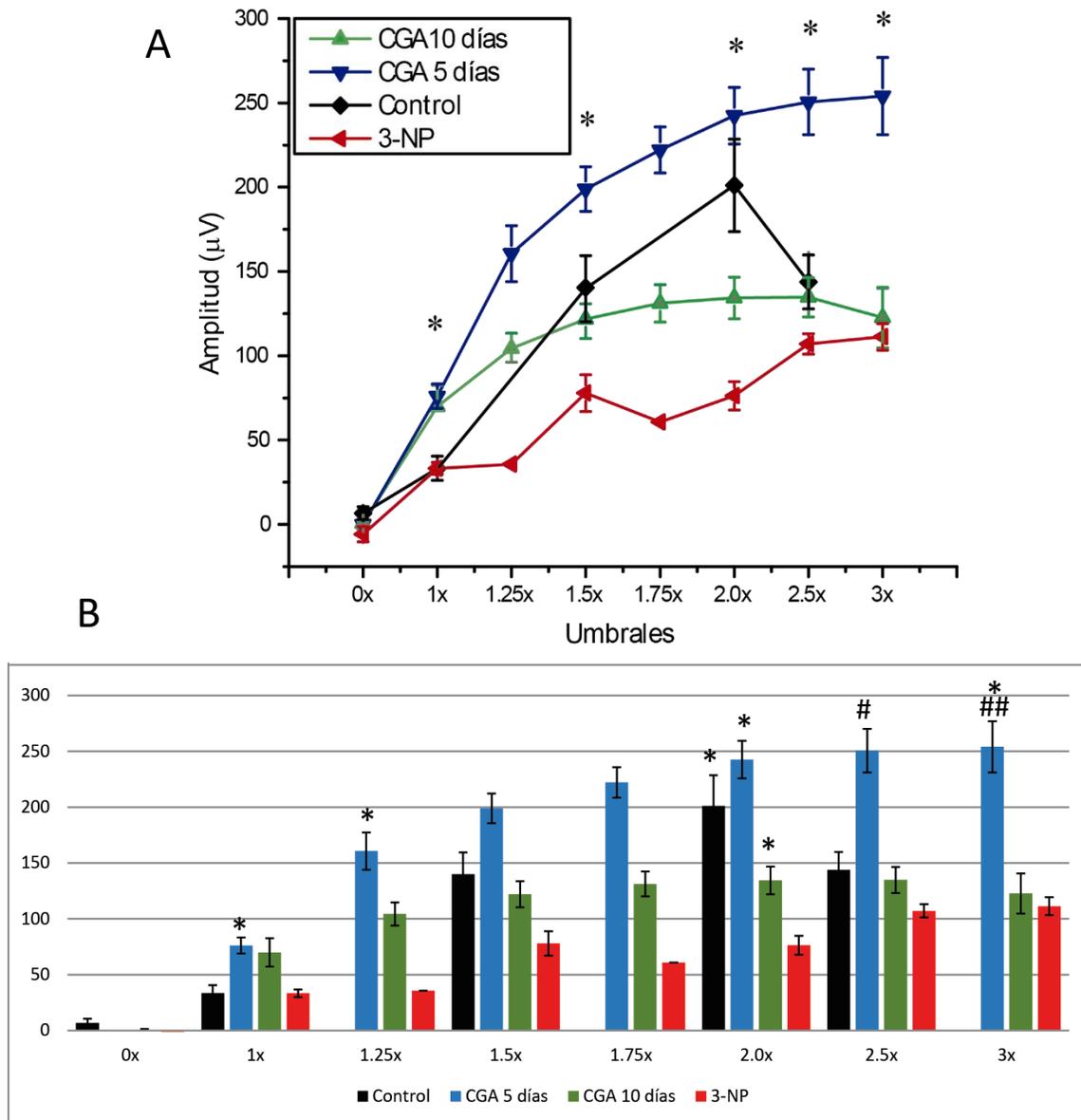


Figura 12. Curva amplitud-temporal. A) Se muestra de manera detallada los registros de los grupos tratados CGA 10 días $n=9$, CGA 5 días $n=9$, 3-NP $n=9$ y control $n=7$, la administración de CGA por 5 días presenta la mayor amplitud caso contrario el CGA 10 días que presentó menor amplitud. B) CGA 5 días (azul) presentó diferencias significativas respecto al 3-NP (rojo) en los umbrales 1x, 1.25x, 2x y 3x (*P<0.050), con respecto al control (negro) solo en el umbral 2.5x (#P<0.050); solamente se presentó diferencia significativa con respecto al tratamiento de CGA por 10 días en el umbral 3x (##P<0.050).

Por otra parte, a pesar de mostrar un aumento mucho mayor que el grupo tratado con 3-NP, los análisis estadísticos solo mostraron diferencias significativas en el umbral 2x de los tratamientos CGA+3-NP 5 días y PreCGA-CGA+3-NP con respecto al 3-NP (*P<0.050) (Figura 13).

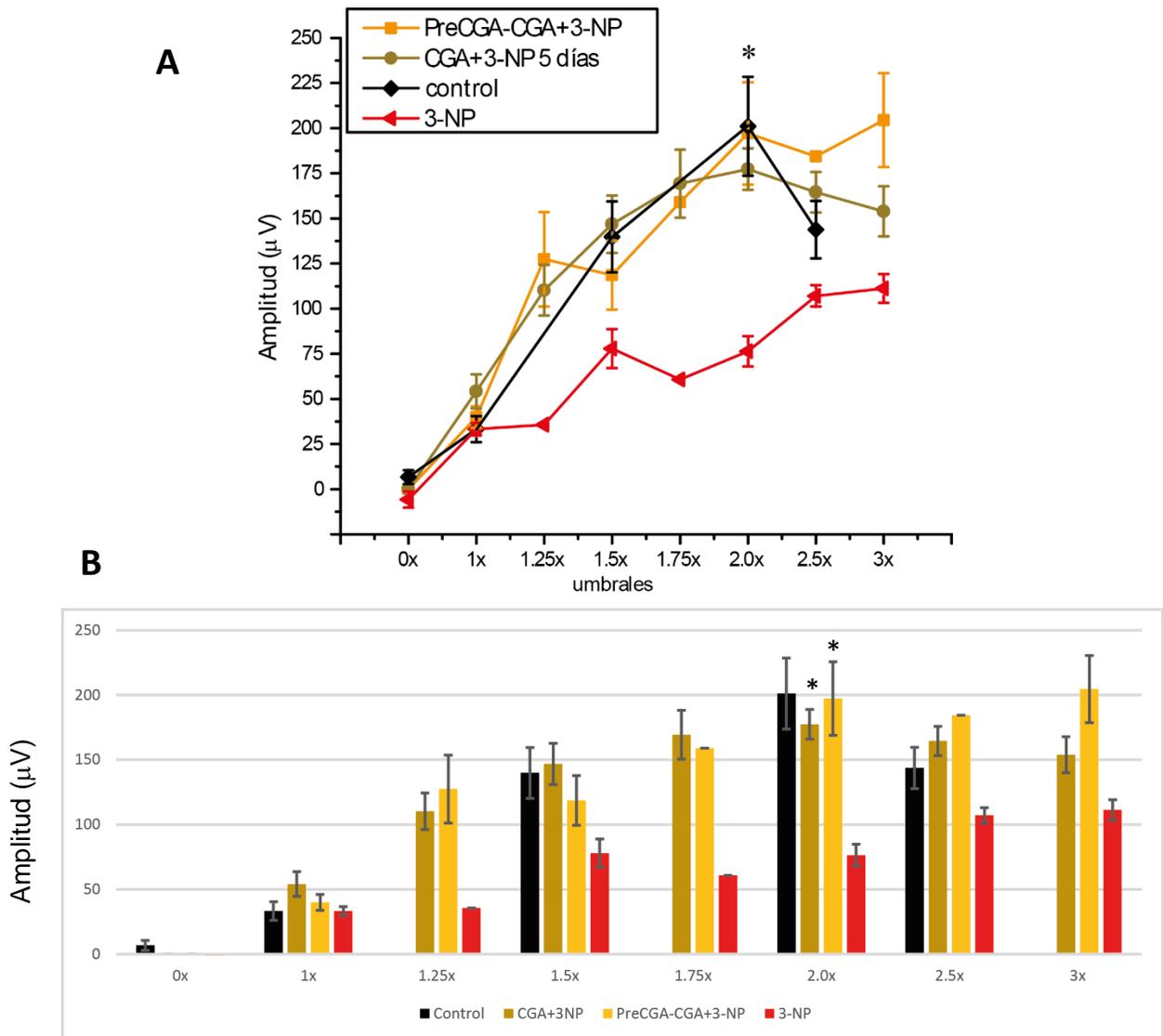


Figura 13. Curva amplitud-temporal. A) se muestran los grupos PreCGA-CGA+3-NP y CGA+3-NP tener un aumento en la amplitud con respecto al 3-NP. B) los análisis estadísticos solo mostraron diferencias significativas en el umbral 2x de los tratamientos CGA+3-NP 5 días y PreCGA-CGA+3-NP con respecto al 3-NP *P<0.050.

El CGA no afecta la estabilidad de los cursos temporales

Después de demostrar que el CGA aumenta la respuesta sináptica se realizaron controles largos para no observar perturbaciones y/o alteraciones producto del tratamiento previo, como se observa, la respuesta sináptica poblacional 2 mantiene la misma amplitud sináptica que la respuesta 1 a pesar del tiempo transcurrido ($n=6$) (Figura 14).

Una vez comprobado que el CGA no modifica la estabilidad de los cursos temporales, se grabaron 10 minutos como control y después se administró la neurotrofina BDNF.

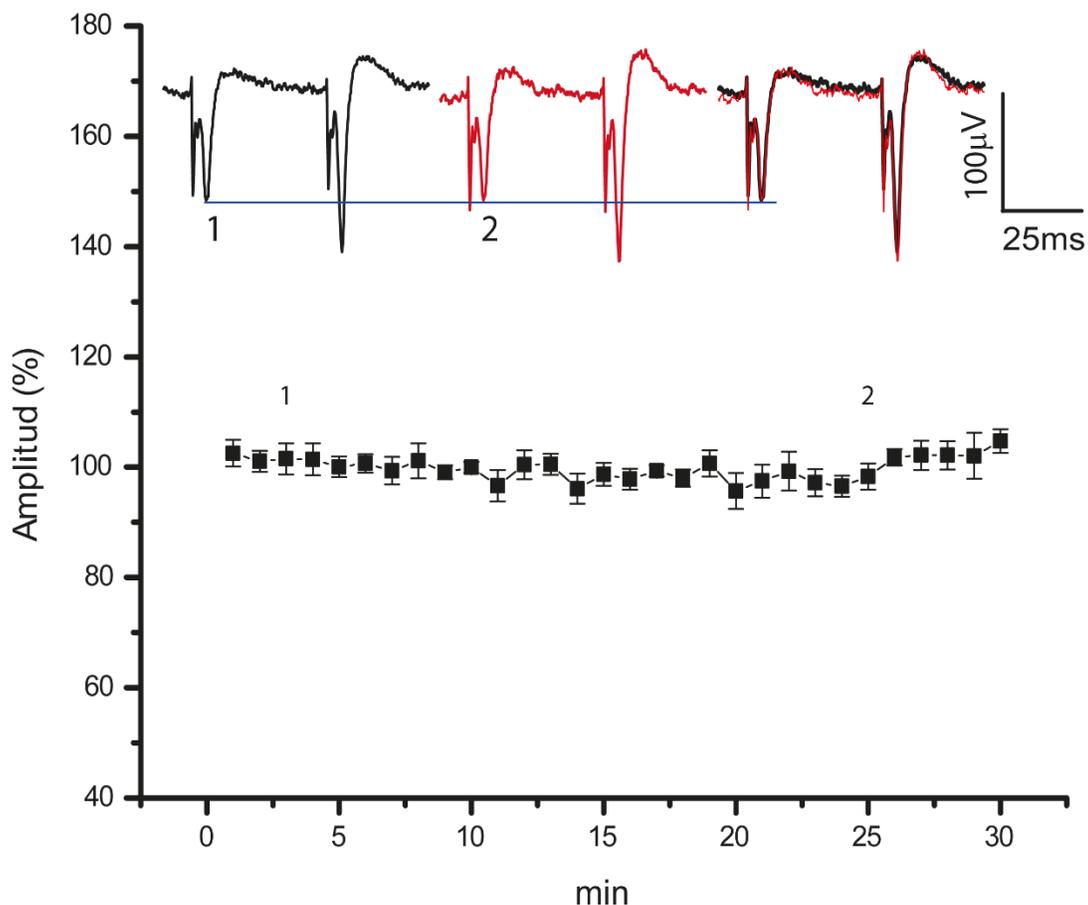


Figura 14. Curso Temporal. Se observa que las rebanadas tratadas previamente con CGA la población se mantuvo estable con el paso del tiempo los valores fueron normalizados y mostrados en porcentaje ($n=6$); en la parte de arriba se muestra un trazo representativo tomado en el principio (1) y al final (2) de experimento, nótese al comparar ambos trazos mantienen el mismo tamaño de amplitud.

La modulación del BDNF cambia en rebanadas tratadas con CGA

Al administrar 10ng/ml de BDNF después de 10 minutos de control se observaron cambios en la modulación en ambos tratamientos, se presentó un incremento el cual varió de acuerdo con el tipo de condición, en el caso del tratamiento de PreCGA-CGA+3-NP por 10 días aumentó en la espiga S1 fue de $28\% \pm 4.5$ ($n=5$; $t = -19.890$; ($P = <0.001$) prueba de t-pareada) (Figura 15).

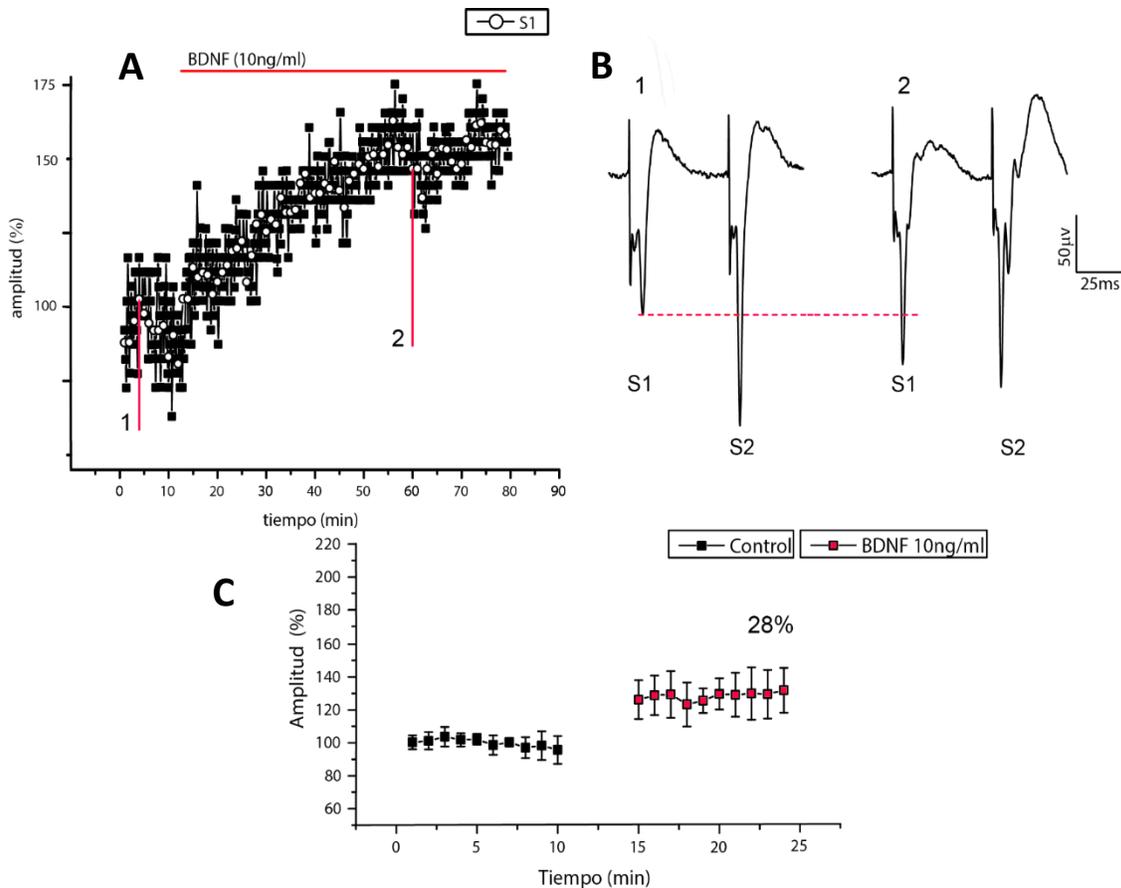


Figura 15. Modulación de BDNF en tejido pre-tratado por CGA. A) Experimento representativo que muestra el aumento de amplitud después de la administración de BDNF 10ng/ml, los valores fueron normalizados y mostrados en porcentaje. B) trazos representativos tomados al principio y al final de experimento (1 y 2) donde se muestra el aumento de la amplitud en la espiga S1. C) Promedio de los primeros diez minutos y últimos 10 minutos después de haber administrado BDNF 10ng/ml, se observa el aumento de 28% de amplitud, los valores fueron normalizados y mostrados en porcentaje ($n=5$).

Por otro lado, el efecto modulador del BDNF en rebanadas tratadas con CGA+3-NP por 5 días presentó un incremento de $47\% \pm 3\%$ ($n=4$; $t = -48.946$; ($P = <0.001$) prueba de t-pareada) (Figura 16).

Con los resultados anteriores, el BDNF, a 10ng/ml en cada condición presentó un aumento de amplitud en las espigas de tejido tratado con CGA; la variación de porcentajes entre cada condición podría ser a un efecto de acuerdo al tiempo de administración del CGA, es decir que a menor tiempo de administración mayor efecto modulador de BDNF; pero una disminución en la estabilidad de este de acuerdo a la variabilidad que presentan los datos.

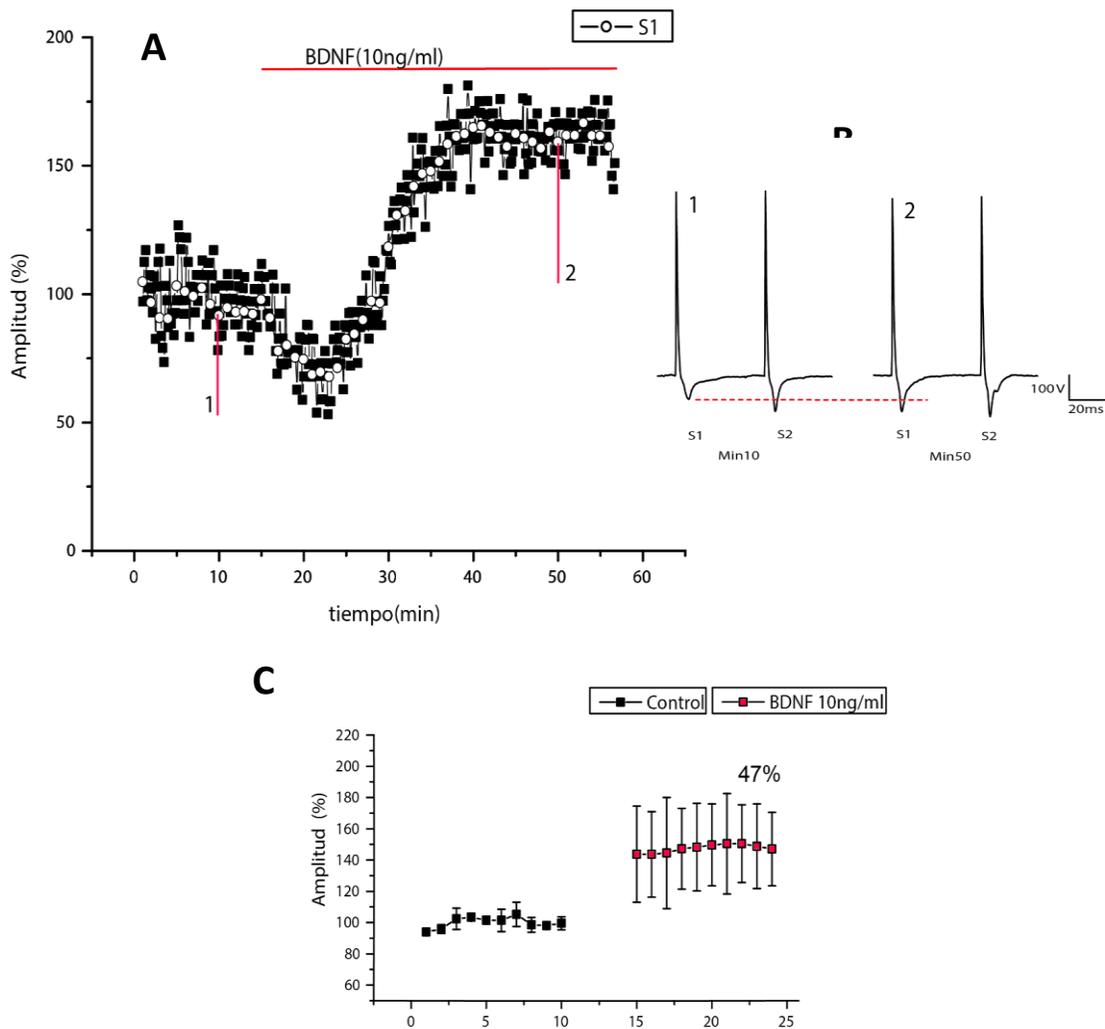


Figura 16. Modulación de BDNF en tejido tratado con CGA. A) Experimento representativo donde se muestra el aumento de la amplitud al administrarse BDNF 10ng/ml. B) Trazo representativo del experimento tomado al principio y al final del experimento (1 y 2), se observa la diferencia en el aumento de tamaño en la espiga S1. C) Promedio de los primeros diez minutos y últimos después de la administración de BDNF, se obtuvo un aumento de 47% en la amplitud, los valores fueron normalizados y mostrados en porcentaje ($n=4$).

La administración de BDNF en tejido tratado con CGA y 3-NP modifica los mecanismos presinápticos

Como ya se había mencionado en capítulos anteriores el PPR, que es el cociente de la división de S2/S1 permite saber si el efecto de un fármaco se encuentra mediado por mecanismos presinápticos o postsinápticos. En los resultados (**Figura 17**) se observa que tejido tratado bajo la primer condición CGA+3-NP 5 días tuvo cambios significativos (Control: 1.09 ± 0.021 ; BDNF: 0.865 ± 0.024 $P < 0.001$) además de disminuir el PPR en presencia de BDNF, de igual manera en la condición PreCGA-CGA+3-NP 10 días (Control: 1.001 ± 0.013 ; BDNF: 0.833 ± 0.010 , $P < 0.001$) se presentaron cambios significativos así como una disminución cuando se encontraba el BDNF en el baño. Esto quiere decir que posiblemente el efecto del BDNF en tejido tratado con CGA se encuentra relacionado a mecanismos presinápticos y la disminución en los cocientes de ambos señala una depresión sináptica.

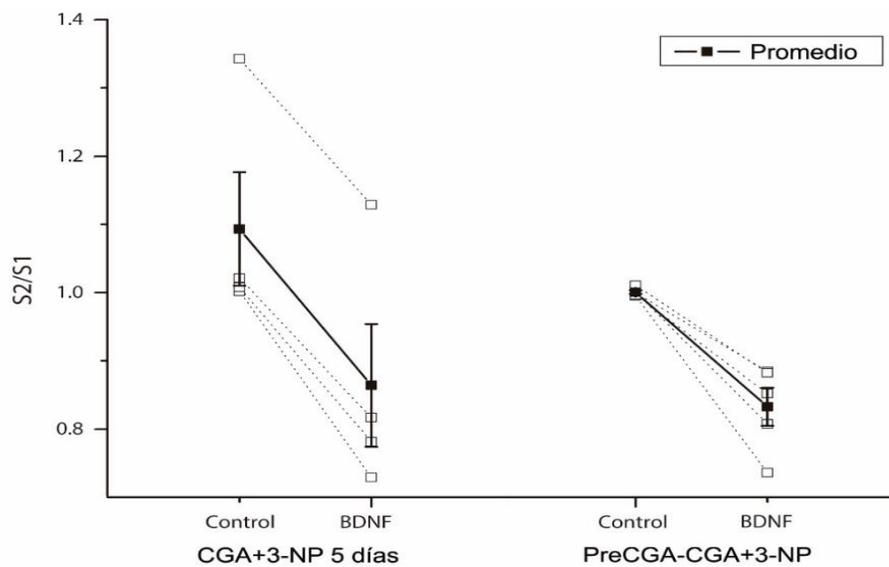


Figura 17. PPR. Sumatoria de la acción del BDNF en PPR en tejido tratado 5 días con CGA y con pretratamiento CGA, en ambas condiciones se muestra una reducción en el PPR, lo cual indica un aumento en la liberación de neurotransmisor a pesar de haber sido administradas con la toxina 3-NP.

DISCUSIÓN

El CGA como posible protector contra el 3-NP

Como ya se había mencionado, los antioxidantes han mostrado tener un papel importante en la eliminación de ROS los cuales están directamente relacionadas con el desarrollo de múltiples enfermedades neurodegenerativas, en especial HD. Los antioxidantes externos forman un soporte crucial en la protección de procesos como excitotoxicidad y estrés oxidativo (Liang Y Kitts, 2015). Trabajos como Li *et al* en 2007 demostraron que el CGA tiene efectos neuroprotectores contra apoptosis inducida por metilmercurio en células PC12. En los resultados de la **figura 11**, se observa que los tratamientos con CGA posiblemente mejoran la amplitud de la respuesta poblacional, ya que el CGA ha presentado mecanismos antioxidantes.

Actualmente se conocen varias maneras de acción de los antioxidantes, trabajos como Wright *et al.* en el 2000 describieron dos principales; el primero, conocido como transferencia átomo-H, donde el radical libre remueve un átomo H del antioxidante, convirtiéndose en Radical, así mientras más estable esté el radical antioxidante corresponderá a una mejor eficiencia antioxidante; el segundo mecanismo llamado “transferencia de un electrón” donde el antioxidante da un electrón al radical libre, convirtiéndolo en un radical catión; es por esto que en la **figura 12A**, se aprecia una mejoría de los grupos tratados por CGA con respecto al control e incluso 3-NP, ya que múltiples trabajos han demostrado la efectividad de CGA en diferentes condiciones de estrés oxidante causado por superóxido (O_2), Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2), Óxido nítrico (NO_2) e incluso Cadmio (Hao *et al.* 2015).

En el caso de los grupos administrados con 3-NP y CGA se observa de igual manera un efecto protector en trabajos como Alarcón-Herrera *et al*, en el 2017 observaron en ratones C57BL/6 que el CGA administrado en co-tratamiento con el 3-NP (15mg/kg) disminuyó la toxicidad en un 32.76% y el pretratamiento de CGA redujo casi en su totalidad todo efecto toxico por parte del 3-NP. En la **Figura 12A**, al aumentar el tiempo de administración de CGA el efecto comienza a ser adverso, en este caso podría ser pro-oxidante, lo cual acelera el daño a moléculas como DNA, carbohidratos y proteínas, además de que muchos factores afectan el tipo de oxidación, como temperatura, presión de oxígeno, catálisis de metales, consumo de grasas y forma de estas (Frankel, 1993).

Existen muchos polifenoles que al estar en contacto con sistemas que contengan metales activos-redox, en presencia de O₂, la transición de metales como Cu y Fe cataliza el ciclo redox de estos llevándolos a la formación de más ROS y otros radicales orgánicos que pueden dañar el DNA (Sakihama *et al*, 2002). Además, trabajos como Fukumoto y Mazza en el 2000, midieron tanto la actividad antioxidante y pro-oxidante de múltiples ácidos fenólicos, entre ellos el CGA, descubriendo que este no solo tenía una alta actividad antioxidante, sino también compartía un efecto pro-oxidante usando la oxidación del Cobre (Cu²⁺) con la técnica de HPLC.

Se ha reportado que en el mecanismo de oxidación del CGA se forman O-Quinonas (CGA-Q), las cuales están involucradas en el desarrollo de toxicidad (Pierpoint en 1966). Aún se desconoce cuál es la cantidad exacta para tener un efecto benéfico antioxidante y qué dosis refleja el límite apropiado de uso; por ejemplo Muñoz *et al.* en 2007, realizaron pruebas cinéticas con periodidato de sodio en la oxidación del CGA, descubriendo que a diferentes concentraciones de CGA existe una constante evolución y formación de CGA-Q la cual produce H₂O₂ y CGA, además de que al aumentar las concentraciones de CGA, la CGA-Q incrementa, sugiriendo que la quinona reacciona con su sustrato. Esto podría explicar por qué a concentraciones altas, además de una administración larga de 10 días se desarrollaría un efecto mayor como pro-oxidante en lugar del esperado.

En la **figura 12B**, se observa que a pesar de aumentar el estímulo, la amplitud no crece en tejido tratado con 3-NP que con el tejido control y CGA; esto es debido al daño ocasionado por el bloqueo de la succinato deshidrogenasa en el complejo mitocondrial II de la cadena respiratoria, además se ha comprobado que la administración crónica de 3-NP aún en bajas concentraciones (15mg/kg) ocasiona alteraciones metabólicas así como eleva los niveles de Óxido nítrico (NO) y de la peroxidación lipídica (LPO) (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011).

La administración de CGA disminuye el daño causado por 3-NP.

Al administrar CGA en conjunto con 3-NP se observó que la amplitud de la respuesta poblacional estuvo por encima del grupo tratado con 3-NP y a mismos niveles que del control **Figura 13A**. El alto efecto protector del CGA esta mediado por la cantidad de grupos Hidroxil, así componentes con al menos tres grupos hidroxil en el anillo fenol tienen alta actividad antioxidante (Fukomoto y Mazza, 2000), lo cual se ve evidenciado. Aunque sigue

existiendo gran duda de cómo actúan los antioxidantes, en el caso del CGA también se ha descubierto que su efecto también podría estar mediado por metabolitos.

El ácido cafeico y el ácido Quinóico son los principales productos directos de la hidrólisis del CGA por microbiota en el intestino delgado y colon (Gonthier M *et al.*, 2003; Tomas-Barberan *et al.*, 2013), existe una posibilidad de que el efecto protector del CGA esté ligado al efecto protector de sus metabolitos. Taram *et al.* en 2016, compararon el efecto protector del CGA con sus respectivos metabolitos (Ácido cafeico, Ácido Quinoico y, el Ácido Felúrico) en cultivos de neuronas granulares de cerebelo bajo diferentes condiciones de estrés como óxido nítrico, glutamato, H₂O₂, inhibición de proteasoma e inhibición de retículo endoplasmático de Golgi. Descubriendo que el Ácido Cafeico presentó la mejor actividad como antioxidante en las diferentes condiciones, por otra parte, el CGA mostró una actividad antioxidante media pero una mayor afinidad al estrés por NO. Esto es favorable ya que la administración de 3-NP incrementa estos niveles, debido a que funciona como un donador de su grupo nitro, la oxidación de 3-NP forma 3-nitroacrilato, el cual se une de manera irreversible a la Succinato deshidrogenasa (SDH), incrementando la producción de radicales libres dentro de la mitocondria (Nishino *et al.*, 1995; Deshpande *et al.*, 2006). Es muy probable que el CGA presente un mejor efecto antioxidante en los experimentos administrados con 3-NP, por mostrar un mayor efecto protector contra estrés nítrico.

La estabilidad curso temporal no se ve afectada por la administración de CGA

Una vez terminadas las pruebas de curva I/A se prosiguió con experimentos curso/temporales de una duración aproximada de 30min (n=7; **figura 14**), los cuales permiten observar que el tejido tratado con CGA presenta estabilidad al paso del tiempo y que cualquier cambio en la amplitud de las espigas es efecto de la neurotrofina administrada, en este caso BDNF.

Modulación del BDNF en tejido tratado con CGA y 3-NP

Varios estudios han demostrado que el BDNF facilita la supervivencia neuronal, el crecimiento axonal y dendrítico además de mejorar la formación sináptica. Una vez que se comprobó que el tejido tratado con CGA y 3-NP mantiene una estabilidad de las espigas, resulta importante saber cómo modularían en condiciones de estrés oxidante posterior a un tratamiento antioxidante por lo cual se procedió a administrar BDNF al tejido tratado PreCGA-CGA+3-NP por 10 días y CGA+3-NP 5 días, el aumento en la espiga S1 de ambos

tratamientos fue de $28\% \pm 4.5$ ($n=5$; $t = -19.890$; ($P = <0.001$) prueba de t-pareada; **figura 15**) y $47\% \pm 3\%$ ($n=4$; $t = -48.946$; ($P = <0.001$) prueba de t-pareada; **figura 16**) respectivamente, mostrando un mayor aumento en la amplitud sináptica en comparación con la mostrada en el trabajo de Mendoza *et al*, 2014, donde administraron BDNF 10ng/ml en tejido de ratón C57BL/6 únicamente tratado con 3-NP (15mg/kg), obteniendo una amplitud de $23\% \pm 4$, además, el tratamiento de bajas dosis de 3-NP mostró afectaciones en el largo dendrítico y en el número de espinas en las neuronas espinosas medianas del estriado.

En los análisis de PPR (**Figura 17**), a pesar de que el tejido fue tratado con 3-NP no se presentó un incremento como se ha observado en tejido tratado con este mismo (Mendoza *et al*, 2014), en los tejidos tratados con CGA se presentaría protección en las diferentes neuronas del estriado, es probable que la disminución y el daño específico en el estriado por el 3-NP causaría una reducción en los receptores TrkB ya que se encuentran distribuidos uniformemente en la superficie celular tanto en neuronas de proyección estriatal como en neuronas del estriado y, aunque todas las neuronas corticales expresan los receptores TrkB la mayor expresión es en interneuronas GABAérgicas (Alberch *et al.*, 2004), por lo tanto la expresión de los receptores TrkB se vería afectada como lo muestra Mendoza *et al.*, 2014, donde observaron una reducción en la expresión de estos receptores, así al haber menos receptores para el BDNF, la modulación sería menor, además que la liberación de neurotransmisores aumenta para compensar el daño en las conexiones sinápticas.

Aunque los mecanismos de acción del CGA aún siguen sin ser claros, su efecto podría deberse a diferentes vías de señalización activadas por el CGA, para proteger a las neuronas; una vía que han ganado mucha importancia son la de PI3K/Akt ya que juega un rol importante en el manejo de la defensa celular contra daño oxidativo, regula la supervivencia de la proliferación celular y se encuentra asociada con la activación del Nrf2.

El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica de DNA conocida como ARE (por sus siglas en inglés Antioxidant Response Element), su translocación ha demostrado aumentar la expresión de genes antioxidantes como la Glutathion S-transferasa, NADPH, ligasa glutamato-cisteína, ferritina, gamma-glutamil-cisteína sintetasa y Heme oxigenasa 1 (HO-1), teniendo un papel importante en la defensa celular contra el estrés celular, enfermedades inflamatorias como la osteoporosis (Nguyen

et al., 2009; Scapagnini *et al.*, 2011), puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza muy diversa como son los polifenoles (Fainstein, 2007).

Estudios como Han *et al.*, 2017 demostraron que el CGA activa la modulación de Nrf2 a través de la vía de PI3K/Akt en células MC3T3-E1 reduciendo la muerte celular por H₂O₂, sin embargo, usando un inhibidor específico de PI3K/Akt suprimieron de manera significativa la localización nuclear de Nrf2, inhibida esta vía, parcialmente se revirtió el incremento de la viabilidad celular, indicando que juega un papel importante en los mecanismos del CGA en la activación de Nrf2. Además, el trabajo de Calkins *et al.*, en el 2005, demostró que *in vivo* e *in vitro*, el Nrf2 tiene un efecto protector contra la inhibición del complejo II en modelos de 3-NP y malonato; cuando los ratones fueron deficientes de Nrf2 y Knockout resultaron ser significativamente más vulnerables. Con base en lo anterior, es posible que el aumento de la modulación sináptica por el BDNF se deba a que las células neuronales se encuentren en mejor condición con respecto a las tratadas con 3-NP debido a la protección del CGA, por medio de la activación del factor Nrf2 vía PI3K/Akt

CONCLUSIONES

El CGA presentó un efecto protector en tejido tratado por 3-NP, la curva I/A mostró que el tejido tratado solamente con CGA 5 días tuvo la mayor amplitud, al igual el tratamiento PreCGA-CGA+3-NP 10 días, el efecto protector podría ser mediante donación de electrones; que disminuiría la cantidad de ERO generadas por 3-NP.

La mayor modulación fue de 47% con el tratamiento CGA+3-NP 5 días; aunque el otro tratamiento PreCGA-CGA+3-NP 10 días no tuvo la misma amplitud 28%, a la amplitud fue mayor en comparación de grupos tratados solo con 3-NP

El CGA se presenta como un fuerte antioxidante en el tratamiento y posible prevención de enfermedades neurodegenerativas, los mecanismos del CGA aún siguen siendo desconocidos en su totalidad, se recomienda para estudios posteriores analizar detalladamente las vías de señalización activadas por CGA en presencia de 3-NP, así como los posibles metabolitos que podrían tener una mayor participación en la neuroprotección.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón-Herrera N, Flores-Maya S, García-Bores A, Mendoza E, Avila-Acevedo G, Hernandez-Echeagaray E. 2017. Protective Effects of Chlorogenic Acid in 3-Nitropropionic Acid Induced Toxicity and Genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 109:1018-1025.

Alberch J, Perez-Navarro E, Canals J. M. 2004. Nuerotrophic Factors in Huntington's Disease. *NGF and Related Molecules in Health and Disease*. 197-229

Angelucci F, Brene S, Mathe AA. 2005. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol. Psychiatry* 10(4):345–352.

Ashu J. y Beal F M. 2012. Antioxidants in Huntington's Disease. *Biochim Biophys Acta*. 1822(5):664-674.

Bargas J. y Galarraga E. 2008. Transmisión Sináptica En: Biología Funcional de los animales V.2 Siglo XX1; 2ed. México. 86-139

Boyer J, Liu R H, 2004. Apple Phytochemicals and their Health Benefits. *Nutr. J.* 3:5.

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum David. 2005. 3-Nitropropionic acid: a Mitochondrial Toxin to Uncover Physiopathological Mechanisms Underlying Striatal Degeneration in Huntington's Disease. *Journal of Neurochemistry*. 95:1521-1540.

Calkins J. M, Jakel J. R, Johnson A. D, Chan K, Kan W. Y, Johnson A. J, 2005. Protection from Mitochondria Complex II Inhibition *in vitro* and *in vivo* by Nrf2-mediated Transcription. *PNAS*. (102)1:244-249.

Castillo-Padilla V D, Rivas-Arancibia S. 2011. Interacción entre Factores Neurotróficos y Especies Reactivas de Oxígeno en los Mecanismos de Muerte y Proliferación Celular. *Arch Neurocién (Mex)*. 16(1):26-32.

Cepeda C, Wu N, André M V, Cummings M D, Levine S M. 2006. The Corticostriatal Pathway in Huntington's Disease. *Progress in Neurobiology*. 81:253-271.

Debanne D, Guérineau C N, Gähwiler H B, Thompson M S. 1996. Paired-Pulse Facilitation and Depression at Unitary Synapses in Rat Hippocampus: Quantal Fluctuation Affects Subsequent Release., *Journal of Physiology*. 491(1):163-176.

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

Fainstein Königsber Mina. 2007. Nrf2: La Historia de un Nuevo Factor de Transcripción que Responde a Estrés Oxidativo. *REB*. 26(1): 18-25.

Ferrer I. et al. 2000. Brain-derived Neurotrophic Factor in Huntington Disease. *Brain Res*. 866: 257–261.

Frankel E N. 1993. In Search of Better Method to Evaluate Natural Antioxidants and Oxidative Stability in Food Lipids. *Trends Food Sci. Technol*. 4:220-225.

Fukumoto L R, Mazza G. 200. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem*. 48:3597-3604.

Gil M. J, Rego C. A., 2008., Mechanisms of Neurodegeneration in Huntington's Disease., *European Journal of Neuroscience*., 27:2803-2820.

Gonthier M P, Verny M A, Besson C, Rémésy C, Scalbert A. 2003. Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on its Metabolites by the Gut Microflora in Rats. *J. Nutr*. 133:1853-1859.

Halliwell B. 1990. How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Rad. Res*. 9(1):1-32.

Han D, Chen W, Gu Xiaolong, Shan R, Zou J, Liu G, Han B. 2017. Cytoprotective Effect of Chlorogenic Acid Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in MC3T3-E1 Cells Through PI3K/Akt-Mediated Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Oncotarget*. 8(9): 14680-14692.

Hao, M. L., Pan, N., Zhang, Q. H., & Wang, X. H. 2015. Therapeutic efficacy of chlorogenic acid on cadmium-induced oxidative neuropathy in a murine model. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(5), 1887–1894.

Hernandez-Echeagaray E. 2004. Avances sobre la Neurobiología de la Enfermedad de Huntington. *Temas selectos de Neurociencias III*. 33-41.

Hernandez-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*. 32:241-254.

Katz B, Miledi R. 1968. The Role of Calcium in Neuromuscular Facilitation., *The Journal of Physiology*., 195(2):481-492. Kandel E. R., Jessell M. T., Schwartz H J., 1998., *Neurociencia y Conducta*., España Prentice Hall.

Koríem M. M K y Soliman E. R., 2014., Chlorogenic and Caftaric acid in liver toxicity and oxidative stress induced by methamphetamine., *Journal of Toxicology.*, 2014:1-10.

Kwon S. –H, Lee H. –K, Kim J. –A, Hong S. –I, Kim H. –C, Jo T. –H,... Jang C. –G., 2010., Neuroprotective Effects of Chlorogenic Acid on Scopolamine-Induce Amnesia Via Anti-Acetylcholinesterase and Anti-Oxidative Activities in Mice., *European Journal of Pharmacology.*, 649(2010):210-217.

Lewin R. G., Carter D. B., 2014., Neurotrophic Factors, *Handbook of experimental pharmacology.*, Ed Springer., vol 220., 520pag.

Li Y, Shi W, Li Y, Zhou Y, Hu X, Song C,... Li Y., 2007., Neuroprotective Effects of Chlorogenic Acid Against Apoptosis of PC12 Cells Induced by Methylmercury., *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, 26(2008):13-21.

Liang N. Y Kitts D. D., 2015., Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions., *Nutrients.*, 2016, 8,16., 1-20.

Liot G., Bossy B., Lubitz S., Kushnareva Y., Sejbuk N., Bossy-Wetzel E., 2009., Complex II Inhibition by 3-NP Causes Mitochondrial Fragmentation and Neuronal Cell Death Via an NMDA- and ROS-dependent pathway., *Cell death and differentiaton.*, 16, 899-909.

Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M., 2004., Antioxidant Properties of Phenolic Compunds: H-Atom Versus Electron Transfer Mechanism., *J. Phys. Chem.*, 108., 4916-4922.

Kawaguchi Y, Aosaki T, Kubota Y., 1997., Cholinergic and GABAergic Interneurons in the Striatum., *Nihon Shingeki Seishin Yakurigaku Zasshi.*, 17(2):87-90.

Manzanero P. A. L. y Ángel Á. M., 2016., *La Memoria Humana.*, Ed. Pirámide., 304pag.

McCollum H. M, Leon T. R, Rush B. D, Gutthrie M. K, Wei J., 2013., Striatal Oligodendroglionogenesis and Neuroblast Recruitment are Increased in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease., *Brain Res.*, 1518:91-103.

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 Funtion and the Modulatory Effects of Neurotrophins., *Neuroscience.*, 280(2014):156-170.

Muñoz J, García-Molina F, Varón R, Rodríguez-López J N, García-Ruiz P A, García-Cánovas F, Tudela J. 2007. Kinetic Characterization of the Oxidation of Chlorogenic Acid

by Polyphenol Oxidase and Peroxidase. Characteristics of the *o*-Quinone. *J. Agric. Food Chem.* 55. 920-928.

Moosavi F., Hosseini R., Saso L., Firuzi O. 2016. Modulation of Neurotrophic Signaling Pathways by Polyphenols. *Drug Desing, Development and Therapy.* 10:23-42.

Nelson B. A. y Kreitzer C. A., 2014., Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction., *Annu Rev Neurosci.*, 2014(37):117-135.

Nguyen T, Nioi P, Pickett C. B. 2009 The Nrf2-antioxidante Response Element Singlaing Pathway and its Activation by Oxidative Stress. *J Biol Chem.* 284: 13291-13295.

Nieuwenhuys R, Voogd J, Huijzen V C., 2009., El Sistema Nervioso Central Humano., Ed. Medica Panamericana., 4ta edición.

Nishino H, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Kumazaki M, Fukuda A. 1996. 3-Nitropropionic Acid Produces Striatum Selective Lesions Accompanied by iNOS Expression. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 10:209-212

Pierpoint S W. 1966. The Enzymic Oxidation of Chlorogenic Acid and some Reactions of the Quinone Produced. *Biochem. J.* 98:567-580.

Pramanik S, Sulistio Y. A, Heese Klaus., 2016., Neurotrophin Signaling and Stem Cells— Implications for Neurodegenerative Disease and Stem Cell Therapy., *mol Neurobiol.*, 1-59.

Purves D, Augustine G. J, Fitzpatrick D, Hall C. D, Lamantia S. A, Mcnamara O. J, Williams M. S., 2008., Neurociencia., Ed. Médica Panamericana., 3ra edición.

Quiroz-Gutiérrez F et al., 2006., Tratado de Anatomía Humana Tomo II., Ed. Porrua., 14 Edición.

Sakihama Y, Cohen M. F, Grace C. S, Yamasaki H. Plan Phenolic Antioxidant and Prooxidant Activities: Phenolics-Induced Oxidative Damage Mediated by Metals in Plants. *Toxicology* 177(2002):67-80.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa Toshimitsu, Ogura J, Kobayashi Masaki, Hirano T., 2011., *In vitro* and *In vivo* Antioxidant Properties of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid., *International Journal of Pharmaceutics.*, 403(1):136-138.

Scapagnini G, Sonya V, Nader G. A, Calogero Caruso, Zella D, Fabio G. 2011. Modulation of Nrf2/ARE Pathway by Food Polyphenols: A Nutritional Neuroprotective Strategy for Cognitive and Neurodegenerative Disorders. *Mol Neurobiol*, 44:192-201.

Serrano-Sánchez T, Blanco-Lezcano L, García-Minet R, Alberti-Amador E, Díaz-Armesto I, Pavón-Fuente N,... Francis-Turner L., 2011., Enfermedad De Huntington: Modelos Experimentales Y Perspectivas Terapéuticas., *Acta Biológica Colombiana.*, 21-41.

Shepherd G. M., 2004., The Synaptic Organization of the Brain., New York: Oxford University Press. 5th Edition.

Sigma-Aldrich. Consultado 20-09-2017 en:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c3878?lang=es®ion=MX>

Silverthorn U. D., 2008., Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado., ed. Médica Panamericana., 4^a edición., 860pag.

Skaper D. S., 2008., The Biology of Neurotrophins, Signalling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors., *CNS & Neurological Disorders.*, 7:46-42

Snell S. R., 2007., Neuroanatomía Clínica., Ed. Panamericana., 6ta edición., 592pag.

Stansfield H. K, Bichell J. T, Bowman B. A, Guilarte R. T., 2014., BDNF and Huntingtin Protein Modifications by Manganese: Implications for Striatal Medium Spini Neuron Pathology in Manganese Neurotoxicity., *J Neurochem.*, 131(5):655-666

Sung H. C., Hwang H. J., M H (2001). Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *J. Agric. Food Chem.*, 49:4646–4655.

Taleisnik S., 2006., Receptores Celulares y la Transducción de Señales. Temas de Biología Celular., Encuentro Grupo Editor., 272pag.

Taram F, Winter A. N, Linseman D. A, 2016, Neuroprotection Comparison of Chlorogenic Acid and its Metabolites Against Mechanistically Distinct Cell Death-Inducing Agents in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *Brain Research* 148:69-80.

Tomas-Barberan F, García-Villalba R, Quartieri A, Raimondi S, Amaretti A, Leonardi A, Maddalena R. 2014. In Vitro Transformation of Chlorogenic Acid by Human Gut Microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* 58:1122-1131.

Upadhyay R. y Moha-Rao J. L., 2013., An outlook on Chlorogenic acid –Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 53:9, 968-984