



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**La Neurotrofina-3 y la plasticidad estriatal  
en un modelo de neurodegeneración**

**TESIS**

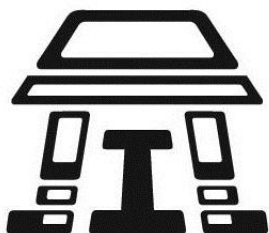
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**VICTOR GILBERTO GOMEZ PINEDA**

**Directora de Tesis: Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México 2015.**



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.

## INDICE

Agradecimientos

Dedicatorias

1. Resumen
2. Introducción
  - 2.1 Sistema Nervioso
  - 2.2 Ganglios Basales
    - 2.2.1 Estriado
  - 2.3 Transmisión Sináptica
    - 2.3.1 Modulación
    - 2.3.2 Plasticidad Sináptica
  - 2.4 Factores Neurotróficos
    - 2.4.1 Neurotrofinas y Receptores Trk
    - 2.4.2 Señalización por Ras/EPK
    - 2.4.3 Señalización por PI3K
    - 2.4.4 Señalización por PLC- $\gamma$ 1
    - 2.4.5 Receptor p75<sup>NTR</sup>
    - 2.4.6 Neurotrofina-3
  - 2.5 Modelo de Neurodegeneración
    - 2.5.1 Enfermedad de Huntington
    - 2.5.2 Patología
    - 2.5.3 Modelo de 3-NP
    - 2.5.4 Daños en la Transmisión Sináptica

- 3. Justificación**
- 4. Hipótesis**
- 5. Objetivos**
- 6. Metodología**
  - 6.1 Registro electrofisiológicos**
  - 6.2 Protocolo de Pulso Pareado**
- 7. Resultados**
  - 7.1 Modulación de la Sinapsis Glutamatérgica por Acción de la Neurotrofina -3 en estriado**
  - 7.2 Generación de la plasticidad sináptica en condiciones control y en presencia de la neurotrofina-3**
  - 7.3 Plasticidad sináptica en un modelo de neurodegeneración y el efecto de la neurotrofina-3**
- 8. Discusión**
  - 8.1 PI3K e IP3 posibles vías en la modulación sináptica de NT-3**
  - 8.2 Endocannabinoides y su papel en la LTD en presencia de NT-3**
  - 8.3 LTP en 3-NP y el efecto de la NT-3 en ella**
- 9. Conclusiones**
- 10. Bibliografía**

## **Agradecimientos**

A LA DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY POR LA CONFIANZA DEPOSITADA EN MÍ AL ACEPTAR SER MI TUTORA, SUS CONSEJOS, SUS PLÁTICAS, SU AMISTAD Y SOBRE TODO PERMITIRME ENTRAR A SU LABORATORIO DONDE PUDE ENCONTRAR UNA NUEVA FAMILIA.

AL M. EN C. ERNESTO MENDOZA DUARTE POR LA AYUDA TÉCNICA BRINDADA EN TODO MOMENTO, SU ATENCIÓN, CONSEJOS Y SU AMISTAD.

A LA M. EN C. ELIZABETH NIETO MENDOZA POR SU AYUDA, ASESORÍA, CONSEJOS Y POR SER UNA GRAN PERSONA AL BRINDARME SU AMISTAD.

## Dedicatorias

A MIS PADRES QUE HAN DADO TODO POR MÍ Y MIS HERMANOS SIN PENSARLO Y NOS HAN ANIMADO A CUMPLIR  
NUESTROS SUEÑOS.

A MIS HERMANOS MARIO Y BRENDA QUE HAN SIDO MIS PRIMEROS AMIGOS Y MI INSPIRACIÓN LES DEDICO MIS  
LOGROS.

A MIS ABUELOS POR SUS BENDICIONES Y SUS CONSEJOS, SUS EXPERIENCIAS Y SUS BENDICIONES.

A TODOS MIS TÍOS POR EL APOYO Y CONSEJOS A LO LARGO DE LA VIDA.

A LOS AMIGOS QUE CONOCÍ A LO LARGO DE LA CARRERA, LA MEJOR ETAPA DE MI VIDA Y CON LOS CUALES CRECÍ  
COMO PERSONA Y SE CONVIRTIERON EN AMIGOS DE POR VIDA GRACIAS SILVIA, TOÑO, MAYRA, KATIA,  
DÓNOVAN, ABRAHAM, LUCERO Y DEMÁS AMIGOS.

A LAS PERSONAS QUE CONOCÍ EN EL LABORATORIO QUE SE CONVIRTIERON EN GRANDES AMIGOS, LIZ,  
EDMUNDO, RAFA, CESAR, REBECA, MATT, NETO, BELÉN Y JORGE

HAY MUCHAS MÁS PERSONAS A LAS QUE AGRADECER QUE PARA BIEN O PARA MAL FORMARON PARTE DE MI  
FORMACIÓN PERO POR ESPACIO O A FALTA DE UNA BUENA MEMORIA NO PUEDO INCLUIR INDIVIDUALMENTE A  
TODOS ELLOS GRACIAS.

NO CONOZCO A LA MITAD DE USTEDES, NI LA MITAD DE LO QUE QUERRÍA, Y LO QUE YO QUERRÍA ES MENOS DE  
LA MITAD DE LO QUE LA MITAD DE USTEDES SE MERECE.

## Resumen

En este trabajo se analizó el efecto de la Neurotrofina-3 en la plasticidad estriatal en condiciones control y en un modelo de la enfermedad de Huntington, esta enfermedad neurodegenerativa afecta el estriado, mediante procesos apoptóticos y fallos mitocondriales, llevando al estriado a una reducción de tamaño y una desconexión de corteza provocando movimientos coreicos. Para lograr esto se usa la toxina mitocondrial 3-NP que provoca daños similares. La plasticidad sináptica ya sea a largo o a corto plazo se ha encontrado relacionada con procesos de aprendizaje y memoria, en el estriado son de suma importancia para una sincronización de las vías que lo componen es por esto de la importancia de este proceso en este núcleo nervioso que es el encargado de preparar los movimientos.

Por otra parte la Neurotrofina-3 perteneciente a las familias de las neurotrofinas se ha encontrado en este ganglio a lo largo del desarrollo además de que en otras estructuras muestra poder modular la respuesta sináptica y en algunos casos reparar sinapsis dañadas en medula. Es así como nosotros encontramos que esta neurotrofina puede modular y modificar la plasticidad en ratones ya sea tratados con 3-NP o en condiciones control.

## Introducción

### Sistema nervioso

El sistema nervioso tiene dos componentes; el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está compuesto por el cerebro (hemisferios, diencefalos, cerebelo y el tronco cerebral) y la medula espinal. El SNP que incluye las neuronas sensoriales y la parte motora que consiste en dos componentes; los axones motores que inervan a músculos esqueléticos llamado sistema somático y aquellos que inervan músculos liso, cardiaco y glándulas se llama autónomo.

El sistema nervioso también se puede dividir, por su función general en sistema sensorial que se encarga de adquirir y procesar información del ambiente y sistema motor que responde a tal información generando movimientos y otros comportamientos.

Las células en el sistema nervioso central (SNC) están arregladas en dos formas diferentes, Núcleos y Circuitos Neuronales. Las neuronas nunca funcionan aisladas, ellas están organizadas en ensambles llamados circuitos neuronales que procesan diferentes tipos de información. Aunque el arreglo de los circuitos neurales varía de acuerdo a la función que sirve. Los núcleos son acumulaciones locales de neuronas que tienen conexiones y funciones similares; estas agrupaciones son encontradas a través del cerebelo, tallo cerebral y el cordón nervioso.

Cuando son considerados juntos, los diferentes circuitos que procesan tipos de información similar forman sistemas neurales.

Las células nerviosas que llevan información de la periferia hacia el cerebro o al cordón nervioso son llamadas neuronas aferentes mientras que las células nerviosas que llevan información del cerebro a un circuito en específico son llamadas neuronas eferentes. Mientras que las neuronas que solo participan en aspectos locales de un circuito son llamadas interneuronas. Estos tres tipos de neurona son los componentes básicos de un circuito neuronal.



Los circuitos neurales responsables del control del movimiento pueden ser divididos en cuatro subsistemas, cada cual con una contribución única al control motor.

El primero de estos es la médula espinal y el tallo cerebral. Esto incluye las neuronas inferiores de la médula espinal y los circuitos locales. Todos los comandos de movimiento, ya sea voluntario o reflejo, son transmitidos a los músculos por la activación de estas neuronas inferiores.

El segundo subsistema motor consiste en las neuronas superiores que se encuentran en el tallo cerebral o corteza cerebral y tienen sinapsis con las neuronas inferiores. Estas neuronas son importantes ya que son necesarias para la iniciación de movimientos voluntarios y para secuencias espaciotemporales de movimientos avanzados.

El tercero y cuarto subsistemas son circuitos complejos.

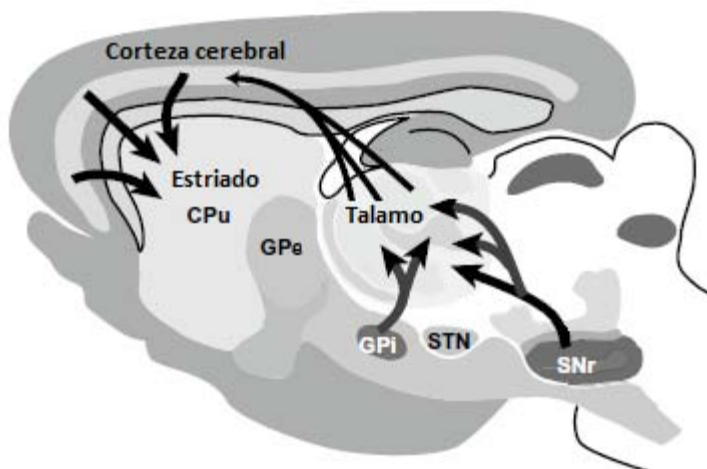
Siendo el más grande de estos el cerebelo, este actúa por vías eferentes a las neuronas motoras superiores como un servomecanismo, detectando la diferencia entre un intento de movimiento y el movimiento en sí.

El otro subsistema se encuentra dentro del encéfalo y consiste en un grupo de estructuras colectivamente referidas como ganglios basales, estos ganglios preparan a las moto neuronas superiores para la iniciación de movimientos. Los problemas asociados con desordenes de los ganglios basales, como Parkinson y Huntington demuestran la importancia de este complejo en la iniciación de movimientos voluntarios (Revisado en Purves, 2004).

## **Ganglios Basales**

El papel de los ganglios basales es la selección de movimientos, metas, estrategias e interpretación de la información sensorial, basándose en el acierto de acciones pasadas bajo condiciones similares.

Este grupo está formado por el caudado, el putamen, y el globo pálido y dos estructuras adicionales; la sustancia *nigra* en la base del mesencéfalo y el núcleo subtalamico en el tálamo ventral (Revisado en Purves, 2004).



**Figura 1. Modelo de la entrada y salida de información en los ganglios basales.** Se indican las conexiones de los ganglios basales con la corteza cerebral en un diagrama de cerebro de rata. Las flechas provenientes de la corteza señalan entradas glutamatergicas mientras que las salidas de este sistema hacia el tálamo son conexiones GABAérgicas. Las siglas usadas en el esquema son: Caudado-Putamen (CPu), Globo Pálido externo (GPe), Globo Pálido interno (GPi), Núcleo Sub Talamico (STN, por sus siglas en inglés), Sustancia *Nigra reticulata* (SNr). Imagen tomada y modificada de Do et al. 2014.

Al igual que el cerebelo, los ganglios basales no tienen conexiones eferentes directas con la medula espinal, y por ello juegan un papel indirecto en el control del movimiento. A diferencia del cerebelo, los ganglios basales no reciben información directa, de los receptores sensoriales. Más bien, sus entradas provienen fundamentalmente de varias regiones del córtex cerebral. Mientras que sus salidas vuelven hacia los córtex motor, premotor y prefrontal, a través del tálamo (Revisado en Kandel, 1998, **Figura 1**).

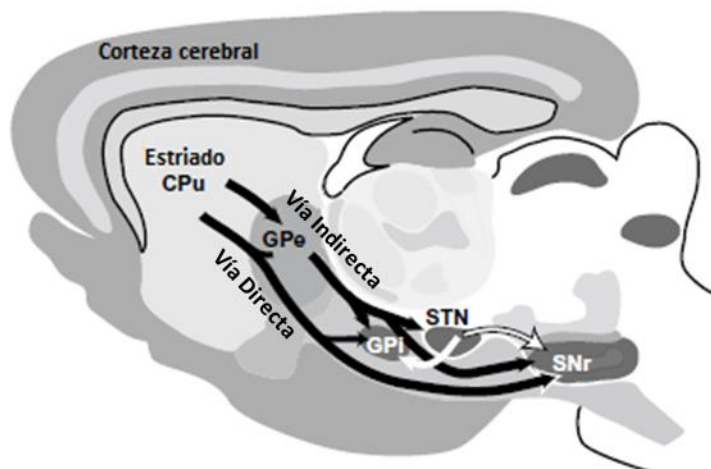
Los componentes motores de los ganglios basales generan un circuito subcortical que une áreas de la corteza con las neuronas motoras superiores en la corteza primaria motora, pre motora y en el tallo cerebral (Ann, 1990).

Las neuronas en este circuito modulan su actividad en anticipación de y durante el movimiento, y sus efectos en las neuronas motoras superiores son requeridos para el curso normal de movimientos voluntarios. Este circuito está compuesto por las proyecciones de las neuronas del caudado-putamen al segmento interno del globo pálido y a la sustancia *nigra reticulata* y constituyen la llamada vía directa; está a su vez inervan a las neuronas del tálamo que promueven el movimiento por medio de las motoneuronas superiores (Parent et al., 2000). Adicionalmente para suprimir movimientos inapropiados se

tiene la vía indirecta entre el caudado-putamen y el segmento externo del globo pálido que envía señales al núcleo subtalámico y este proyecta de regreso al segmento interno del globo pálido y a la sustancia negra *pars reticulata* (Revisado en Purves, 2004, **Figura 2**).

La vía indirecta de los ganglios basales modula la acción desinhibitoria de la vía directa.

Cuando uno de los componentes de los ganglios basales se daña, el sistema motor no puede cambiar adecuadamente entre comandos que indiquen el inicio del movimiento y aquellos que indiquen el término del movimiento. Estos movimientos desordenados resultantes pueden ser entendidos como consecuencia de actividad anormal de las neuronas motoras superiores en ausencia de un control regulatorio normalmente provisto por los ganglios basales.



**Figura 2. Modelo de la Vía directa e indirecta en los ganglios basales.** Se muestran las estructuras que participan en ambas vías siendo las flechas oscuras conexiones GABAérgicas y las blancas glutamatergicas. Las siglas usadas en el esquema son: Caudado-Putamen (CPu), Globo Pálido externo (GPe), Globo Pálido interno (GPi), Núcleo Sub Talamico (STN, por sus siglas en inglés), Sustancia Nigra *reticulata* (SNr). Imagen tomada y modificada de Do et al. 2014.

## Estriado

Los ganglios basales están divididos en diferentes grupos funcionales. El primero y más largo de estos grupos es llamado cuerpo estriado, el cual incluye dos estructuras, el caudado y el putamen. Este une el caudado y la parte dorsal de putamen a través de la capsula interna, el paso de fibras a través de estos le confiere la apariencia estriada. Esta subdivisión es la encargada de recibir las entradas de la mayoría de las rutas de las demás partes del cerebro principalmente de la corteza cerebral (Revisado en Purves, 2004).

Los axones entrantes de la corteza cerebral se conectan con las espinas de las dendritas de las neuronas en el estriado llamadas neuronas espinosas medianas (MSN por sus siglas en inglés) que constituyen cerca del 95% de las neuronas en el estriado, el resto se compone de interneuronas (Tepper y Plenz 2006). Las MSN emplean GABA como neurotransmisor junto con diferentes neuropeptidos como sustancia P, encefalina, dinorfina y neurotensina (Katsuma *et al.* 2000) además de expresar altos niveles de receptores D<sub>1</sub> y Muscarínicos, D<sub>2</sub> y Adenosina A<sub>2A</sub> dependiendo de hacia dónde proyecten (Do *et al.* 2014).

Esta estructura es de importancia ya que juega un papel preponderante en diversos circuitos locales responsables del aprendizaje y memoria de funciones locomotoras y disfunciones del estriado en alguno de sus micro circuitos se han asociado con desórdenes neurológicos como la enfermedad de Huntington (Do *et al.* 2014).

### **Transmisión sináptica**

La comunicación entre las diferentes neuronas en los diversos sistemas neuronales se lleva a cabo gracias a la sinapsis. Existen dos categorías de sinapsis eléctricas y químicas que se diferencian en base al mecanismo de transmisión.

Las sinapsis eléctricas se encuentran en todo el sistema nervioso. La neurona que funge como fuente de la corriente se denomina presináptica, mientras que la postsináptica se encarga de recibir dicha corriente. Las membranas de estas dos neuronas está ligada una a la otra por una unión intracelular llamada gap junction formando un poro compuesto por proteínas conocidas como conexinas.

En las sinapsis químicas la pre y post sinapsis está separada por una hendidura sináptica y está caracterizada por la presencia de vesículas sinápticas en la terminal presináptica. Estas vesículas están llenas con neurotransmisores, estos agentes químicos sirven de mensajeros entre las neuronas.

Esta transmisión se inicia cuando un potencial de acción llega a la terminal presináptica y este cambio de potencial lleva a la apertura de canales de calcio generando una corriente

de este ion que propicia la fusión de las vesículas con la membrana, vertiendo su contenido en la hendidura sináptica. Estos neurotransmisores se difunden y unen a receptores específicos en la membrana postsináptica que pueden estar asociados a un canal iónico que al activarlo modifica su estructura permitiendo la entrada o salida de iones. Este tipo de receptores se denominan inotrópicos, su activación produce un cambio de potencial en la membrana postsináptica. Existe otro tipo de receptores llamados metabotrópicos, estos no desencadenan un cambio en el potencial de membrana directamente ya que el receptor y el canal no están acoplados, primero se tienen que activar una serie de moléculas intermediarias llamados segundos mensajeros y estos a su vez pueden, interactuar con un canal iónico u otro receptor (Revisado en Shepherd, 2004).

### **Modulación Sináptica y Plasticidad sináptica**

Las sinapsis pueden experimentar cambios por la acción de moléculas que modulan su función. Así, además de los neurotransmisores existen otro tipo de sustancias en el sistema nervioso llamadas neuromoduladores, estos se diferencian de los neurotransmisores en la duración y en sus acciones, los neuromoduladores son caracterizados por su prolongada duración y su habilidad de modular la respuesta de una neurona a otra, debido a los diferentes tipos de receptores así como de los segundos mensajeros que son activados (Revisado en Shepherd 2004).

La conectividad sináptica entre neuronas es una entidad dinámica que está en constante cambio en respuesta a la actividad neural y a otras influencias. Tales cambios en la transmisión sináptica surgen de diferentes formas de plasticidad que varían en tiempo y escala desde milisegundos a años. La plasticidad a corto plazo afecta la cantidad de neurotransmisor liberado por la presinapsis en respuesta a un potencial de acción, este tipo de plasticidad incluye un aumento en el potencial de acción, esto principalmente debido a la acción de iones de calcio, en la terminal y al consecuente aumento de liberación de neurotransmisor. El otro tipo de plasticidad a corto plazo es la depresión sináptica la cual disminuye la cantidad de neurotransmisor liberada como resultado del agotamiento de las vesículas sinápticas (Revisado en Purves, 2004).

La plasticidad a largo plazo altera la transmisión sináptica por más de 30 minutos y la componen la potenciación y depresión a largo plazo. Los cambios se generan en el tiempo e incluyen desde modificaciones post transduccionales de proteínas existentes, cambios en la expresión de genes y crecimiento de sinapsis.

La plasticidad a largo plazo puede producir un incremento en la eficacia sináptica, conocida como potenciación a largo plazo (LTP), o bien a un decremento en la eficacia sináptica llamada depresión a largo plazo (LTD) (Revisado en Purves, 2004).

## **Factores Neurotróficos**

Durante el desarrollo del sistema nervioso las neuronas son sometidas a un proceso de muerte celular asegurando un balance entre la población inervada y sus blancos. Para esto son producidas pequeñas cantidades de factores Neurotróficos por las células blanco regulando la diferenciación, crecimiento y sobrevivencia. Una vez regulada la población, estos factores continúan modulando la conexión de sinapsis y de igual forma ayudan al desarrollo axonal y la formación de ramificaciones dendríticas (Revisado en Cowan, 2001; Do *et al.*, 2014).

## **Neurotrofinas y receptores Trk**

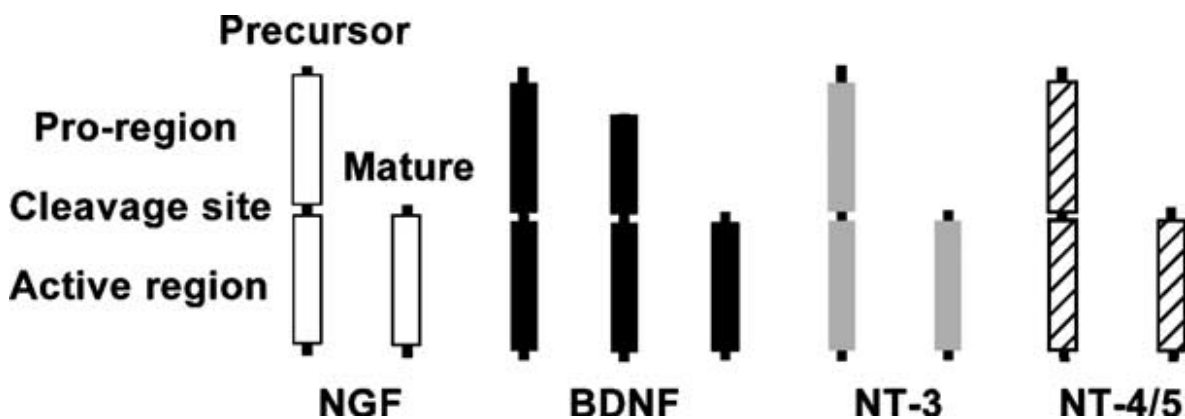
Las neurotrofinas son parte de los factores tróficos, y estas no solo han sido implicadas en procesos de sobrevivencia neuronal regulada por la unión a su blanco, estos factores también han demostrado regular la sobrevivencia de neuroblastos y neuronas inmaduras antes de inervar sus blancos, han demostrado regular la proliferación de neuronas y determinar el nivel de expresión de proteínas expresadas en neuronas diferenciadas, como neurotransmisores o canales de calcio; además de regular el crecimiento axonal (Revisado en Cowan, 2001; Do *et al.*, 2014).

En adultos pueden modular la función y plasticidad del sistema nervioso y en estudios con enfermedades neurodegenerativas han demostrado proteger, al menos parcialmente, neuronas expuestas a neurotoxinas (Patapoutian *et al.*, 2001).

La primera neurotrofina identificada fue el factor de crecimiento nervioso (NGF), seguida por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), posteriormente la Neurotrofina-3 (NT-3), la Neurotrofina 4/5 (NT-4/5) y finalmente la Neurotrofina-6 (NT-6) (Revisado Cowan, 2001).

Aunque estas neurotrofinas son homólogas en su secuencia de amino ácidos y estructura son codificadas por distintos genes y son diferentes en su especificidad (Do *et al.*, 2014).

Estas neurotrofinas son codificadas como precursores glicosidados (31-35 kDa) sintetizados en el retículo endoplásmico como prepro-neurotrofinas y al plegarse el péptido de señalización las convierte en pro-neurotrofinas. En el aparato de Golgi estas pro-neurotrofinas se dimerizan y sufren un proceso proteolítico por convertasas como la furina y las convertasas 1 y 2 (PC1 y PC2) a su forma madura (13.2 -15.9 kDa). Las neurotrofinas maduras son homodimeros unidos no covalentemente con una región de 6 residuos de cisteínas conservadas (Maruyama, 2014; Simi e Ibañes, 2009; **Figura 3**).

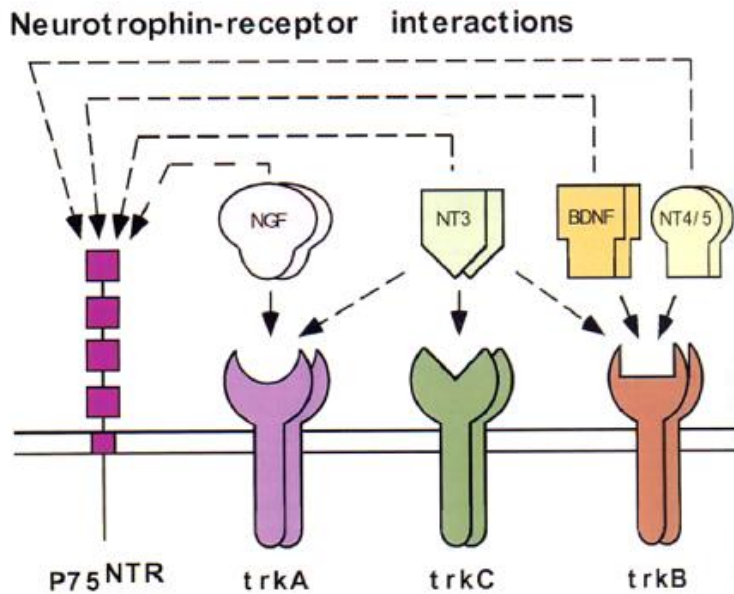


**Figura 3.** Representación esquemática de NT antes y después de su modificación. Los cuatro precursores de NT que son procesadas por convertasas para su modificación. BDNF tiene dos sitios de modificación. Imagen tomada de Roux y Barker, 2002.

Se ha encontrado que las neurotrofinas se unen y activan proteínas tirosina cinasa, que forman 3 receptores homólogos relacionados con la tropomiosina llamados TrkA, TrkB y TrkC. Estos receptores forman parte de la familia de receptores tirosina-cinasa o Trk por sus siglas en inglés (Simi e Ibañes, 2009; Revisado en Cowan, 2001).

Cada neurotrofina activa un receptor diferente desencadenando una cascada de reacciones con diversas consecuencias, siendo el NGF específico del TrkA y uniéndose en

menor manera con NT-6, mientras que el BDNF y NT-4/5 se unen al TrkB y por último la NT-3 se une con TrkC e igualmente con TrkA y TrkB pero con menor afinidad (Revisado en Cowan, 2001; Roux y Barker, 2002; **Figura 4**).



**Figura 4. Modelo esquemático de las NT y receptores.** Se muestra las interacciones de las 4 NT con sus respectivos receptores en líneas solidas mientras que líneas punteadas representan las interacciones con menos eficiencia. Imagen tomada de Cowan 2001.

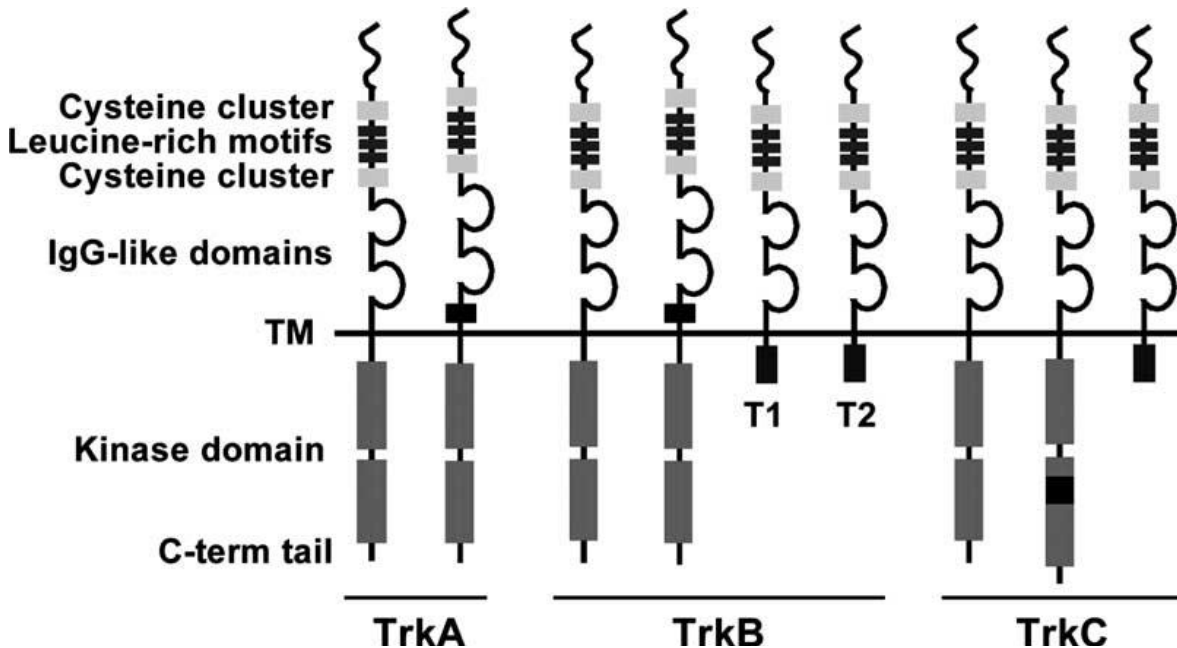
Estos receptores se expresan como protómeros individuales que forman de manera no covalente dímeros asociados. Además comparten secuencias homologas y la organización de dominios con diversos sitios de adhesión celular en sus dominios extracelulares, 3 dominios en tándem uno rico en leucina flanqueado por dos clusters de cisteína en sus extremos amino y dos dominios tipo inmunoglobulina en la región más proximal a la membrana los cuales son los sitios de unión con sus respectivas neurotrofinas (Urfer *et al.*, 1998), tiene un segmento trans-membranal que une a la parte intracelular formada por una dominio tirosina cinasa y una región C-terminal (Maruyama, 2014; Patapoutian *et al.*, 2001; **Figura 5**).

La unión de la neurotrofina a su receptor Trk resulta en la dimerización de este y la activación de la cinasa.

Hay 10 tirosinas en el dominio citoplasmático de cada receptor Trk tres de las cuales están presentes en el loop auto regulatorio de este dominio (Y670, Y674, y Y675), y su fosforilación activa a la cinasa; la activación de los demás residuos promueve la



señalización creando sitios de anclaje para proteínas adaptadoras que unen a los receptores con las vías de señalización, entre estas se encuentran Ras/ERK , PI3K/Akt y PLC- $\gamma$ 1 (Patapoutian *et al.*, 2001).



**Figura 5. Representación esquemática de los receptores Trk y sus isoformas.** Los tres genes que codifican para los receptores Trk también codifican isoformas de los mismos por *splai*cing alternativo. El *splai*cing lleva a los receptores TrkA y B a una forma que carece de una secuencia de aminoácidos en su dominio extracelular, los receptores TrkB y C tienen isoformas sin el dominio cinasa intracelular y TrkC con un inserto en el dominio cinasa. Imagen tomada de Roux y Barker, 2002.

También existen otras dos clases de receptores con los cuales interactúan estas neurotrofinas, las cuales son isoformas de receptores Trk y el receptor p75. Las isoformas de TrkA y de TrkB contienen un sitio carente de 6 a 9 aminoácidos en la juxtamembrana extracelular, esto les permite unirse normalmente a su respectiva neurotrofina con una disminución en la afinidad con las demás neurotrofinas, aumentando su especificidad. Mientras que la isoforma de TrkC contiene insertos de aminoácidos desde 14 a 39 residuos en el dominio de la cinasa que hace defectuosa su señalización. De igual manera también son producidos receptores TrkB y TrkC carentes de la mayor parte intracelular (Roux y Barker, 2002; **Figura 4**). Todas neurotrofinas también se unen débilmente al receptor p75 que es un miembro de la súper familia de receptores de factores de necrosis tumoral o TNFR por sus siglas en inglés y no contiene actividad cinasa (Simi e Ibañes, 2009).

## Señalización por Ras/ERK

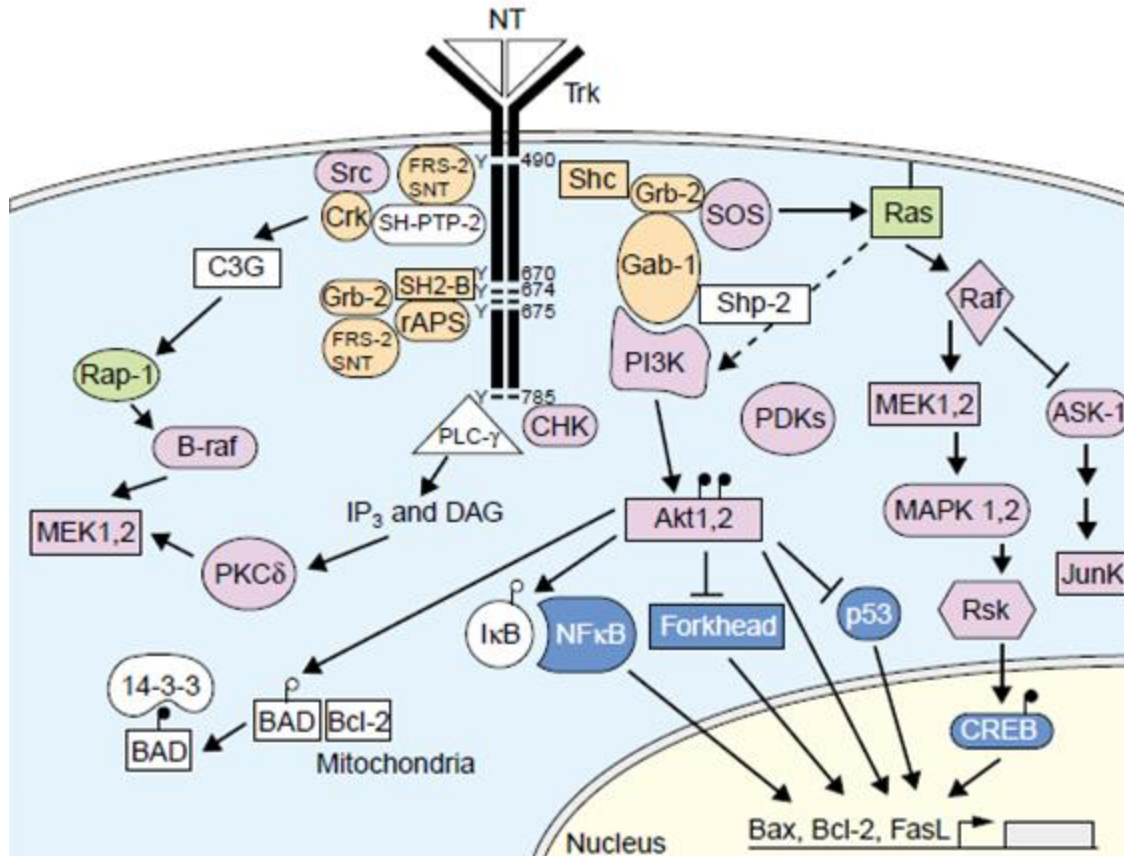
Ras regula la diferenciación neuronal además de promover la supervivencia neuronal en algunos tipos de neuronas, este complejo activa diversas vías como PI3K, p38 MAPK y c-Raf/ERK, entre los blancos de esta última se encuentran RSKs (quinasas ribosomales) y el factor de transmisión CREB, que se han descrito como factores que regulan genes que son esenciales para la supervivencia y diferencia neuronal (Xing *et al.*, 1998; Bonni *et al.*, 1999; Riccio *et al.*, 1999; Patapoutian *et al.*, 2001; York *et al.*, 2000; **Figura 5**).

## Señalización a través de PI3K

Los receptores Trk pueden activar esta vía de dos formas distintas dependiendo de la subpoblación neuronal, en muchas neuronas la activación de esta vía a través de Ras es la forma más importante por la cual las neurotrofinas promueven la supervivencia celular, en otras células PI3K puede activarse a través de proteínas adaptadoras (Holgado-Madruga *et al.*, 1997; Patapoutian *et al.*, 2001).

## Señalización por PLC- $\gamma$ 1

PLC- $\gamma$ 1, una vez reclutado el receptor lo fosforila y lo activa este a su vez hidroliza fosfatidil inositidos para generar diacil glicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> induce la liberación de calcio almacenado aumentando sus niveles citoplasmáticos, resultando en la activación de diversas vías controladas por calcio, mientras que DAG activa una isoforma de PKC que es requerida para la activación de ERK y para el crecimiento de las neuritas (Patapoutian *et al.*, 2001; **Figura 5**).

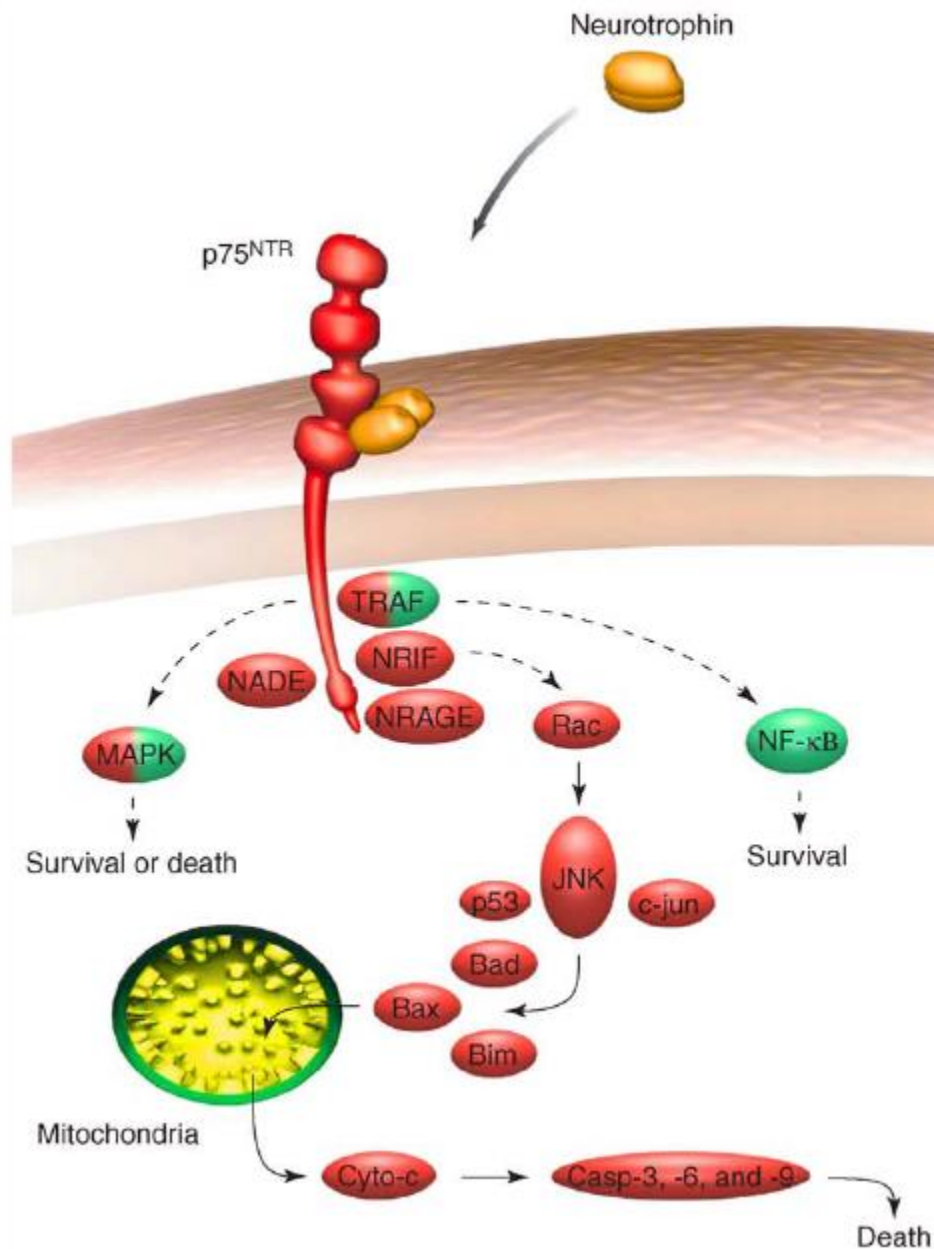


**Figura 5. Diagrama de vías de señalización por asociación NT-Trk.** Una explicación más amplia de las vías es descrita en el texto. Colores y nomenclatura: en naranja se muestran las proteínas adaptadoras, cinasas en rosa, proteínas G en verde y factores de transcripción en azul. Abreviaciones: BAD (promotor asociado a muerte Bcl-2/Bcl), CREB (Proteína de unión a CRE), MAPK (proteína cinasa activada por mitogeno), NT (neurotrofina), PDK (cinasa dependiente de 3-fosfoinositidos), PI3K (fosfatidilinositol-3-OH cinasa), PKC (proteína cinasa C), PLC-γ (fosfolipasa C), RSK (cinasa ribosomal S6) todas las abreviaciones son hechas por las siglas en ingles. Imagen tomada de Patapoutian *et al.*, 2001.

## Receptor p75<sup>NTR</sup>

El otro receptor de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup>, que como se había mencionado antes, es miembro de la súper familia de receptores de factores de necrosis tumoral o TNFR, se compone de cuatro dominios ricos en cisteína acomodados en tándem, requeridos para la unión de las neurotrofinas, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático que incluye una región de muerte como como todos los miembros de esta súper familia. Se ha encontrado que p75<sup>NTR</sup> interacciona con los receptores Trk en la parte citosólica y con los dominios transmembranales, convirtiéndose en un co-receptor que refina la afinidad de los receptores Trk y su especificidad por las neurotrofinas, esto ayuda en diferentes estadios del desarrollo donde los receptores tienen que mostrarse más afines a una

neurotrofina que a otra y ayuda a regular la sobrevivencia y la apoptosis de diversas poblaciones celulares (Nykjaer *et al.*, 2005; Patapoutian *et al.*, 2001; Lad *et al.*, 2003; Nykjaer *et al.*, 2005; Figura 6).



**Figura 6. Diagrama de vías de señalización activadas por p75<sup>NTR</sup>.** p75<sup>NTR</sup> activa vías de señalización que regulan la sobrevivencia (verde) y la muerte neuronal (rojo). Imagen tomada de Nykjaer *et al.*, 2005.

El receptor p75<sup>NTR</sup> tiene alta afinidad por la forma sin procesar de las neurotrofinas cuando se encuentra asociado al receptor Sortlin y baja afinidad por los ligandos procesados comenzando una cascada de apoptosis (Do *et al.*, 2014; Simi e Ibañes, 2009).

Este receptor es altamente expresado durante el desarrollo y su expresión desciende en la etapa adulta, sin embargo se ha encontrado un incremento de su expresión en condiciones de muerte celular (Dechant y Neet, 2002).

### **Neurotrofina-3**

Como ya se revisó estos factores tróficos y sus receptores son importantes en el desarrollo, y dadas las vías que pueden activar, esto los hace candidatos idóneos para estudios en modelos de plasticidad y modulación. Los factores tróficos proveen un soporte a sus blancos neuronales y se ha demostrado que su administración puede mejorar neuronas dañadas.

Uno de ellos la Neurotrofina-3 (NT-3) que ha demostrado tener propiedades neuroprotectoras, ayudar con el crecimiento de neuritas y activar diversas vías como las de MAPK y ERK en las oligodendroglías donde se demostró que la NT-3 promueve la fase S del ciclo celular e inicia la síntesis de DNA además de aumentar la proliferación celular (Kumar *et al.*, 1998), mientras que en células progenitoras neurales la NT-3 estimula la mielinización y ayuda a la recuperación de lesiones de espina dorsal (Kusano *et al.*, 2010) y su coexpresión con BDNF ha demostrado rescatar células lesionadas y protección apoptótica en cultivos celulares (Wang *et al.*, 2012).

Incluso en enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Parkinson cultivos celulares expresando NT-3 y trasplantados a ratas mostraron una regeneración en células dopaminérgicas en el área ventral tegmentada y migrarlas al área dañada (Gu *et al.*, 2008). Al igual que su diferenciación es afectada por esta neurotrofina en cultivos periventriculares (Loudes *et al.*, 1999). De hecho en el estriado se encontró que la NT-3 puede modificar la expresión de las subunidades de receptores NMDA que le confieren diferente vulnerabilidad a excitotoxicidad en neuronas de proyección e interneuronas (Torres-Peraza *et al.*, 2007).

Se ha observado que la neurotrofina NT-3 promueve la plasticidad sináptica y favorece la formación de nuevas sinapsis por medio de modificaciones de la misma (Hyun-Soo *et al.*, 2005;

Mu-ming, 2001). A lo largo del desarrollo esta neurotrofina se ha inmunolocalizado en los somas de células neostriatales proveniente de la corteza (Zermeño *et al.*, 2009). En nuestro laboratorio tenemos evidencia de que la NT-3 modula la transmisión corticoestriatal positivamente y a través de un mecanismo presináptico (Mendoza *et al.*, 2014). Pero se desconoce si afecta los procesos de plasticidad de las sinapsis corticoestriatales. Dado que esta neurotrofina se encuentra en el neostriado y podría activar vías antiapoptóticas se podría probar en enfermedades neurodegenerativas como el Huntington, ya que puede dañar este ganglio basal.

## **Modelo de neurodegeneración**

### **Enfermedad de Huntington**

La enfermedad de Huntington (HD por sus siglas en inglés), es un desorden neurodegenerativo, hereditario y autosómico, que se debe a la mutación del gen IT15 localizado en el brazo corto del cromosoma 4, esto genera una expansión inestable de repetidos CAG en la proteína que codifica este gen, la huntingtina (Htt) generando una poliglutaminación, aumentando el número de repetidos de 35 en población sana a 40 y hasta 121 repetidos, a mayor número de repetidos se incrementa la probabilidad de expresar la enfermedad a menor edad, la tasa de esta mutación se presenta de 4 a 10 casos por 100 mil personas (Revisado en Walker, 2007; Hernández-Echeagaray, 2010; Raymond *et al.*, 2011; Ehrlich, 2012).

La Htt es una proteína de cerca de 350 kDa es altamente conservada y se expresa en todo el cuerpo sin ninguna preferencia por algún tipo celular, cuando no está poliglutaminada se ha encontrado que es esencial para el desarrollo embrional, la hematopoyesis y la neurogénesis (Rangone *et al.*, 2004).

La HD lleva gradualmente a la degeneración de las neuronas espinosas medianas (MSN) del núcleo estriado, una región del cerebro que participa en el control de tareas motoras aprendidas. Así, los pacientes afectados por la enfermedad muestran alteraciones motoras como las coreas (movimientos involuntarios), desordenes de humor, trastornos

cognitivos y depresión que terminan con la muerte del paciente (Revisado en Hernández-Echeagaray, 2010).

La HD es una enfermedad de aparición tardía, aunque puede presentarse en etapas juveniles cuando los repetidos exceden 60. En ambos casos los síntomas empeoran progresivamente llevando a la muerte (Revisado en Raymond *et al.*, 2011).

## **Patología del HD**

Como se mencionó anteriormente la HD es principalmente caracterizada por la pérdida neuronal en el estriado y corteza, sin embargo otros núcleos se han visto afectados, como el globo pálido (GP), tálamo, hipotálamo, núcleo subtalamico y la sustancia *nigra* (Sn). También la región CA1 de hipocampo, el giro angular en el lóbulo parietal y las células Purkinje del cerebelo (Walker, 2007, Revisado en Raymond *et al.*, 2011).

Las MSNs que expresan encefalina en el estriado son las más afectadas, su degeneración progresa más rápido y por tanto la vía indirecta es la más vulnerable. En contraste, las MSNs de la vía directa están relativamente a salvo en las etapas tempranas, aunque las proyecciones a la Sn *reticulata* son más afectadas que las proyecciones al GP interno. Con esto se cree que la corea resulta de la pérdida de las MSN's de la vía indirecta y que la acinesia y distonía que aparecen posteriormente es a causa de la disfunción de la vía directa (Revisado en Raymond *et al.*, 2011; Walker, 2007; Ehrlich, 2012).

Algunas alteraciones observadas a nivel celular son el incremento en la resistencia de entrada de la membrana y los potenciales de reposo despolarizados, y en algunos modelos también un decremento en la capacitancia de la membrana, esto es causado principalmente por una reducción en el tamaño celular y las conductancias de  $K^+$  que se ven reducidas (Cepeda *et al.*, 2003; Hernández Echeagaray, 2004; Raymond *et al.*, 2011).

Una de las consecuencias del incremento en la resistencia de entrada es el incremento de la excitabilidad celular, la cual junto con los potenciales despolarizantes de la membrana puede llevar a la amplificación de las entradas sinápticas e incrementar los potenciales de

disparo. Estos cambios hacen a las MSNs más vulnerables al glutamato (Revisado Hernández Echeagaray, 2004; Raymond *et al.*, 2011).

Las neuronas piramidales corticales también exhiben un incremento de la resistencia de entrada y decremento en la capacitancia, y las corrientes  $\text{Ca}^{2+}$  se ven incrementadas (Levine *et al.*, 2000; Revisado en Raymond *et al.*, 2011).

Sin embargo los mecanismos responsables por este daño celular aun no son del todo claros. En condiciones normales se ha encontrado a la Htt participando en estadios tempranos en el desarrollo del sistema nervioso ya que ratones con Htt mutada (h<sub>ttm</sub>) mueren en etapas embrionarias. Se ha encontrado que la proteína RASD2/Rhes (un homólogo de Ras) expresado altamente en el estriado interactúa con la cola amino de la h<sub>ttm</sub> generando las secuencias poliglutaminizadas que se translocan al núcleo donde forman agregados que alteran los mecanismos de transcripción, de igual manera se han encontrado estos agregados en las membranas mitocondriales (Revisado en Hernández-Echeagaray, 2010; Ehrlich, 2012).

Estos agregados en la membrana mitocondrial hacen que tenga un potencial de membrana bajo, incrementando la susceptibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y a formar un poro de transición inducido por  $\text{Ca}^{2+}$ . Este fenómeno libera el citocromo *c* al citosol y activa la apoptosis celular por medio de caspasas. Además el calcio activa Nos que induce la producción de ROS favoreciendo la agregación de proteínas y la muerte celular (Revisado en Hernández-Echeagaray, 2010).

También se ha observado una reducción significativa en la actividad del complejo II y III mitocondrial (Ehrlich, 2012).

De igual manera se han encontrado cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular debido a falla en los receptores NMDA, haciendo que entre una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula activando diversas vías intracelulares. Esto sugiere una excitotoxicidad mediada por glutamato debido a la sobre activación de receptores NMDA (NMDAR) generando una sobre carga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la posterior falla mitocondrial y muerte celular. Estos receptores no son los únicos



incrementando el calcio, la dopamina que estimula a los receptores D1 y estos por medio de proteínas G relacionadas con la activación de adenilato ciclasas y la producción de AMP cíclico (cAMP), hacen que PKA facilite la actividad de los receptores de NMDA (Revisado en Hernández-Echeagaray, 2010; Raymond *et al.*, 2011).

## **Modelos de la enfermedad de Huntington**

Como se mencionó, la excitotoxicidad ha sido señalada como el principal mecanismo de muerte celular en varias condiciones patológicas como la hipoxia o isquemia. La excitotoxicidad se refiere a los efectos deletéreos producidos en células neuronales por concentraciones relativamente altas de glutamato interactuando con sus receptores membranales.

Estos receptores a glutamato se dividen en dos grupos dependiendo si están ligados a proteínas G o a canales iónicos.

La activación de estos receptores produce una entrada masiva de corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  activando diversas vías que producen alteraciones celulares y muerte.

Primero ocurre una hinchazón de la célula que depende de las concentraciones de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  extracelulares, después un incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante varios tipos de canales ya sean de voltaje o asociados a NMDA para después activar vías entre las cuales las fosfolipasas, proteasas, cinasas y enzimas como NOS juegan un papel importante dañando la ATPasa de calcio, la generación de radicales libres y la alteración de la cadena respiratoria por calcio.

Estructuralmente la excitotoxicidad es descrita como un proceso necrótico que incluye la hinchazón de la célula y del retículo endoplasmático y la aglutinación de la cromatina seguido por la hinchazón y vacuolización de las mitocondrias, eventualmente la ruptura de la membrana plasmática y la fuga del espacio intracelular pueden finalmente llevar a la muerte celular.

También la excitotoxicidad se ha relacionado con la activación de apoptosis, indicando que ambos tipos de muerte celular puedan ser activadas por un exceso en la transmisión glutamatergica.

Esto sugiere que la presencia de apoptosis en el HD no excluye la posibilidad de que la excitotoxicidad mediada por glutamato juegue un rol importante en la etiología de la enfermedad.

Es por esto que a lo largo del tiempo diversos grupos académicos han desarrollado diferentes modelos que sirven para estudiar esta enfermedad para su mayor entendimiento

En los primeros modelos usados para emular los efectos excitotóxicos se demostró que una dosis de kainato un agonista de glutamato no-NMDA podía imitar las lesiones axonales encontradas en la HD, sin embargo no reproducía perfectamente las características histológicas del HD, ya que las neuronas de proyección así como interneuronas NADPH eran afectadas hasta su muerte por esta excitotoxina.

Posteriormente se utilizó el quilonilato un agonista de glutamato selectivo de NMDA, pero de igual manera esta toxina no imita todas las características histológicas además de que se registraron paciente en los cuales el nivel de receptores NMDA disminuyeron desde etapas tempranas de la enfermedad.

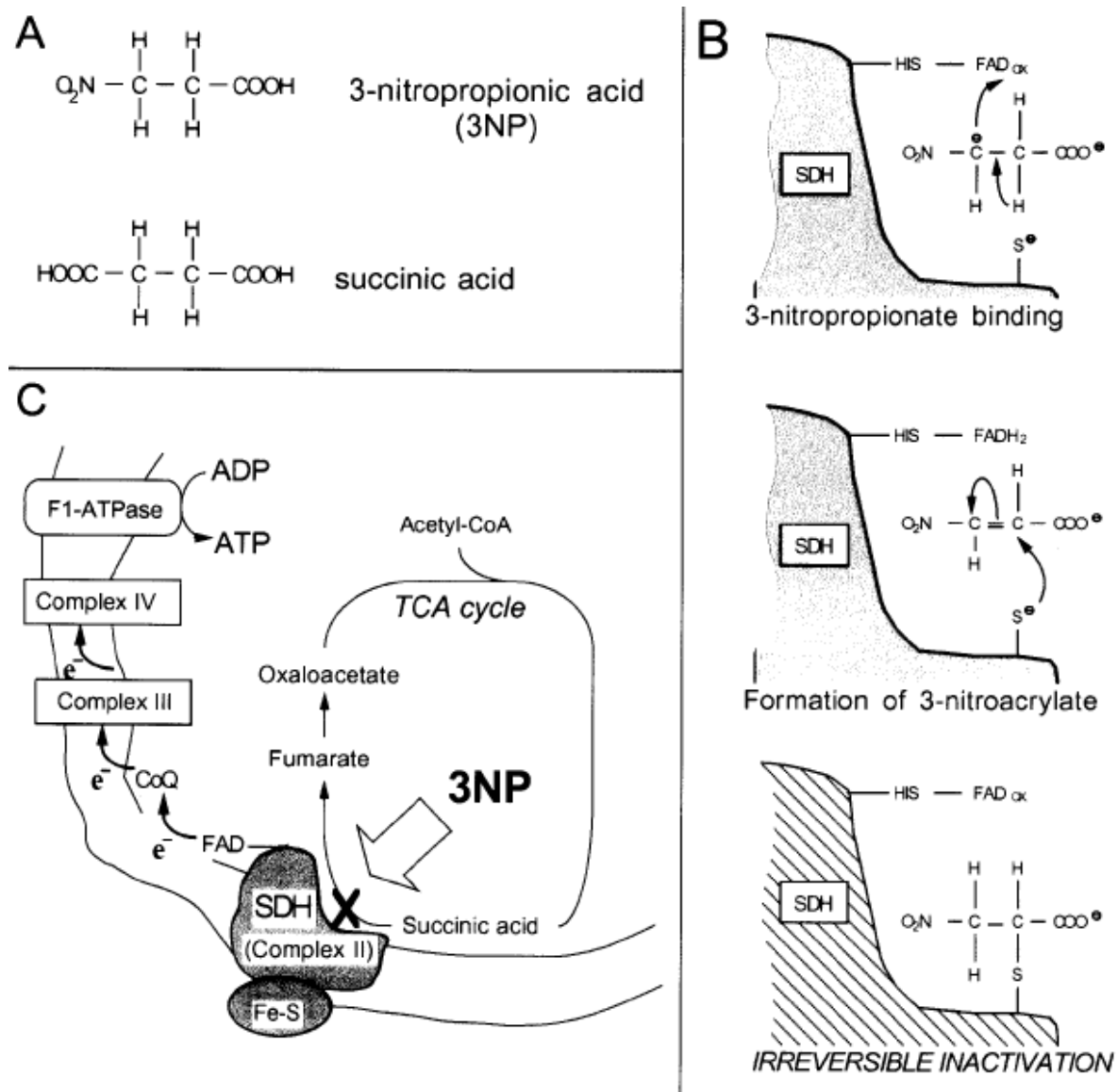
Posteriormente se encontró que un desacoplamiento del metabolismo energético no necesariamente acompañado de cambios extracelulares puede resultar en una excitotoxicidad secundaria, además de encontrar que estudios en pacientes de HD sugieren un defecto mitocondrial mostrando deficiencias en los complejos II-III.

### **Acido 3-Nitropropionico**

El ácido 3-nitropropionico (3-NP) se encontró como un agente toxico selectivo de las MSN's responsable de la inhibición de la succinato deshidrogenasa (SDH) una enzima localizada en la membrana interna de la mitocondria y responsable de la oxidación del

succinato a fumarato. Y que en dosis subcrónicas puede producir daño estriatal y reproduce las características histopatológicas y neuroquímicas del HD (Rodríguez *et al.*, 2010).

Esto gracias que el 3-NP muestra una similitud con el ácido succínico y se une al sitio de sustrato del SDH oxidándose y convirtiéndose en ácido 3-nitroacílico para después reaccionar con el grupo tiol formando un enlace covalente que la misma célula al activar a la encima lleva al 3-NP a seguir bloqueando el sitio de unión induciendo al fallo mitocondrial y a un decremento de ATP (Figura 7).



**Figura 7. Modelo de función del 3-NP en la cadena respiratoria.** Modelo que explica cómo el 3-NP se une al complejo II y su semejanza con el ácido succínico para su inactivación irreversible por el 3-nitroacrilato. Figura tomada de Brouillet *et al.*, 1999.

Esto lleva a las espinas dendríticas a un estrés oxidativo y una despolarización membranal resultando en la liberación del  $Ca^{2+}$  que bloquea los canales NMDA permitiendo la entrada masiva de calcio, calcio que debería ser amortiguado por la mitocondria y el retículo endoplásmico pero al estar desacoplada la cadena respiratoria esto lleva a la activación de diversas enzimas citoplasmáticas incluidas proteasas, caspasas, cinasas, fosfolipasas y endonucleasas llevando a la muerte celular, por lo que el 3-NP puede reproducir diversas características anatómicas y conductuales del HD (Revisado en Brouillet et al., 1999).

### **Daños en la transmisión sináptica**

Gracias a diversos modelos de la progresión de la HD se ha encontrado que las alteraciones en las sinapsis de la vía cortico-estriatal cambian dependiendo del estadio de la enfermedad (Cepeda et al., 2003; Raymond et al., 2011).

La desregulación de entradas glutamatérgicas a las MSNs ocurre temprano en la enfermedad y es manifestado por la presencia de eventos sinápticos espontáneos y un incremento de corrientes postsinápticas excitatorias. Esto puede reflejar un incremento en la actividad excitatoria en la corteza y una posible reducción en la función de los receptores presinápticos que generalmente regulan la liberación de glutamato de las terminales corticales (Revisado en Raymond et al., 2011).

Posteriormente, se registra un cambio tardío es la disminución en la actividad sináptica de las MSNs. Este cambio se muestra al mismo tiempo que aparecen las alteraciones conductuales volviéndose más severo conforme progresa, junto con la desaparición de las espinas dendríticas provoca que las MSNs se desconecten de sus entradas sinápticas. Se ha observado que la reducción progresiva de la actividad sináptica glutamatérgica reduce también la liberación de BDNF, un factor esencial para el soporte neuronal facilitando la disfunción celular y la subsecuente degeneración (Revisado en Raymond et al., 2011).

## Justificación

Con base a los antecedentes descritos una opción de tratamiento en alteraciones neurodegenerativas que afecta al núcleo estriado como es la HD, podría ser el restablecimiento neurotrófico. En el laboratorio se ha mostrado que la NT-3 parece provenir de la corteza. Además a lo largo del desarrollo la neurotrofina-3 se encuentra en los somas de células neostriales (Zermeño *et al.*, 2009). También en nuestro laboratorio tenemos evidencia de que la NT-3 modula la transmisión corticoestriatal (Mendoza *et al.*, 2014), pero desconocemos si a NT-3 favorece los procesos de plasticidad sináptica en el estriado. Así mismo, hemos observado que tanto la NT-3 como su receptor TrkC incrementan su expresión en un modelo de la neurodegeneración estriatal inducido con la toxina mitocondrial 3-NP (Hernández-Echeagaray *et al.* 2012; Espíndola *et al.* 2012).

## Hipótesis

Como se ha mencionado la NT-3 tiene reportes de modificar sinapsis, además de activar diversas vías y algunas de ellas estimulan factores anti apoptóticos, así que creemos que en rebanadas de estriado dañadas con la toxina 3-NP, esta neurotrofina podría modificar ya sea la respuesta sináptica o la plasticidad generada.

## Objetivos

Analizar el efecto del NT-3 sobre la plasticidad sináptica estriatal en un modelo de neurodegeneración.

Para lo cual se necesita:

- Evaluar el efecto modulador in vivo de la NT-3 en la sinapsis estriatal en condiciones normales.
- Evaluar el efecto modulador in vivo de la NT-3 en la sinapsis estriatal en un modelo de neurodegeneración
- Evaluar el efecto de la NT-3 en la plasticidad sináptica estriatal en condiciones normales

## Metodología

### Obtención de rebanadas de tejido cerebral

Para los experimentos se usaron ratones macho C57/BL6 de 30 días de nacidos los cuales fueron anestesiados con éter y posteriormente fueron sacrificados por decapitación. Se extrajo el cerebro del cráneo y le fueron retirados los bulbos olfatorios y el cerebelo, se separaron los dos hemisferios y se colocaron en un vibratomo (Pelco® 102, 1000 Plus, USA) se realizaron cortes sagitales de 400 micras. Todo esto bajo el flujo de la solución fisiológica artificial de líquido cerebro-espinal a 4°C, dicha solución contiene: CaCl<sub>2</sub> (2 mM), NaCl (125 mM), KCl (3 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), NaHCO<sub>3</sub> (26 mM), ácido ascórbico (0.2 mM), tiourea (0.2 mM) y glucosa (10 mM) gaseadas con una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en 95/5%.

Las rebanadas obtenidas se colocaron en una cámara de registro con perfusión constante con un flujo de 1.5 – 2 ml/min con la misma solución fisiológica, y se les añadió en el baño bicuculina (10 µM) un bloqueador de los receptores GABA.

El registro electrofisiológico se realizó en el estriado dorsolateral, utilizando un electrodo de estimulación colocado en el cuerpo caloso, y se registró la señal de salida con un segundo electrodo de borosilicato situado entre 3-5 milímetros de distancia.

Posteriormente con un protocolo de pulso pareado de 50 milisegundos entre cada pulso se evaluaron los cambios en la facilitación, y se registraron controles largos de 30 minutos solo con bicuculina para demostrar que la respuesta obtenida no se vio afectada en el tiempo, se repitió igualmente para la NT-3 y en el modelo de neurodegeneración.

Se generó la plasticidad con un protocolo de tren de alta frecuencia supra umbral y se grabó 30 minutos para observar que la plasticidad fuera constante. Para generar la plasticidad se dieron 3 trenes de corriente a una frecuencia de 100Hz mientras que el voltaje supra umbral fue obtenido mediante una curva intensidad-respuesta para ajustar el voltaje a la amplitud media de la respuesta.

Los experimentos con NT-3 se grabaron de 10 a 20 minutos control, y se añadió al baño la neurotrofina al baño con bicuculina y se grabó 30 minutos posteriormente se dio un tren supraumbrales de alta frecuencia.

De igual manera los experimentos con el modelo neurodegenerativo fueron tratados con 3-NP 15mg/kg vía intraperitoneal durante 5 días y se dejaron descansar 2 días para su posterior sacrificio y su registro electrofisiológico.

Los datos obtenidos de los registros se digitalizaron con ayuda de la tarjeta ATM10 acoplada a un sistema de análisis de señales, se analizaron y graficaron con el software OriginPro7.

### **Registro electrofisiológico**

En nuestros experimentos realizamos registros extracelulares de poblaciones neuronales para observar cambios en las corrientes iónicas llamados potenciales de campo o espigas poblacionales, asociadas con el resultado de varios potenciales de acción sincronizados en nuestra población neuronal, de tal manera que el tamaño de una espiga poblacional en el registro depende del tamaño de la población neuronal activa.

Este potencial de campo extracelular tiende a tener forma de una onda trifásica debido a la formación de pozos y fuentes, donde los pozos son corrientes entrantes a las células y son representados con un símbolo negativo (-) mientras que las fuentes son corrientes salientes y son representadas con un símbolo positivo (+). Esto genera una diferencia de potenciales por el cambio en la posición de los pozos y fuentes a lo largo del tiempo, y al propagarse la corriente la fuente se convierte en pozo y el pozo anterior en fuente y más adelante se genera otro nuevo pozo (Johnston y Miao-Sint, 1995).

## Protocolo de Pulso Pareado

El protocolo de pulso pareado consiste en dar dos estímulos de la misma intensidad y duración, cercanos en el tiempo (aprox. 50 ms entre cada uno), esto genera que la respuesta al segundo estímulo se vea influenciada por el primero, dependiendo de la intensidad incrementará o decrementará la amplitud de la respuesta, si la relación entre ambas respuestas  $S2/S1$  cambia es indicativo de modificaciones presinápticas, mientras que si la relación entre ellas no se modifica puede ser indicativo de mecanismos postsinápticos.

Cuando se estimula una neurona ésta se despolariza y se activan canales de calcio dependientes de voltaje presentes en la terminal presináptica, permitiendo el influjo de calcio en la terminal, este incremento en el calcio lleva a que las vesículas con el neurotransmisor se fusionen con la membrana y sea liberado en el espacio sináptico. Los mecanismos de amortiguación del calcio, son los encargados de mantener las concentraciones normales de  $Ca^{2+}$ , sin embargo la cinética de amortiguamiento es lenta por lo que si la célula se estimula con un segundo estímulo cercano en el tiempo, el calcio que aún no se amortiguaba por los mecanismo de recaptura se suma al calcio remanente del primer estímulo, lo que incrementa la probabilidad de liberación neurotransmisor (Katz y Miledi, 1968).

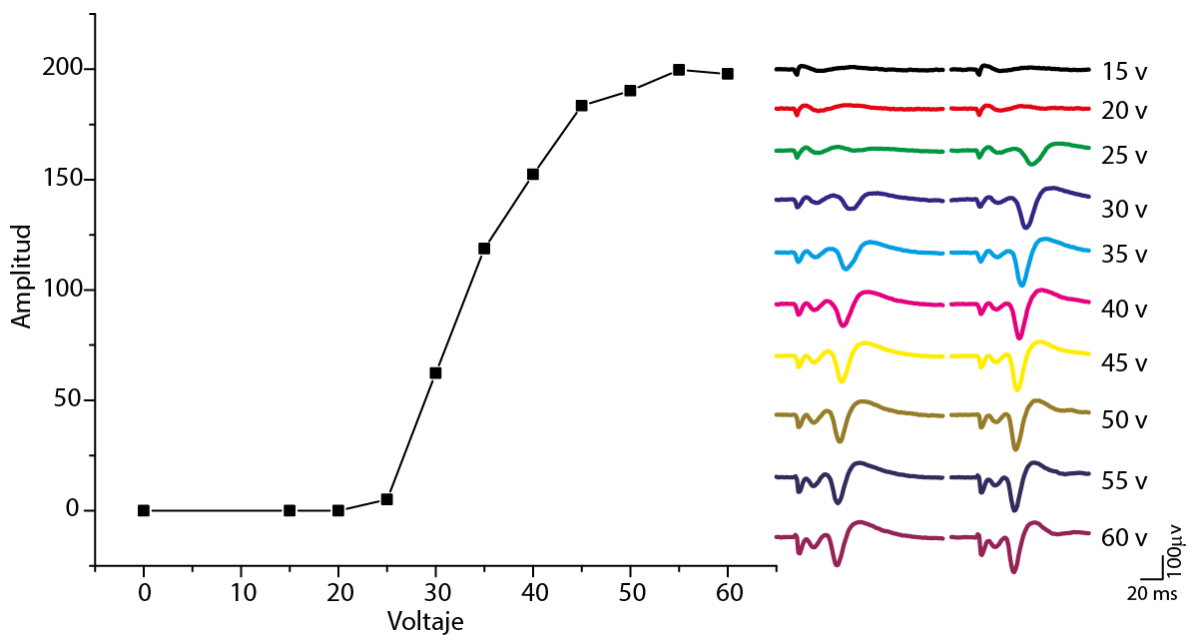
Si lo anterior se lleva a cabo la segunda respuesta (S2) será más grande que la primera (S1) ocurriendo una facilitación por pulso pareado (FPP), por la facilitación de liberación en el segundo estímulo. Pero si S1 tiene una entrada masiva de calcio, hay mayor probabilidad de la liberación del neurotransmisor con este estímulo y cuando se estimule por segunda vez, la terminal no podrá liberar más neurotransmisor debido a que en el primer estímulo se vaciaron las vesículas que contienen al neurotransmisor, este hecho lleva a la generación de una depresión sináptica por pulso pareado (DPP) (Johnston y Sin 1995).



## Resultados

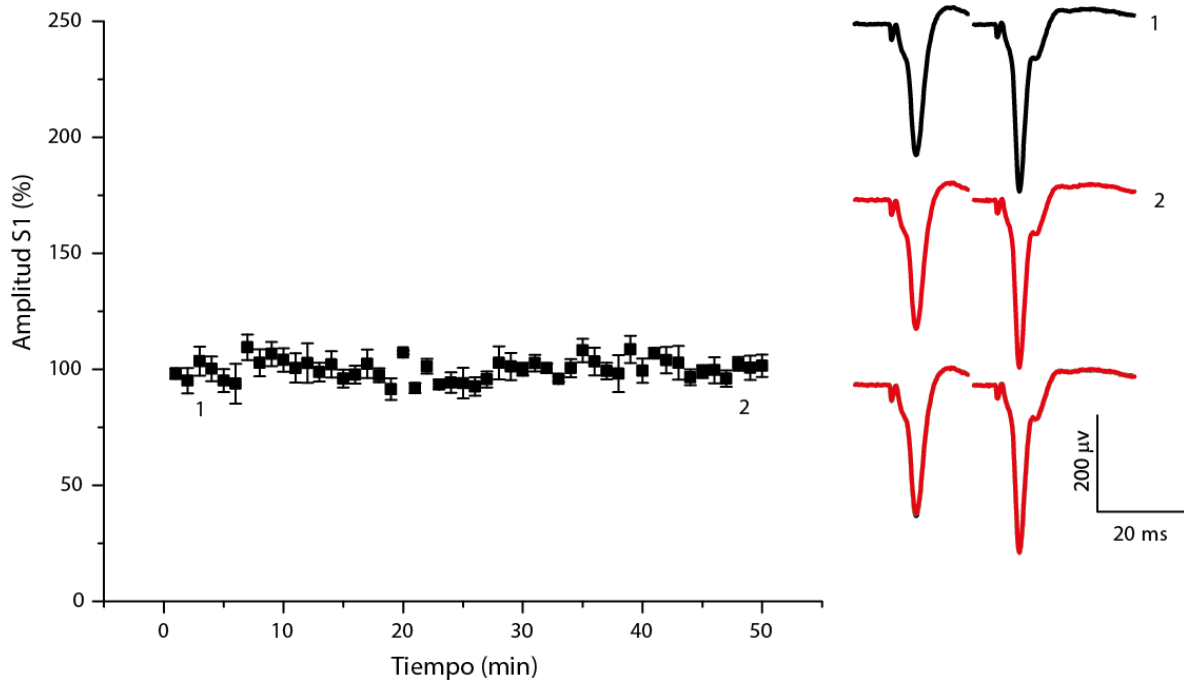
Usando las metodologías antes descritas en este trabajo se evaluó el efecto en transmisión sináptica y la plasticidad sináptica de la neurotrofina 3 (NT-3) en control y el modelo de 3-NP.

Se realizó una curva de intensidad-voltaje para determinar la estimulación necesaria para obtener una respuesta del 50% para no sobre estimular la respuesta y observar los cambios ocasionados por el experimento (Figura 8).



**Figura 8. Curva Amplitu-Voltaje.** Curva hecha para mostrar las diferentes amplitudes y los niveles de saturación de las poblaciones para determinar el punto medio de estimulación. A la derecha se muestran trazos representativos de los diferentes voltajes.

De igual manera se realizaron registros de larga duración con la finalidad de mostrar que nuestras rebanadas así como los registros obtenidos en ellas se encontraban en buenas condiciones y que los cambios en las respuestas poblacionales de los experimentos se deben a los efectos de la neurotrofina y no a una metodología mal empleada. Estos cursos temporales muestran que la amplitud de las espigas poblacionales se mantiene estable a lo largo del tiempo (Figura 9).



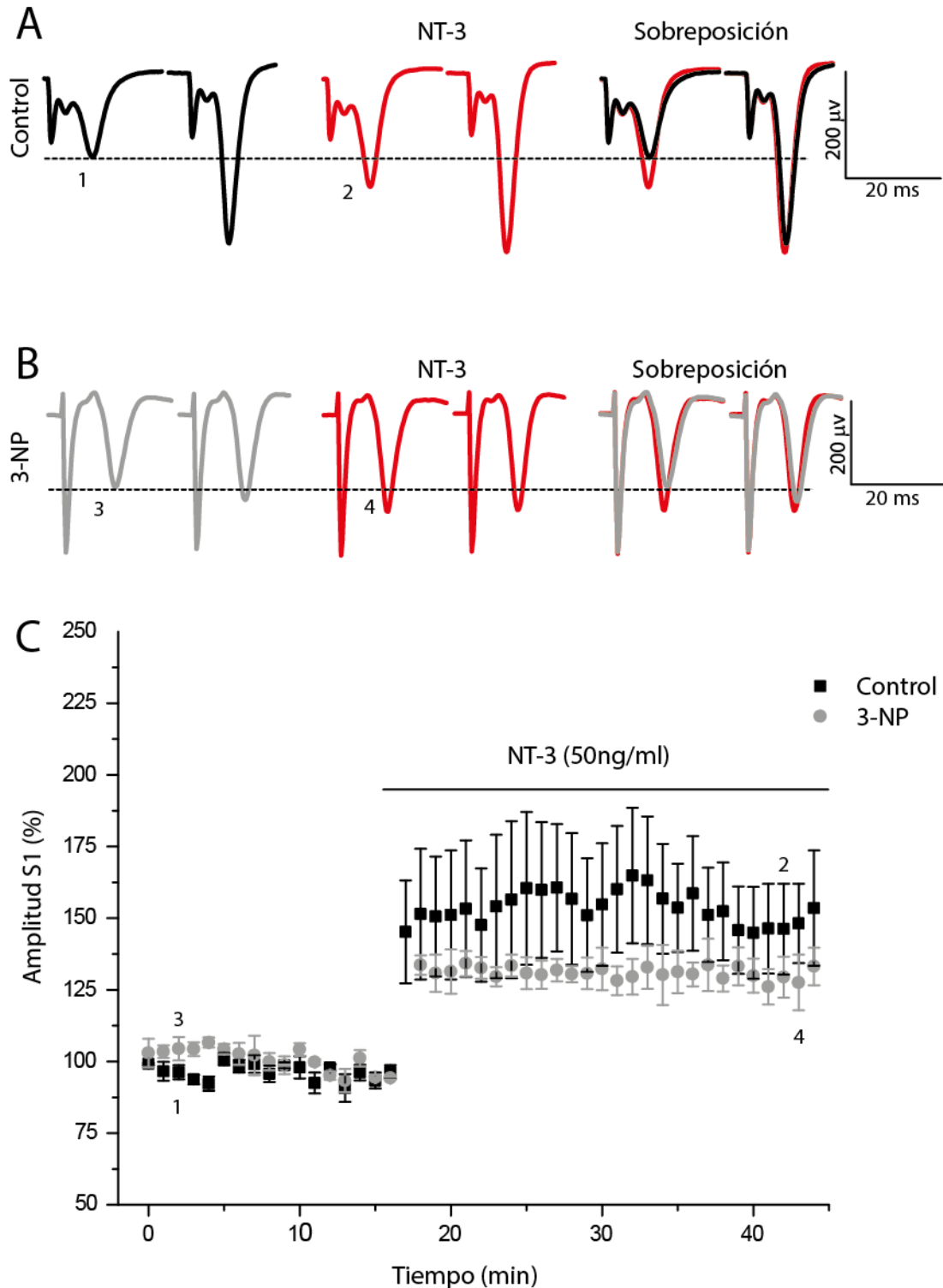
**Figura 9. Curso temporal largo.** Experimento de registro de campo donde se muestra el curso temporal de un experimento control que no ha cambiado en el tiempo demostrando que los efectos mostrados son por manipulación de nuestros fármacos. Y a la derecha trazos representativos de las amplitudes.

En la figura anterior se muestra a las espigas poblaciones separadas por un periodo de tiempo de más de 30 minutos y aun así no muestran cambios significativos durante el curso temporal, demostrando que los experimentos fueron estables y los tejidos sanos.

### **Modulación de la sinapsis glutamatérgica por acción de la neurotrofina-3 (NT-3) en estriado y en un modelo de neurodegeneración estriatal.**

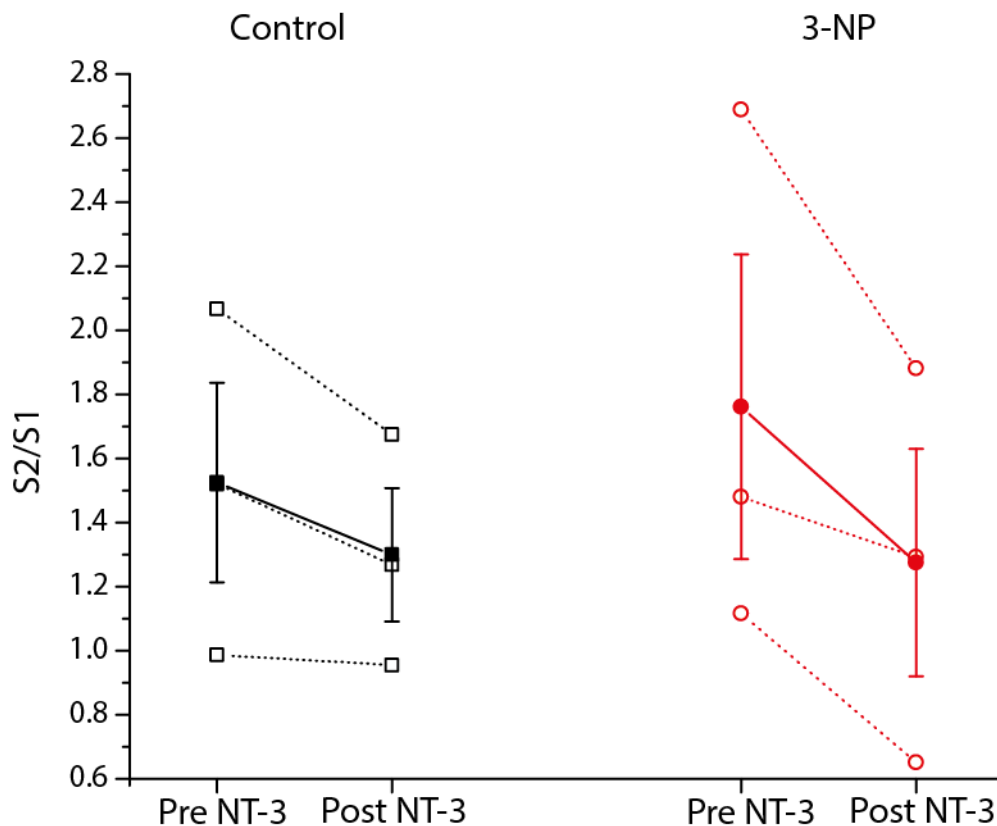
Antes de evaluar los efectos de la NT3 en la plasticidad primero se registró su efecto en la modulación sináptica en tejido sano y en tejido proveniente del modelo de neurodegeneración que hemos establecido en el laboratorio para ver sus distintos efectos. Se realizaron registros control en ambas muestras y posteriormente se adicionó la neurotrofina (50 ng/ml) al baño.

En la figura 10-C se observa el efecto modulador de NT-3 mostrando un incremento de  $57 \pm 6.1\%$  significativo en la amplitud de S1 ( $p < 0.001$ ) con respecto al control. Mientras que el modelo neurodegenerativo de igual manera muestra un incremento pero en proporción de menor grado siendo de  $30 \pm 5.7\%$  para la amplitud de la S1 ( $p < 0.001$ ).



**Figura 10. Modulación de la transmisión sináptica por NT-3 en control y el modelo de HD.** En A y B se pueden observar los trazos representativos de los potenciales sinápticos mostrando en ambos un incremento en la amplitud. Siendo A los trazos control y B los tratados con 3-NP los trazos tratados en ambos casos los trazos rojos para la aplicación de la neurotrofina-3. Los números indican la localización de los trazos en el curso temporal. En C se muestra el curso temporal normalizado en porcentaje de la amplitud de los potenciales de campo contra tiempo, en cuadros negros para el control y para el modelo de HD en círculos grises. La línea superior muestra cuando se adiciono y la concentración de la neurotrofina (50ng/ml) (n=3).

De igual manera se llevaron análisis de los datos producidos por el pulso pareado, como se explicó anteriormente con el cociente de ambas espigas ( $S2/S1$ ) se puede inferir el mecanismo de acción ya sea pre o pos sinápticos (**Figura 11**).



**Figura 11. Protocolo de pulso pareado ( $S2/S1$ ) antes y después de aplicar NT-3 en condiciones control y en modelo de HD.** En la gráfica se muestra el cociente de  $S2/S1$  en negro la parte control y en rojo bajo el modelo de HD. Se puede observar la tendencia a disminuir de dicho cociente e incluso más en el modelo, pero no presenta diferencias significativas.

En los análisis del pulso pareado (**figura 11**) se observa que el grupo control modulado por la neurotrofina a pesar de que se muestra una tendencia a disminuir el cociente (Control:  $1.5 \pm 0.5$ ; NT-3:  $1.2 \pm 0.3$ ) no se encuentran diferencias significativas, de igual manera para la modulación en animales tratados con 3-NP se observa una tendencia similar (3-NP:  $1.7 \pm 0.8$ ; NT-3:  $1.2 \pm 0.6$ ) tampoco se encuentran diferencia significativas sugiriendo un efecto mediado por actividad postsináptica.

## **Generación de plasticidad sináptica en condiciones control y en presencia de la neurotrofina-3.**

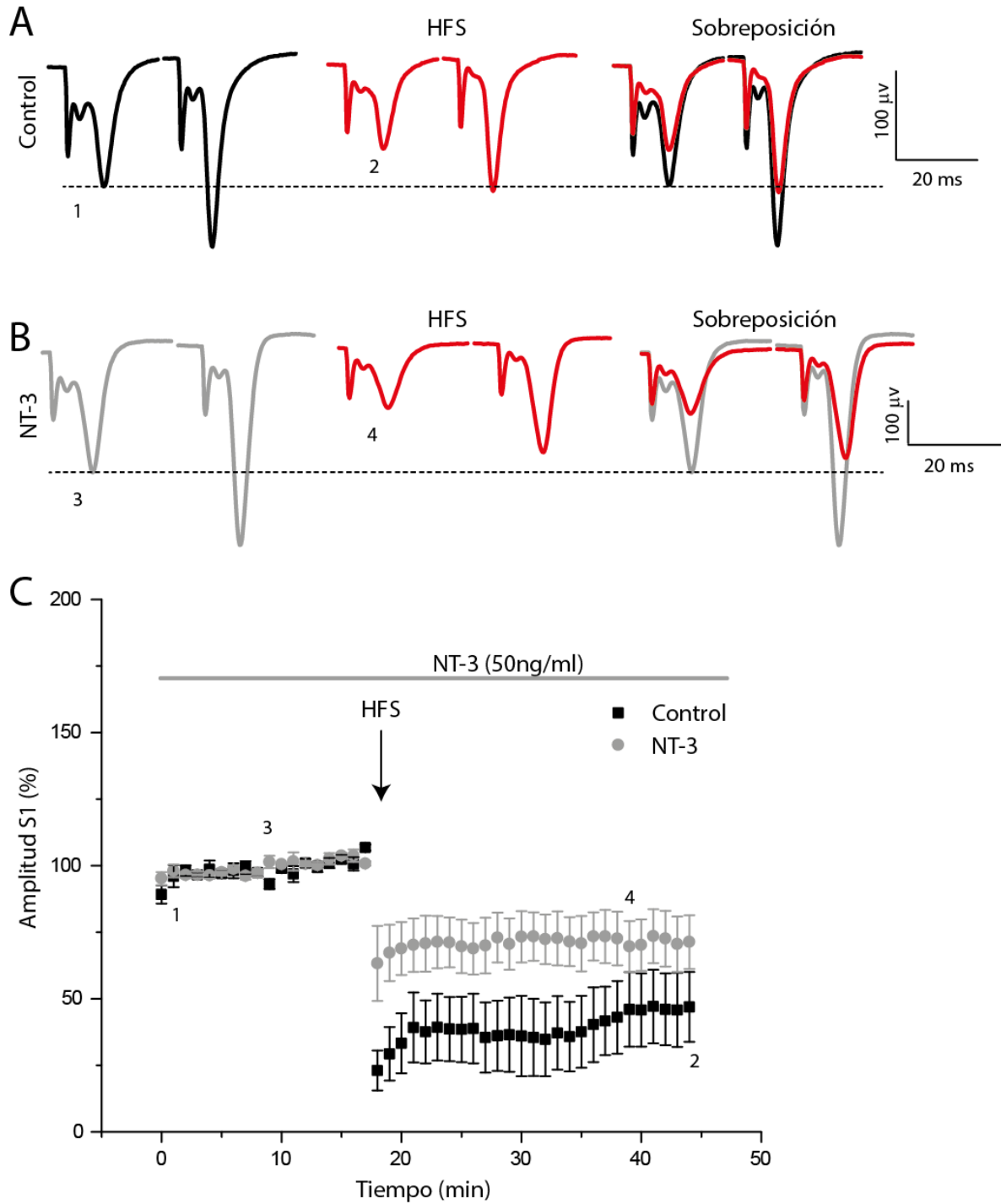
Anteriormente se mencionó la importancia de la plasticidad sináptica y su papel en el aprendizaje, con el fin de evaluar este fenómeno se realizaron los siguientes experimentos en condiciones control y posteriormente el efecto que la NT-3 puede causar en este fenómeno.

En la figura 12, se muestran los datos obtenidos para ambos experimentos donde al aplicar un tren de alta frecuencia sobre la población control se observa un decremento en la amplitud de la espiga poblacional S1 ( $57.9 \pm 3.7\%$ ), este cambio fue significativamente diferente ( $P < 0.001$ ).

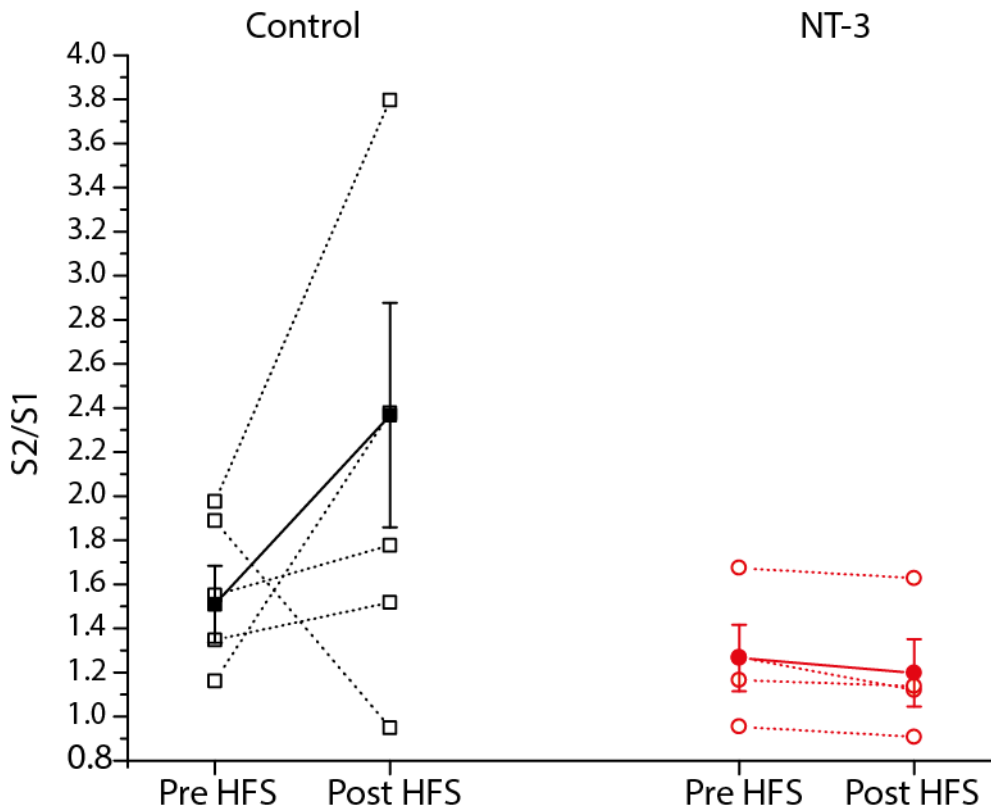
Por otro lado en presencia de NT-3, la espiga poblacional en respuesta a S1 también decemento su amplitud ( $28.8 \pm 2.4\%$ ) después del tren de alta frecuencia, es decir se produjo LTD, este decremento fue significativo con respecto a su control ( $P < 0.001$ ).

También en estos experimentos se llevó el análisis de los cocientes de S2/S1 para determinar la naturaleza de los efectos. En las rebanadas de los animales control se observó un incremento no significativo (Control:  $1.5 \pm 0.3$ ; HFS:  $2.08 \pm 1.08$ ). Por otra parte el resultado del cociente para los experimentos con NT-3 no mostraron diferencias significativas (NT-3:  $1.26 \pm 0.3$ ; HFS:  $1.77 \pm 0.1$ ) indicando un posible efecto postsináptico.

(Figura 12).



**Figura 12. Plasticidad sináptica control y modulada por NT-3.** En A y B se pueden observar los trazos representativos de los potenciales sinápticos mostrando ambos un decremento en la amplitud. En A se muestran los trazos control y en B los trazos de los animales tratados y rojo para después del tren de alta frecuencia (HFS). Los números indican la localización de los trazos en el curso temporal. En C se muestra el curso temporal normalizado en porcentaje de la amplitud de los potenciales de campo contra tiempo, en cuadros negros el control y con círculos grises se muestra los trazos con NT-3. La línea superior muestra cuando se adiciono la NT-3 solo para círculos grises y la concentración de la neurotrofina (50ng/ml) (n=4) la flecha indica el momento del estímulo.



**Figura 13. Protocolo de pulso pareado (S2/S1) antes y después de aplicar un tren de alta frecuencia en ausencia y presencia de NT-3.** En la gráfica se muestra el cociente de S2/S1 en negro la parte control y HFS para después del tren y en rojo para la NT-3 e igual HFS para después del tren. En control se aprecia una gran diferencia en cociente sin llegar ser significativa, mientras que en presencia de NT-3 no se produjo mucho cambio.

### **Plasticidad sináptica en un modelo de neurodegeneración y el efecto de la NT-3 en ella.**

Ya hemos observado que el daño que el HD puede ocasionar en la transmisión sináptica por medio de nuestro modelo farmacológico y algunos de los mecanismos en los procesos de plasticidad sináptica ahora para poder ver como la HD afecta esta plasticidad, se realizaron protocolos de plasticidad en ratones tratados con 3-NP e igualmente se realizaron experimentos bajo la mismas condiciones pero en presencia de NT-3 para ver los efectos de esta neurotrofina en la plasticidad en sinapsis dañadas.

Cabe resaltar que en los experimentos de 3-NP en presencia de NT-3 son la continuación de los experimentos mostrados en el proceso modulador dándose a entender que nuestras muestras llevan de 30 a 40 minutos en presencia de la neurotrofina.

En estos experimentos se puede observar como después de aplicar un tren de alta frecuencia en las muestras tratadas con 3-NP se observa un incremento en la amplitud de la espiga poblacional S1 ( $38.8 \pm 3.5\%$ ) siendo un incremento significativo con respecto a su control ( $P < 0.001$ ) **Figura 14**.

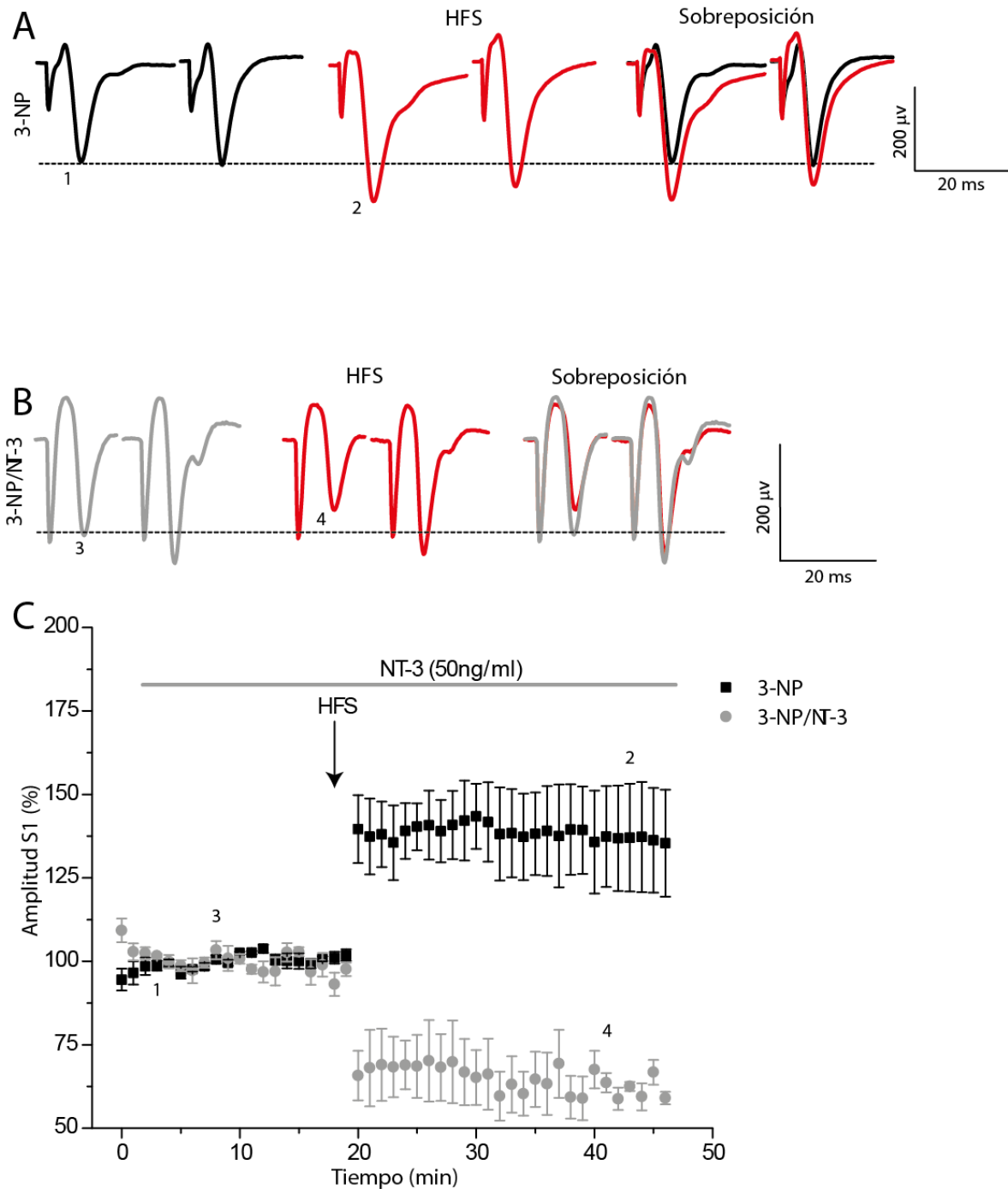
Mientras que las poblaciones igual tratadas con 3-NP pero con NT-3 en el baño a las cuales igual se les aplico un tren de alta frecuencia mostraron un decremento en el tamaño de la espiga poblacional S1 ( $36.3 \pm 4.1\%$ ) siendo también significativo ( $P < 0.001$ ) **Figura 14**.

De igual manera que en los experimentos pasados se hizo el análisis de los cocientes S2/S1 donde por la parte de los experimentos con 3-NP no se encontró diferencia alguna en los cocientes de la amplitud antes y después del HFS (3-NP:  $0.86 \pm 0.19$ ; HFS:  $0.777 \pm 0.12$ ), tampoco hubo diferencia en este aspecto para la parte de 3-NP/NT-3 (3-NP/NT-3:  $1.38 \pm 0.06$ ; HFS:  $1.39 \pm 0.8$ ) sugiriendo un posible efecto postsináptico **Figura 15**.

Se tienen reportes de la expresión de esta neurotrofina en hipocampo (Friedman *et al.*, 1991), y la expresión de sus genes en ganglios basales y mayormente en giro dentado (Zhang *et al.*, 2007) y nuestro laboratorio se ha encontrado en el estriado. Pero estos efectos no son solo atribuibles a la neurotrofina, tiene que haber un receptor a quien unirse.

Se sabe que NT-3 se une a su receptor TrkC y en menor intensidad a TrkA y B , pudiendo activar una serie de vías en la postsinapsis, como se había mencionado anteriormente la activación de estos receptores puede activar Shc permitiendo la formación del complejo de Grb2/SOS terminando en la activación de proteínas ERK este mecanismo activa RSK que fosforila CREB que regula la transcripción con la subsecuente síntesis de proteínas que ayudan al incremento de la transmisión sináptica (Finkbeiner, 1997) que aseguran la maduración de la maquinaria para la liberación de neurotransmisores (Hyun-Soo *et al.*, 2006).





**Figura 14. Plasticidad sináptica en 3-NP y en 3-NP en presencia de NT-3.** En A y B se pueden observar los trazos representativos de las espigas sinápticas poblacionales mostrando para A un incremento en la amplitud y para B decremento en la amplitud. Siendo negro los trazos antes del tren y rojo para después de su estimulación. Los números indican la localización de los trazos en el curso temporal. En C se muestra el curso temporal normalizado en porcentaje de la amplitud de los potenciales de campo contra tiempo, en cuadros negros abiertos para el control con 3-NP y cerrados para después del estímulo de alta frecuencia (HFS), en rojo con círculos abiertos se muestra el control con 3-NP/NT-3 y cerrados después del HFS. La línea superior muestra cuando se adiciona la NT-3 solo para círculos grises y cerrados y la concentración de la neurotrofina (50ng/ml) (n=4;n=3) la flecha indica el momento del estímulo.

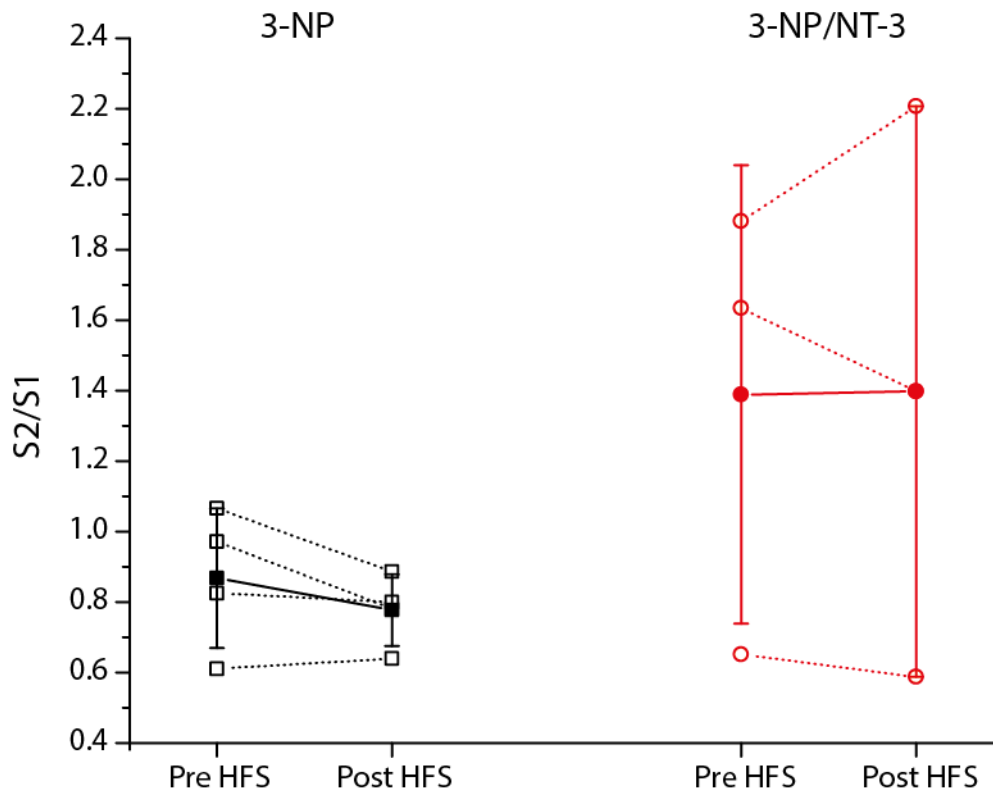


Figura 15. Protocolo de pulso pareado ( $S2/S1$ ) antes y después de aplicar un tren de alta frecuencia en ausencia y presencia de NT-3 en tratamientos con 3-NP. En la gráfica se muestra el cociente de  $S2/S1$  en negro la parte 3-NP y HFS para después del tren y en rojo para la 3-NP/NT-3 e igual HFS para después del tren. En ambas situaciones se observa la casi nula diferencia entre cocientes.

## Discusión

### PI3K e IP3 posibles vías en la modulación sináptica de NT-3

El efecto modulador del NT-3 observado en la figura 10 también se ha observado en sinapsis neuromusculares cultivadas (Lohof *et al.*, 1993) donde una exposición aguda potencia la transmisión sináptica, también se ha encontrado que aumenta la transmisión sináptica en la vía de las colaterales de Schaffer (Kang y Schuman, 1995) al igual que en la transmisión de fibras musgosas en ratas adultas anestesiadas (Ramos-Languren y Escobar, 2013).

Por otra parte también se activa la vía PLC $\gamma$  la cual como se explicó anteriormente genera DAG e IP3. IP3 junto con PI3K induce la liberación de calcio de vesículas intracelulares promoviendo vías activadas por este ion como la activación de la Ca/calmodulina cinasa II (CaMK-II) incrementando la modulación de la transmisión sináptica (Yang *et al.*, 2001; He *et al.*, 2000), mientras que DAG activa PKC iniciando la cascada de MAPK fosforilando CREB.

Y aunque esto en primera instancia podría estar en oposición con nuestros resultados se cree que los efectos presinápticos son mostrados en un inicio, mientras los efectos postsinápticos son manifestados después de más tiempo de exposición a la neurotrofina y son independientes (Alder, 2005; Tyler *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2001).

En la postsinapsis de igual manera el aumento de calcio y la activación de CaMKII pueden controlar la fusión de vesículas con neurotrofina al medio pero más importante es la estimulación de NMDAR por las neurotrofinas aumentando la probabilidad de apertura de los canales NMDA (Levine *et al.*, 1998; Kovalchuk *et al.*, 2002).

La combinación de estos factores, la liberación de más neurotransmisor en la presinapsis y la activación de canales NMDA en la postsinapsis podrían llevar al incremento de la transmisión generado por la NT-3 (Alder, 2005; Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2013).

Al igual que en condiciones control en el modelo de 3-NP se observa un incremento en la modulación sináptica pero de menor grado. Recordemos que en la HD se lleva a cabo una

desconexión de la corteza además de la reducción del árbol dendrítico y muerte neuronal podrían ser algunas de las causas por las cuales se muestra la diferencia.

En el HD se ha encontrado un aumento en el ácido láctico cerebral y un decremento de la actividad de succinato deshidrogenasa llevando a una inestabilidad energética que agota los reservorios de ATP deteriorando al potencial de membrana, bajo estas condiciones el  $Mg^{2+}$  que bloquea los receptores NMDA es liberado (Gu *et al.* 1996; Beal *et al.* 1993).

Los receptores NMDA (NMDAR) son receptores inotrópicos de glutamato (iGluR) y en las MSN's se han encontrado principalmente NMDAR tipo GluN2B, estos receptores han sido ligados con vías de muerte celular. Este tipo de receptores se encuentran extra sinápticos (ExNMDAR) mostrando una actividad opuesta a CREB promoviendo la apoptosis y la entrada de calcio además de señales de muerte mediadas por JNK-MAPKs siendo la httm la que como resultado de la alteración de la proteína de densidad postsináptica (PSD-95) provoca la inestabilidad de NMDAR sinápticos mientras que por una vía de Calpain-calceurina activan fosfatasa enriquecidas en tirosina (STEP por sus siglas en inglés) que defosforilan el residuo 1472 de los NMDAR GluN2B reduciendo su expresión y promoviendo su difusión lateral (Cepeda *et al.*, 2007; Reymond, 2011).

También se ha reportado que CREB regula la Transcripción de BDNF una neurotrofina importante en la sobrevivencia de las neuronas (Tao *et al.*, 1998).

En nuestro modelo con 3-NP esto podría ser analogado, como se mencionó antes se ha encontrado afectaciones mitocondriales que llevan a déficits energéticos que desencadenan el cambio en el potencial de membrana y la despolarización que a su vez índice el desbloqueo de NMDAR, estos mismos mecanismos se expresan en el modelo de 3-NP produciendo una inhibición del complejo II mitocondrial y causando el mismo desbalance en la membrana y sus consecuencias antes descritas (Beal *et al.*, 1993; Ahuja, 2007; Calabresi *et al.*, 2001; Dalben *et al.*, 2005; Bonsi, 2006) además de muerte y apoptosis por inhibición de este complejo.

Estos eventos combinados, la muerte de neuronas por excitotoxicidad y la activación de canales NMDA con la subunidad GluN2B que modulan a CREB podrían una ser la posible causa de la reducción de la potenciación de S1 en nuestros registros.

### **Endocannabinoides y su papel en la LTD en presencia de NT-3**

Como se ha mencionado se cree que la base del almacenamiento de la información son las adaptaciones en las respuestas sinápticas a largo plazo como es en el caso de los ganglios basales (GB) y en específico del estriado, la plasticidad sináptica especialmente la depresión a largo plazo (LTD) que es la forma de adaptación más común encontrada en GB toma un papel importante en la transferencia de información a las estructuras de los ganglios basales por parte de la corteza.

El estriado contiene dos vías principales: la vía indirecta y la vía directa, dada la naturaleza del experimento (registro de campo) la respuesta observada es la suma de ambas, aunque se han encontrado diferencias entre los mecanismo que desencadenan LTD en una vía y en otra, dado por las diferencias en los receptores de las MSN's en las diferentes vías.

Bastante se ha analizado este fenómeno y aún que no se ha descubierto todo, se ha encontrado que se involucran tanto la presinapsis como la postsinapsis.

En la postsinapsis se han encontrado la activación de canales de calcio dependientes de voltaje en especial los Cav1.3 y receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) además de la activación de receptores de endocannabinoides (CB1) en la presinapsis aunque su producción se atribuye al postsinapsis y se cree está bajo una vía dependiente del receptor a dopamina D1 (Revisado en Dupuis, *et al.*, 2014).

También se ha sugerido la participación de interneuronas que cuando se activa su receptor a dopamina D5 las llevá a óxido nítrico (NO) el cual se difunde por la membrana de las MSN's y activa a las guanilato ciclasas (sGC), esta también se cree segregan endocannabinoides (Revisado en Dupuis *et al.*, 2014).

Estos endocannabinoides han sido implicados en las plasticidades de diversas partes del cerebro como hipocampo, cerebelo y estriado y funcionan como mensajeros retrógrados que son expulsados a la hendidura sináptica y recibidos en la presinapsis, activando CB1 y reduciendo la cantidad de neurotransmisor liberado (Revisado en Wickens, 2009).

Los receptores a dopamina D2 también tienen participación al bloquear a la adenil ciclasa (AC) llevando a un decremento en la actividad de PKA. (Revisado en Dupuis *et al.*, 2014).

Mientras que en presencia de NT-3 este LTD si bien siguió mostrándose este fue menor, es decir la liberación y/o recepción de neurotransmisor fue mayor.

Esto principalmente se deba a los mecanismos mencionados anteriormente por los cuales la NT-3 puede modular positivamente y contrastados con estos mecanismos se puede suponer una reducción en la LTD.

Anteriormente se mencionó como la NT-3 puede estimular a los NMDAR y hacer que la probabilidad de apertura sea mayor, esta sensibilidad incrementa la entrada de calcio que junto con las cascadas generadas por su Trk especialmente PI-3K e IP-3 que se ha demostrado que son esenciales para la potenciación sináptica.

También antes se ha descrito que la NT-3 puede inhibir a los receptores GABA<sub>A</sub> los cuales tienen un papel en la generación de LTD al ser inhibitorios (Kim *et al.*, 1994).

Las rutas antes mencionadas modulan la sinapsis se ha reportado que para que los efectos sean a largo plazo es necesario la traslación de proteínas por medio de la vía de Akt esta vía es activada por PI3K que cuando el receptor Trk es endocitado se ve favorecida. Akt activa una serie de efectores involucrados en la síntesis de proteínas, entre ellos se encuentra mTOR una cinasa que inicia la translación de proteínas. Otro efector activado por Akt es la glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) que mediante su fosforilacion e inactivación por Akt incrementa la actividad del factor de intercambio eIF-2B y este promueve el reclutamiento de tRNA al ribosoma (Je *et al.*, 2005; Je, 2011).

Esto nos indica que a pesar de los diversos mecanismos provistos por las interneuronas y el control retrogrado de las sinapsis estriatales sobre las sinapsis corticales que generan LTD la NT-3 podría estar disminuyendo este efecto por diversos mecanismos a largo plazo.

### **LTP en 3-NP y el efecto de la NT-3 en ella**

Lo contrario a un LTD es una potenciación a largo plazo o LTP lo cual sucede en estriado cuando está dañado, con anterioridad se mencionó las características de cómo se encuentran las neuronas en la HD.

Este LTP no es malo por sí solo, también es parte importante de modificaciones sinápticas necesarias para la memoria, el problema reside en la sobre estimulación que esto presenta para las sinapsis en la condición que se encuentran.

Se ha descrito a los NMDAR con un papel principal en la potenciación a largo plazo ya que este receptor permite la entrada de calcio al unirse a glutamato proveniente de la corteza y recluta receptores glutamatergicos no NMDA, llamados AMPA quienes despolarizan la membrana, también se ha descrito la participación de CaMKII. Las MSN's tienen un mecanismo para prevenir esto, como se ha explicado antes estas tienen diversos métodos inhibitorios con mensajeros retrógrados los cuales disminuye la secreción de glutamato haciendo que sean menos los canales activados (Malenka y Bear, 2004).

También los Receptores a Dopamina D1 han sido involucrado con la generación de LTP dado que estos receptores activan adenil ciclasa (AC) que a su vez activa a PKA y esta fosforila a DARPP-32, una fosfoproteína abundante en las MSN's, esta se fosforilan en el residuo Thr34 esto ocasiona la inhibición de la proteína fosfatasa 1 (PP1) la cual está asociada con procesos de LTD favoreciendo al LTP. Aun que se ha descrito que si DARPP-32 es fosforilada en otro residuo (Thr75) por Cdk5 este puede inhibir PKA (Miranda-Barrientos *et al.*, 2014). Por otro lado hay estudios en los que se señala la fosfatasa 2A (PP2A) puede des fosforilar Thr75 inhibiendo la inhibición de PKA (Revisado en Nair *et al.*, 2014).

PP2A y PP2B (este último es la fosfatasa encargada de activar Cdk5) son activadas por calcio, pero con la diferencia de que a bajos niveles de calcio es activada PP2B y a concentraciones altas es PP2A la que se activa (Revisado en Nair *et al.*, 2014).

Así que con esto y con lo antes descrito en lo que respecta al HD podemos asociar el desgaste mitocondrial que afecta el potencial de membrana haciendo más sensibles a los NMDAR y a los AMPAR con el glutamato, llevando a una entrada masiva de calcio; además de los reservorios internos podría estar favoreciendo la desfosforilación de DARPP-32 por tanto incrementando PKA mostrando una LTP que aun que las aferencias corticales se dañen se sigue mostrando por la sensibilización de las MSN's.

Sin embargo, en presencia de NT-3 este efecto se revierte mostrándose una LTD otra vez y aunque en este trabajo se ha mencionado que la NT-3 tiene atribuidas diversas vías por las cuales puede incrementar la amplitud, también se observó que después de un tren en condiciones normales no genera LTP, se mantiene una LTD característica del estriado. Esto nos habla de la habilidad de la NT-3 de restablecer la plasticidad en condiciones anormales aunque en menor grado; además de la existencia de diversos estudios demostrando su habilidad para modificar a la sinapsis.

Se ha estudiado las vías de las MAPK para la activación de moléculas de adhesión celular (CAMs por sus siglas en ingles) para que estas posteriormente modifiquen botones sinápticos, además de MAPK también se ha encontrado Rap1 activando CAMs. De igual manera se ha visto que NT-3 puede estimular al factores de transcripción CREB; como se ha explicado antes, también es posible la activación de Adf1 otro factor de transcripción activado por MAPK que ha demostrado promover el desarrollo de la morfología sináptica (Je *et al.*, 2006).

Otra vía poco estudiada en su efecto sobre la NT-3 es la NF- $\kappa$ B que promueve la sobrevivencia de neuronas y bloquea la apoptosis y se ha visto activada por NT-3 en las neuronas de los ganglios espirales (Vandenbosch *et al.*, 2013). Y no solo en los ganglios espirales también en el grupo dorsal respiratorio (por sus siglas en ingles DRG), NG e hipocampo, en neuronas dopaminérgicas y en motoneuronas se han observado crecimiento



de neuritas, modificación en las sinapsis y sobrevivencia gracias a la NT-3 (Revisado en Skup, 1994).

Dado que una de las causas de la muerte celular en la HD es por apoptosis probablemente la NT-3 podría estar frenando la acción de factores apoptóticos. Además de todos estos probables mecanismos no podemos descartar la naturaleza de la NT-3 con los demás receptores Trk ya que se ha reportado que TrkB es altamente activado por NT-3 casi al mismo nivel que activa TrkC y son activados solo 1 minuto después de su aplicación (Zhang *et al.*, 2011).

Al activar TrkB se pueden activar vías que activaba BDNF o sinergizarse con las activadas por NT-3 y ayudar en cambios morfológicos reportados en neuronas con DARP-32 y neuronas GABAérgicas (Ventimiglia *et al.*, 1995; Ivkovic *et al.*, 1997).

Aunque los procesos de modificación podrían ser la principal causa del regreso del LTD se tendrán que revisar las distintas vías que se desencadenan en este proceso, ya sea por coactivación de más receptores Trk o incluso P75 desencadenando procesos de sobrevivencia esto abre el paso a nuevas investigaciones.

Concluyendo, se ha estudiado los mecanismo por los cuales las neurotrofinas logran modular la transmisión sináptica por diferentes mecanismos pero poco se ha estudiado de estos mecanismo en condiciones de daño, no solo en la transmisión sino en procesos plásticos a largo plazo, ya que si bien estos parecen ayudar a la LTD tendríamos que bloquear las vías para poder dilucidar que mecanismo es el que está participando.

## Conclusiones

- En el presente trabajo se encontró que la aplicación de la neurotrofina NT-3 modula la transmisión sináptica glutamatérgica cortico estriatal positivamente. Mostrando un incremento en la amplitud de los potenciales poblacionales, mediante mecanismos tanto presinápticos como postsinápticos de sensibilización de receptores y de aumento en la secreción de neurotransmisores por vías PI3K e IP3 activando CaM-KII.
- Se probó la plasticidad generada en la HD corroborando el uso del modelo farmacológico y los procesos excitotóxicos.
- La modulación de la plasticidad a largo plazo por la neurotrofina NT-3 en sinapsis cortico estriatales. Siendo vías MAPK, PI3K y la desensibilización de los receptores NMDA además de reclutar proteínas mTOR posibles opciones para la fusión de vesículas las posibles responsables de esta reducción de LTD.
- Y finalmente que la presencia de la neurotrofina NT-3 puede generar LTD en un modelo de neurodegeneración por mecanismos aún por dilucidar.

## Bibliografía

Ahuja M., Chopra. K., 2007, Inflammatory and Neurochemical Changes Associated with 3-Nitropropionic Acid Neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18:335–339, 2008.

Alder J., Thakker-Varia S., Crozier R.A., Shaheen A., Plummer M.R., Black I.B., 2005, Early presynaptic and late postsynaptic components contribute independently to brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity. *J Neurosci* 25:3080–3085.

Graybiel, A.M., 1990, Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *TINS*, 13 (7): 240-253.

Beal M.F., Brouillet E., Jenkins B.G., 1993, Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci*, 13: 4181-4192.

Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasu M.A., Greenberg M.E., 1999, Cell survival promoted by the Ras-MAPK Signaling pathway by transcription-dependent and independent mechanisms. *Science*, 286:1358-1362.

Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., Greenberg M.E., 1999, Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, 96:857-868.

Bonsi P., Cuomo D., Martella G. Sciamanna G., Tolu M., Calabresi P., Bernardi G., Pisani A., 2006, Mitochondrial toxins in basal ganglia disorders: from animal models to therapeutic strategies. *Current Neuropharmacology* 4:69-75.

Calabresi, P., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Pisani, A., Bons, P., Greengard, P., Hpskind, R.A., Borrelli, E., Bernardi, G., 2001, Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J. Neurosci.* 21, 5110-5129

Cepeda C., Raymond S., Calvert H.C.R., Hernández-Echeagaray H., Nguyen O.K., Jocoy E., Christian L.J., Ariano M.A., Levine M.S., 2003, Transient and Progressive Electrophysiological Alterations in the Corticostriatal Pathway in a Mouse Model of Huntington's Disease. *J. Neurosci.*, 1; 23:961-9.

Cepeda C., Wu N., André V.M., Cummings D.M., Levine M.S., 2007. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology* 81:253-271.

Cowan M.W., Jessell T.M., Zipursky S.L., 1998, Molecular and Cellular Approaches to Neural Development. U.S.A. *Oxford University Press*.

Dalbem A., Silvera C.V., Pedroso M.F., Breda R.V., Werne-Baes C.V., Bartmann A.P., da Costa J.C, 2005, Altered distribution of striatal activity-dependent synaptic plasticity in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res.* 1047, 148-158.

Debanne D., Guerineau N.C., Gähwiler B.H., Thompson S.M., 1996, Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The journal of physiology*, 491(1), 163-176.

Dechant G., Barde Y.A., 2002, The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci.* 5:1131-1136.

Do J., Kim J., Bakes J., Lee K., Kaang B., 2014, Functional roles of neurotransmitter receptors and neuromodulators in the dorsal striatum. *Journal of learning and memory.* 20:21-28.

Dupuis J.P., Bioulac, B.H., Baufreton J., 2014, Long-term depression at distinct glutamatergic synapses in the basal ganglia DOI 10.1515/revneuro-2014-0024.

Ehrlich M.E., 2012, Huntington's disease and striatal medium spin neuron: cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of disease. *Neurotherapeutics.* 9: 270-284.

Espíndola S., Vilches Flores A., Hernandez-Echeagaray E., 2012, 3-Nitropropionic acid modifies neurotrophin mRNA expression in the mouse striatum: 18s-rRNA is a reliable control gene for studies of the striatum. *Neurosci. Bull* 28(15).

Finkbeiner S., Tavazoie S.F., Maloratsky A., Jacobs K.M., Harris K.M., Greenberg M.E., 1997, CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19:1031-1047.

Gentry J.J., Barker P.A., Carter B.D., 2004, The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog Brain Res*, 146:25-39.

Gomez-Palacio-Schjetnan A., Escobar L. 2013, Neurotrophins and Synaptic Plasticity *Curr. Topics Behav Neurosci.* 15:117-136.

Gu M., Gash M.T., Mann V.M., 1995, Mitochondrial defect in Huntington's Disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39: 385-389.

He X., Yang F., Xie Z., Lu B., 2000, intracellular Ca<sup>2+</sup> and Ca/calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *The Journal of Cell Biology*, vol. 149, 738-791.

Hernandez-Echeagaray E., De la Rosa Lopez 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*, 347 – 360.

Hernández-Echeagaray E., 2004, Avances sobre la neurobiología de la enfermedad de Huntington, *Temas selectos de neurociencias*, 33-40.

Hernandez-Echeagaray E., 2010, Advances in the neurobiology of Huntington's disease, *Research singpost*, 37/661.

Holgado-Madruga M., Moscatello D.K., Emler D.R., Dieterich R., Wong A.J., 1997, Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol-3-OH kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor, *Proc Natl Acad Sci, USA* 94:12419-12424.

Hyun Soo J., Zhou J., Yang F., Lu B., 2005, Distinct mechanisms for neurotrophin-3-induced acute and long-term synaptic potentiation. *Journal of neuroscience*, 25(50).

Ivkovic S., Polonskaia O., Fariñas I., Ehrlich E., Brain-derived neurotrophic factor regulates maturation of the DARPP-32 phenotype in striatal medium spiny neurons: studies in vivo and in vitro. *Neuroscience*, 1997;79: 509-516.

Johnston D., Wu S.M.S., 1995, Foundations of cellular neurophysiology. Cambridge: *MIT press*. pp. 392-395.

Jhonston D., Miao-Sin W.S., 1995, Foundations of cellular neurophysiology. *MITPMSS*. USA.

Je H.S., Yang F., Zhou J., Lu Bai., 2006, Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms. *The Journal of Cell Biology*. vol. 175.

Je H.S., Zhou J., Yang F., Lu Bai., 2006, Distinct Mechanisms for Neurotrophin-3-Induced Acute and Long-Term Synaptic Potentiation. *The Journal of Neuroscience* 25(50):11719-11729.

Je, S.H., Ji Y., Wang Y., Ying F., Yang F., Wu W., Lu Bai., 2011, Presynaptic protein synthesis required for NT-3-induced long-term synaptic modulation. *Molecular Brain* 4:1.

Kang H., Schuman E.M., 1995, Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267:1658–1662.

Kaczmarek L.K., Levitan I.B., 1987, Neuromodulation: the biochemical control of neuronal excitability. U.S.A. *Oxford University Press*.

Katz, B., Miledi, R., 1968, The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of physiology*, 195(2), 481-492.

Katsuma N., Tetsuro K., Tomonari T., Hiroshi U., 2000, Neural circuits and functional organization of the striatum, k 275 (5).

Kandel, E., R., Schwartz, J., H., Jessell T., M., (1998). *Neurciencia y Conducta* España. Prentince Hall.

Kim, H., G., Wang, T., Olafsson, P., Lu, B., 1994. Neurotrophin 3 potentiates neuronal activity and inhibits  $\gamma$ -aminobutyrategic synaptic transmission in cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12341-12345.

Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW, Konnerth A (2002) Postsynaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation. *Science* 295:1729 –1734.

Kumar S., Kahn M.A., Dinh L., de Vellis J., 1998, NT-3-mediated TrkC receptor activation promotes proliferation and cell survival of rodent progenitor oligodendrocyte cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res.* Dec 15;54(6):754-65.

Lad S.P., Neet K.E., 2003, Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway through p75NTR: a common mechanism for the neurotrophin family. *J Neurosci Res*, 73:614-626.

Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing *N*-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10235–10239.

Lohof AM, Ip NY, Poo MM (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363:350–353

Malenka, C., R., Bear, M.,F., 2004. LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. *Neuron* 44:5-21.

Maruyama I., 2014, Mechanisms of activation of receptor Tyrosine Kinases: Monomers or dimers, *Cell's*, 3, 304-330.

Middleton G., Hamanoue M., Enokido Y., Wyatt S., Pennica D., Jaffray E., Hay R.T., Davies A.M., 2000, Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol*, 148:325-332.

Miranda-Barrientos J, Nieto-Mendoza E and Hernandez-Echeagaray E (2014) The Cdk5 inhibitor Roscovitine increases LTP induction in corticostriatal synapses. *ASN NEURO* 6(2):art:e00140.doi:10.1042/AN20140006

Mu Ming P., 2001, Neurotrophins as synaptic modulators, Department of molecular and cell Biology. Macmillan Magazines. Vol 2, 24-32.

Nair, A.,G., Guitierres-Arenas, O., Eriksson O., Jauhiainen, A., Blackwell, K., T., Kotaleski, J., H., 2014. Modeling Intracellular Signaling Underlying Striatal Function in Health and Disease. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 123:277-298.

Nykjaer A., Willnow T. E., Petersen C. M., 2005, p75<sup>NTR</sup> – live or let die Current Opinion in Neurobiology, 15:49-57

Parent, A., Sato, F., Wu, Y., Gauthier, J., Lévesque M., Parent M., 2000, Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. Trends Neurosci. (Suppl.), 23 (10): S20-S27.

Patapoutian A., Reichardt L. F., 2001, Trk receptors: mediators of neurotrophin action, Current Opinion in Neurobiology, 11:272–280.

Paul J., Gottmann K., Lessmann V., 2001, NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. Neuro Report. Volume 12 - Issue 12 - pp 2635-2639.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O. & Williams, S. M. (2004). Neuroscience (3rd ed.). U.S.A. Sinauer Associates.

Rangone H., Humbert S., Saudou F., 2003, huntington's disease: how does huntingtin, an anti-apoptotic protein, become toxic?, Phatologie Biologie 52: 338-42.

Raymond L. A., André V. M., Cepeda C., Gladding C.M., Milnerwood A. J., Levine M. S., 2011, Pathophysiology of huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. Neuroscience 198: 252-273.

Ramos-Languren L. E, Escobar M. L, 201.) Plasticity and metaplasticity of adult hippocampal mossy fibers induced by Neurotrophin-3. EJN. Vol. 37 128-1259.

Ramos-Lamguren, L.,E., Escobar M., L., 2012. Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. European Journal Of Neuroscience 1-12.

Riccio A., Ahn S., Davenport C.M., Blendy J.A., Ginty D.D., 1999, Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons, *Science*, 286:2358-2361.

Riedman W. J., Ernfors P., Persson H., 1991, Transient and persistent expression of NT-3/HDNF mRNA in the rat brain during postnatal development. J Neurosci 11:1577–1584.

Roux P., P., Barker P., A., 2002, Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor, *Progress in Neurobiology* 67 203–233.

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

Simi S., Ibañez C., Assembly and activation of neurotrophic factor receptor complexes, 2009, *Developmental Neurobiology*, 323-331

Skup, M., H., 1994, BDNF and NT-3 widen the scope of neurotrophin activity: pharmacological implications. *Acta Neurobiol.* 54:81-94.

Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz A. J., Greenberg, M., E., 1998, Ca<sup>2+</sup> Influx regulates BDNF Transcription by a CREB Family Transcription Factor-Dependent Mechanism. *Neuron*, Vol., 20; 709-726.

Tepper J. M. y Plenz D., Microcircuits in the striatum. Striatal cell types and their interaction.

Tyler W. J., Perrett S. P., Pozzo-Miller L. D., 2002, The role of neurotrophins in neurotransmitter release. *Neuroscientist* 8:524–531.

Urfer R., Tsoulfas P., O'Connell L., Hongo J., Zhao W., Presta L. G., 1998, High Resolution Mapping of the Binding Site of TrkA for Nerve Growth Factor and TrkC for Neurotrophin-3 on the Second Immunoglobulin-like Domain of the Trk Receptors *J. Biol. Chem.* 273:5829-5840.

Vandenbosch, R., Chocholova, E., Robe, P., A. Wang, Y., Lambert, C., Moonen, G., Lallemand, F., Malgrange, B., Hadjab, S., 2013, A role for the canonical nuclear factor-κB pathway in coupling neurotrophin—induced differential survival of developing spiral ganglion neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 7(242)1-10.

Ventimiglia R., Mather P.E., Jones B.E and Lindsay R.M. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons. *Eur. J. Neurosc.*, 1995;7: 213-222.

Walker F. O., 2007, Huntington's disease, *Lancet* 369:218-28.

Wickens, J.,R., 2009, Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behavioural Brain Research* 199:119-128.



Xing J., Kornhauser J.M., Xia Z., Thiele E.A., Greenberg M.E., 1998, Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 18:1946-1955.

York R., D., Mollivar D., C., Grewal S., S., Steinberg P., E., McCleskey E., W., 2000, Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in NGF induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 20:18069-18083.

Zhang H. T., Li L. Y., Zou X. L., Song X. B., Hu Y. L., Feng Z. T., Wang T. T., 2007, Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J Histochem Cytochem* 55:1–19.

Zhang, G., Dinhardt, K., Chao, M., V., Neubert T., A., 2011, Study of neurotrophin 3 signaling in primary cultured neurons using multiplex stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *J Proteome Res.* 10(5):2546-2554.