



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO PROTECTOR DEL ÁCIDO CAFÉICO EN UN
MODELO DE NEURODEGENERACIÓN ESTRIATAL DE LA
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

CECILIA SARAI CASTILLO CHÁVEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEGARAY



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México,
2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y de manera particular a la FES Iztacala, porque en sus espacios se me brindó la oportunidad de recibir, día con día, una formación académica de gran valor y calidad.

A la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray por aceptarme en su laboratorio y brindarme la confianza para la elaboración de este proyecto, así como también, por la buena disposición que mostró en todo momento para aclarar mis preguntas. Indudablemente, tiene mi completa admiración, respeto y cariño.

Al M. en C. Ernesto Mendoza Duarte por todas sus enseñanzas, apoyo y paciencia, así como también por su gran calidez como persona.

A mis compañeros Vic, Bele, Alam, César y Liz, por sus apreciables consejos y apoyo en la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Jose Guillermo Ávila Acevedo y a la Dra. Ana María García Bores, por haber proporcionado parte del ácido caféico que se empleó en la elaboración de este proyecto, así como también por dedicar su tiempo a la revisión y corrección de este proyecto.

A la Dra. Bertha Segura Alegría y al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas por aceptar ser mis sinodales, así como por la revisión y retroalimentación que realizaron sobre el presente trabajo.

A la M. en C. Josefina Vázquez Medrano y a la Dra. Martha Martínez García por sus valiosos consejos, enseñanzas y por permitirme en algún momento formar parte de sus equipos de trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres Felisa y Samuel, a quienes amo y admiro profundamente. Siempre les estaré muy agradecida por impulsarme a seguir mis metas y a confiar en mí misma, pero sobre todo por enseñarme a disfrutar de todos los matices de la vida.

A mis hermanos Oscar y Osvaldo, quienes me han cuidado y querido desde que este mundo me recibió. Gracias por todas sus enseñanzas, paciencia y los momentos compartidos, son una de mis más grandes inspiraciones.

A mis abuelas Came y Herlinda, dos mujeres a quienes siempre tengo presentes en mi corazón, y me gusta pensar que desde otro plano comparten mis alegrías.

A mis sobrinos Josita, Emi y Mayis, quienes con sus risas, ocurrencias y travesuras hacen mis días más bonitos, los amo.

A Daniel, el más extraordinario ser que pude haber encontrado, gracias por motivarme y llenar de amor y alegría mis días.

A Ale y Denise, es sumamente grato que formen parte de mi familia, les agradezco mucho su cariño y consejos.

A mis amigos Natalie y Uriel, los mejores compañeros de aventuras que pude haber tenido durante la carrera, sin duda alguna atesoró cada risa, caída y charla con ustedes.

A Marlen, Jessy, Ame, Aaron, Betsa, Yuri, Digi, Óscar, Lalo, Brenda y Darío, quienes además de ser personas grandiosas, me han brindado su amistad y apoyo incondicionalmente.

A mis compañeros del L-6, Neto, Bele, Vic, Paco, Daniel, César, Alam, Liz, Ricardo y Edgar, por hacer de mi estancia en el laboratorio una magnífica experiencia.

“-¿Por qué quíeres ser libre, Andrew?, ¿En qué sentido es importante para ti?

-¿Desearía usted ser esclavo, señoría?

-Pero no eres esclavo. Eres un buen robot, un robot genial, por lo que me han dicho, capaz de expresiones artísticas sin parangón. ¿Qué más podrías hacer si fueras libre?

-Quizá no pudiera hacer más de lo que hago ahora, señoría, pero lo haría con mayor alegría. Creo que sólo alguien que desea la libertad puede ser libre. Yo deseo la libertad.”

Isaac Asimov

“No debo buscar mi dignidad en el espacio, si no en el gobierno de mi pensamiento. No tendré más aunque posea mundos. Si fuera por el espacio, el universo me rodearía se me tragaría como un átomo; pero por el pensamiento yo abrazo el mundo”

Blaise Pascal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Ganglios basales	5
1.1.1. Núcleo estriado	6
1.2. Enfermedad de Huntington (EH)	9
1.2.1. Modelo Farmacológico de la EH.....	11
1.3. Transmisión sináptica	13
1.3.1. Modulación sináptica	14
1.4. Factores neurotróficos/Neurotrofinas	15
1.4.1. Receptores a neurotrofinas	16
1.4.2. Vías de señalización activadas por neurotrofinas	18
1.4.2.1. MEK/ERK.....	19
1.4.2.2. PI3K/AKT	19
1.4.2.3. PLC γ 1/PKC.....	19
1.4.3. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	20
1.4.3.1. Papel y/o alteraciones de BDNF en la EH y en el modelo farmacológico de la EH	21
1.5. Antioxidantes	21
1.5.1. Ácido caféico	22
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Fármacos.....	27
5.2. Animales y tratamiento.....	27
5.3. Obtención del tejido cerebral.....	28
5.4. Registro electrofisiológico	28
5.5. Modulación de BDNF	29
5.6. Análisis de los resultados.....	29
6. RESULTADOS	31
6.1. La amplitud de la RSP1 varía según el grupo de tratamiento.....	31

6.2. La amplitud de la RSP1 se mantiene estable durante el transcurso de los experimentos	32
6.3. Modulación de BDNF en los grupos Control y 3-NP	32
6.4. Modulación de BDNF en el grupo AC-5	37
6.5. Modulación de BDNF en los grupos de pretratamiento con AC (PreAC/3-NP) y de co-tratamiento con AC y 3-NP (AC/3-NP)	39
7. DISCUSIÓN	45
7.1 Efecto protector del AC en la transmisión sináptica corticoestriatal	45
7.2 Efecto modulador de BDNF	49
8. CONCLUSIONES	53
APÉNDICE 1: ALTERACIÓN DE LA VÍA CORTICOESTRIATAL EN LA EH	54
APÉNDICE 2: PROTOCOLO POR PULSO PAREADO	55
APÉNDICE 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	56
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de neuronas presentes en el núcleo estriado.....	7
Figura 2. Diagrama de las vías directa e indirecta del circuito corticoestriatal.....	8
Figura 3. Alteraciones intracelulares producidas por el 3-NP.....	13
Figura 4. Receptores a neurotrofina.....	17
Figura 5. Vías de señalización activadas por neurotrofinas.....	18
Figura 6. Estructura química del ácido caféico (AC) o ácido 3,4-dihidroxicinámico.....	22
Figura 7. Esquema de tratamientos aplicados a cada uno de los grupos experimentales.....	27
Figura 8. Curvas intensidad-amplitud obtenidas de los diferentes grupos de tratamiento.....	31
Figura 9. Registros control de los diferentes grupos de tratamiento.....	32
Figura 10. Efecto moduladorio diferencial de BDNF (20ng/ml) sobre la actividad sináptica corticoestriatal en el grupo Control.....	33
Figura 11. Cambios en la amplitud de la RSP1 y en el PPR en los diferentes subgrupos identificados en el grupo Control.....	35
Figura 12. Efecto moduladorio de BDNF (20ng/ml) en el grupo 3-NP.....	36
Figura 13. Modulación de BDNF (20ng/ml) sobre la actividad sináptica corticoestriatal en el grupo AC-5.....	38
Figura 14. Modulación diferencial de BDNF (20ng/ml) sobre RSP corticoestriatal en el grupo PreAC/3-NP.....	40
Figura 15. Efecto moduladorio diferencial de BDNF (20ng/ml) sobre la actividad sináptica corticoestriatal en el grupo AC/3-NP.....	42
Figura 16. Cambios en la amplitud de la RSP1 y en el PPR en los diferentes subgrupos identificados en el grupo AC/3-NP.....	43
Figura 17. Comparaciones múltiples de la amplitud de la RSP1 tras la adición de BDNF (20ng/ml) en los diferentes grupos de tratamiento.....	44
Figura 18. Alteración de la vía corticoestriatal en la EH.....	54

ABREVIATURAS

3-NP: Ácido 3-nitropropiónico

5-LO: 5-lipooxigenasa

AC: Ácido caféico

AChE: Acetilcolinesterasa

AKT: Proteína cinasa B

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AQ: Ácido quinolínico

ATP: Adenosín trifosfato

A β : Proteína β amiloide

BChE: Butirilcolinesterasa

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CAG: Triplete citosina-adenina-guanina

CAPE: Ácido caféico fenetil éster

CAT: Catalasa

CGA: Ácido clorogénico

ChAT: Colina acetiltransferasa

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc

CUMS: Estrés leve crónico

DAG: Diacilglicerol

EH: Enfermedad de Huntington

ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares

FAD: Flavín-adenín-dinucleótido

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

Gab-1: Grb2-associated binder-1

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GB: Ganglios basales

GNDF: Factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales

GP: Globo pálido

GPe: Globo pálido externo

GPI: Globo pálido interno

GPX: Glutación peroxidasa

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GSH: Glutación

Htt: Huntingtina

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IL-10: Interleucina-10

IL-1 β : Interleucina-1beta

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IP3: Inositol tri-fosfato

IRS-1: Sustrato 1 del receptor de insulina

JNK: Cinasa N-terminal Jun

Kir: Canales de K⁺ rectificadores entrantes

LPS: Lipopolisacárido

LTP: Potenciación a largo plazo

MEK: Proteína activada por mitógenos

m-Htt: Huntingtina poliglutaminada

mRNA: RNA mensajero

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

NEMs: Neuronas espinosas medianas

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear κ B

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NT-3: Neurotrofina 3

NT-4/5: Neurotrofina 4/5

p75NTR: Receptor a neurotrofinas p75

PGC-1 α : Peroxisoma proliferador activado del receptor- γ co-activador 1 α

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa

PKC: Proteína cinasa C

PLC- γ : Fosfolipasa C gamma

PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisoma

PPD: Depresión por pulso pareado

PPF: Facilitación por pulso pareado

PPP: Protocolo por pulso pareado

PPR: Relación por pulso pareado

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RSP: Respuesta sináptica poblacional

SDH: Succinato deshidrogenasa

SN: Sustancia nigra

SNc: Sustancia nigra pars compacta

SNr: Sustancia nigra pars reticulata

SOD: Superóxido dismutasa

SOS: Son of Sevenless

STN: Núcleo subtalámico

STZ: Estreptozotocina

TFIID: Factor de transcripción II D

TFIIF: Factor de transcripción IIF

TGF β -1: Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Trk: Receptor tirosina-cinasa

RESUMEN

La Enfermedad de Huntington es un padecimiento neurodegenerativo hereditario, que afecta principalmente a las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado. Para el estudio de los mecanismos involucrados en esta enfermedad, se ha empleado el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), una toxina mitocondrial que imita las alteraciones bioquímicas, celulares y el fenotipo conductual de la EH.

En el presente trabajo se evaluó *in vivo* la actividad neuroprotectora del ácido caféico (AC) ante la intoxicación con 3-NP. Mediante la obtención de registros electrofisiológicos extracelulares, se evaluó la respuesta glutamatérgica corticoestriatal, así como la actividad moduladora del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) a una baja concentración, en tejido proveniente de ratones C57BL/6 que recibieron distintos esquemas de tratamiento con el AC y el 3-NP.

Los resultados muestran, que el AC por sí solo genera un incremento en la respuesta glutamatérgica corticoestriatal, más no altera la modulación de BDNF. Mientras que, el AC al ser aplicado como agente preventivo de la toxicidad generada por el 3-NP, mostró mantener la actividad de la respuesta sináptica glutamatérgica similar a la observada en condiciones control; así como también mantuvo la actividad moduladora de BDNF, incluso a una baja concentración de la neurotrofina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ganglios basales

Los ganglios basales (GB) o núcleos subcorticales, son un conjunto de estructuras cerebrales estrechamente conectadas que se extienden desde la base del telencéfalo, a través de la porción central del diencefalo, hasta el tegmento del mesencéfalo (Nieuwenhuys *et al.*, 2009). Su función ha sido principalmente atribuida al control del movimiento, sin embargo, se ha señalado que los GB participan de manera importante en los aspectos condicionales de los movimientos tales como la planificación, la selección de programas y la memoria motora (Haber, 2016; Graybiel, 1990).

Los GB comprenden cuatro núcleos principales: el estriado, el globo pálido (GP), el núcleo subtalámico (STN) y la sustancia nigra (SN). El núcleo estriado, se compone de dos núcleos: el núcleo caudado y el putamen; el GP se subdivide en dos partes, la externa e interna (GPe y GPi, respectivamente); mientras que la SN comprende dos núcleos separados: el pars compacta (SNc) y el pars reticulata (SNr) (Kandel *et al.*, 2013).

Por un lado, las principales aferencias de los GB provienen de la corteza cerebral y el tálamo, aunque también de la amígdala; la mayor parte de estas entradas arriban al neostriado (compuesto por el núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens); mientras que las eferencias de estos núcleos incluyen a estructuras dentro y fuera de los GB (Yelnik, 2002; Shepherd, 2003).

Se sabe que el neostriado proyecta a tres estructuras: el GPi, el GPe y la SNr. Tanto el GPi y la SNr son consideradas las principales estructuras de salida de los GB, éstas proyectan al tálamo, al núcleo habernular lateral y a capas profundas del colículo superior; mientras que estructuras como el GPe y la SNc (que proyectan principalmente al STN y al estriado, respectivamente) son consideradas como parte del circuito intrínseco de los GB (Kandel *et al.*, 2013; Shepherd, 2003). Debido a la conectividad y la funcionalidad de los ganglios basales, su sistema se subdivide de manera frecuente en tres territorios funcionales: el sensorimotor, el asociativo y el límbico. El territorio sensorimotor, que incluye al putamen, proyecta de regreso a las cortezas motoras (corteza motora primaria, área motora suplementaria y corteza premotora); el territorio asociativo, que comprende al núcleo caudado dorsal, proyecta a la corteza prefrontal; y el territorio límbico que involucra al núcleo estriado ventral, proyecta hacia la corteza cingulada anterior y las cortezas orbitofrontales mediales (Yelnik, 2002).

1.1.1. Núcleo estriado

El núcleo estriado es la estructura de entrada principal de los GB, a la cual llegan aferencias principalmente de la corteza cerebral, del tálamo y de las células dopaminérgicas del tallo cerebral. Distintas partes de este núcleo reciben aferencias de distintas regiones cerebrales, de modo que la región dorsolateral del núcleo estriado recibe información cortical de áreas sensorimotoras, la región central recibe información de las áreas corticales asociativas y la región ventromedial recibe información de áreas límbicas (Haber, 2016; Kandel *et al.*, 2013).

Las células neuronales que forman parte del núcleo estriado pueden subdividirse en dos grupos generales: las neuronas de proyección y las interneuronas (figura 1). El primer grupo corresponde a las neuronas espinosas medianas (NEMs); las cuales representan más del 90% de las células estriatales (Haber, 2016). Las NEMs poseen una arborización dendrítica esférica, la cual tiene en promedio un diámetro de 200 a 300 μm , son GABAérgicas y silentes en estado de reposo. En estas células pueden distinguirse dos grupos generales, esto con base en la expresión de distintos receptores y neuropéptidos. Por un lado, se encuentran las NEMs que expresan sustancia P, dinorfina y receptores de dopamina D1 y muscarínicos M4; por otro lado se encuentran las NEMs que poseen encefalina y muestran una alta expresión de receptores a dopamina D2 y a adenosina A2A (Haber, 2016; Kreitzer y Malenka, 2008; Yelnik, 2002). Adicionalmente, ambos tipos de NEMs poseen proyecciones distintas, por lo cual poseen una participación importante en las dos vías de procesamiento de la información de los GB (figura 2). De modo que aquellas que expresan receptores de tipo D1, proyectan a las neuronas GABAérgicas del GPi y la SNr, las cuales a su vez envían proyecciones a los núcleos motores del tálamo, formando así la vía directa. Mientras que aquellas NEMs estriatales que expresan receptores de tipo D2, proyectan al GPe y las células de este núcleo a su vez, proyectan hacia el STN. Las neuronas subtalámicas envían axones al GPi y a la SNr, donde forman sinápsis excitatorias con las neuronas de salida inhibitorias de estos núcleos, de modo que ocurre una inhibición de las neuronas que proyectan del tálamo a la corteza, formando así la vía indirecta (Kreitzer y Malenka, 2008; Yelnik, 2002).

Finalmente, en cuanto a las interneuronas presentes en el núcleo estriado, se han identificado al menos 3 clases: las interneuronas colinérgicas grandes, las cuales se caracterizan por la presencia de colina acetiltransferasa; las interneuronas positivas a somatostatina y óxido nítrico sintasa (NOS); y las interneuronas GABAérgicas positivas a parvalbúmina (Shepherd, 2003).

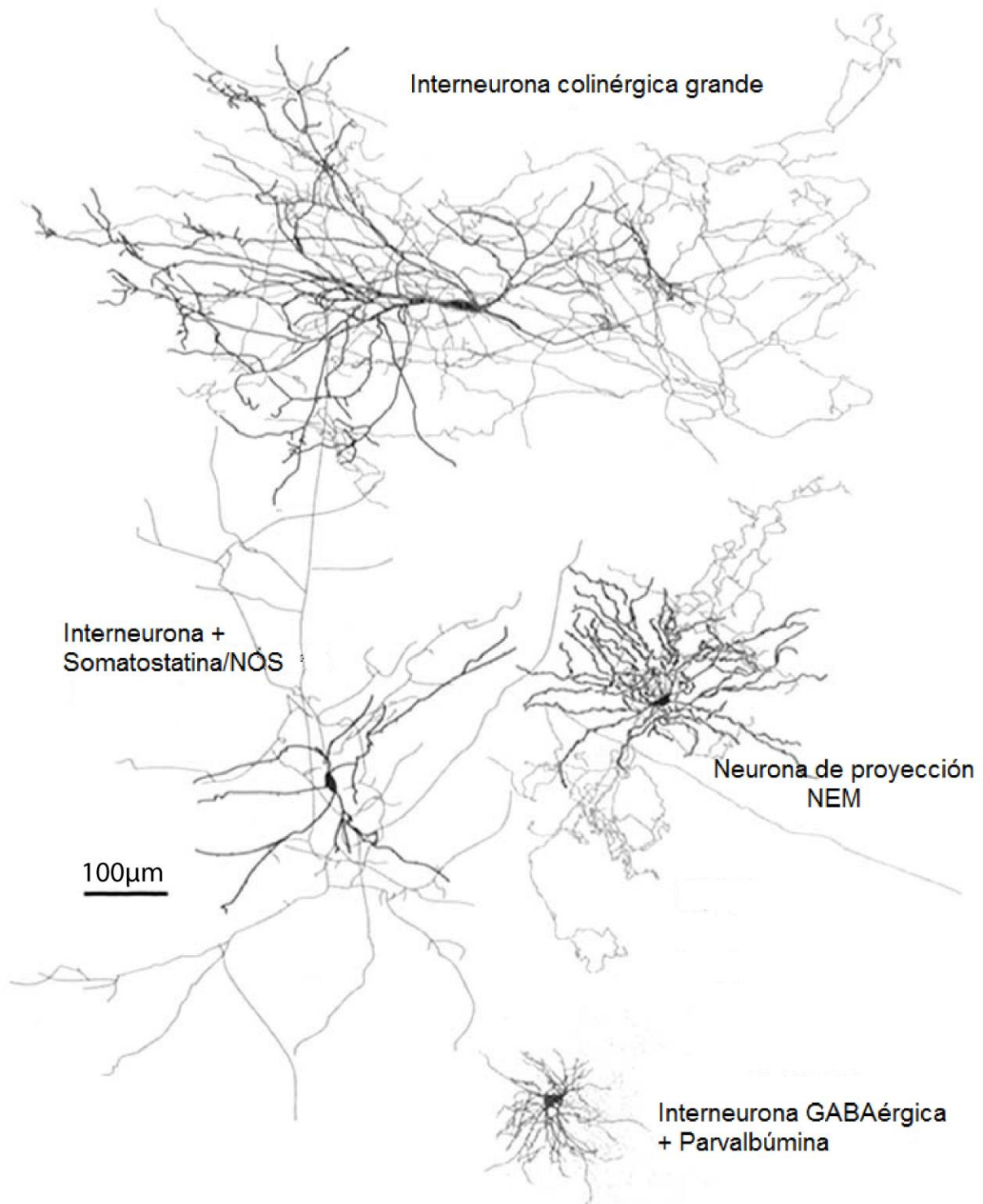


Figura 1. Tipos de neuronas presentes en el núcleo estriado (Modificada de Sherpherd, 2004).

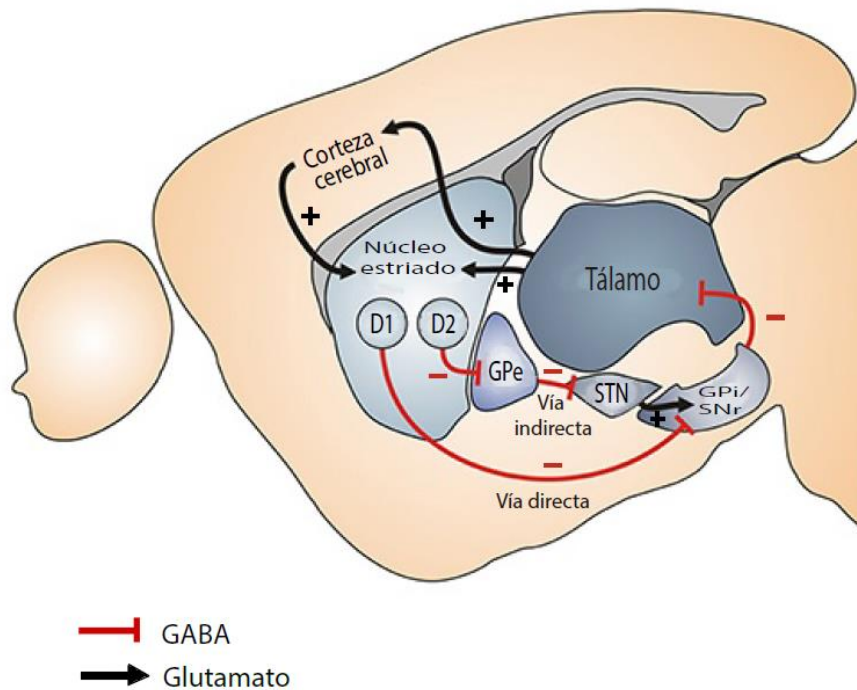


Figura 2. Diagrama de las vías directa e indirecta del circuito corticoestriatal. Se representa una vista sagital del circuito motor en ratones con las conexiones excitatorias e inhibitorias en negro y rojo, respectivamente. En la vía directa, las NEMs estriatales que expresan receptores de tipo D1, inhiben a las neuronas GABAérgicas del GPI y la SNr, al ocurrir esto, se promueve la desinhibición de las proyecciones excitatorias tálamo-corticales, lo cual conduce a la activación de los circuitos premotores y por consiguiente a la ejecución del movimiento. Por su parte, en la vía indirecta, las NEMs estriatales que expresan receptores de tipo D2, establecen sinápsis inhibitorias con las células GABAérgicas del GPe; a su vez, las neuronas palidales proyectan a las neuronas glutamatérgicas del STN. Las neuronas subtalámicas envían axones al GPI y a la SNr, estos núcleos a su vez, inhiben a las neuronas que proyectan del tálamo a la corteza y como resultado final se da la inhibición del movimiento (Modificado Negwer y Schubert, 2017)

1.2. Enfermedad de Huntington (EH)

La EH es un padecimiento neurodegenerativo en el cual se produce una pérdida progresiva de neuronas en el núcleo estriado y la corteza cerebral (siendo las NEMs GABAérgicas del núcleo estriado las células más afectadas). Su sintomatología se ve caracterizada por movimientos coreicos, discinesia y distonía, además de alteraciones metabólicas, cognitivas y psiquiátricas (Damiano *et al.*, 2010; Hernández-Echeagaray *et al.*, 2012; Jimenez-Sanchez y Rubinsztein, 2015). Durante el transcurso de la enfermedad, las alteraciones motoras y cognitivas van haciendo más severas, de modo que los pacientes eventualmente mueren, y esto ocurre, generalmente, por complicaciones de caídas, inanición, disfagia o aspiración. La latencia típica desde el diagnóstico hasta la muerte es de 20 años (Walker, 2007).

La EH es de origen hereditario, y se transmite de una generación a otra con un patrón autosómico dominante. Esta enfermedad es causada por la mutación de un solo gen (*Interesting transcript o Hd*), en el cual existe una expansión de tripletes CAG (igual o superior a 40 repeticiones), de modo que se produce una poliglutaminación anormal en el amino terminal de la proteína huntingtina (Htt) y por consiguiente un mal plegamiento de la misma (Hernández-Echeagaray, 2012; Nopoulos, 2016). En condiciones normales la Htt participa en el tráfico vesicular intracelular, en la regulación transcripcional y se requiere para el desarrollo neuronal, sin embargo, su poliglutaminación anormal conduce a la pérdida de su funcionalidad normal y a la ganancia de funciones tóxicas que pueden ser ejercidas tanto por la proteína completa, como por los fragmentos N-terminales producidos tras la escisión de la proteína por diferentes proteasas (Bodai y Marsh, 2012; Damiano *et al.*, 2010).

Algunas de las alteraciones que han sido reportadas, debidas a la presencia de la Htt poliglutaminada (m-Htt) son las siguientes: en primer lugar, se sabe que ocurre un incremento en la actividad de la transglutaminasa, así como una disminución progresiva de factores importantes en la supervivencia de las células del estriado, como proteínas dependientes de la proteína CREB (proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc); también la liberación de neurotransmisores se ve afectada dado que la m-Htt interrumpe de manera física el transporte axonal, y altera la composición, tráfico y función de los receptores de glutamato NMDA. Asimismo, la m-Htt ocasiona una disfunción en el proteasoma, la cual se piensa que ocurre no por una inhibición directa de éste por parte de la m-Htt, sino porque este sistema se hace incapaz de degradar la vasta carga de proteínas mal plegadas existentes en las células (Labbadia y Marimoto, 2013; Fernandes y Raymond, 2009; Brouillet *et al.*, 2005). Igualmente,

se sabe que los fragmentos N-terminales producidos por la escisión de la m-Htt poseen una toxicidad mayor a la proteína completa, puesto que estos son más propensos a agregarse y a formar inclusiones nucleares, de modo que estos fragmentos N-terminales afectan la transcripción de distintos genes mediante la interacción con importantes mediadores de la iniciación de la transcripción tales como el activador transcripcional Sp1, la proteína de unión a la caja TATA, las subunidades TAFII130 y RAP30 de los complejos TFIID y TFIIF respectivamente; y el factor de transcripción de la caja CAAT, NF-Y (Jimenez-Sanchez y Rubinsztein, 2015; Labbadia y Marimoto, 2013).

Además, se ha reportado que, algunos otros efectos deletéreos de la m-Htt se encuentran estrechamente relacionados con defectos mitocondriales. Por ejemplo, se ha observado que la m-Htt impide el tráfico mitocondrial retrógrado y anterógrado a lo largo de los axones, lo cual provoca una interrupción del mantenimiento mitocondrial y una disminución en la deposición de mitocondrias en sitios de gran demanda energética, tales como la sinapsis (Orr *et al.*, 2008). Otro efecto de la m-Htt es la desregulación de genes mediados por el co-activador de PPAR, el peroxisoma proliferador activado del receptor-y co-activador 1 α (PGC-1 α), los cuales regulan la biogénesis mitocondrial (Labbadia y Marimoto, 2013). También se sabe que la interacción entre la m-Htt con la mitocondria induce a una reducción en el potencial de membrana de dicho orgánulo de modo que se ve reducida la actividad de la mitocondria en la regulación del Ca²⁺ intracelular (Brouillet, 2014); otro efecto de la interacción entre la m-Htt y mitocondria (de manera específica, con la membrana interna mitocondrial), es la disfunción de los complejos II y III de la cadena transportadora de electrones, lo cual conduciría a una disminución en el ATP intracelular y a una mayor producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Labbadia y Marimoto, 2013).

Cabe señalar, que además de la interacción entre la m-Htt con la mitocondria, existe más evidencia que ha permitido resaltar el importante papel que desempeñan el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial en el desarrollo de la EH. Por ejemplo, en estudios post-mortem se ha reportado que en el núcleo caudado de pacientes con la EH ocurre una disminución en actividad de los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2012; Brouillet *et al.*, 2005); aunado a esto, Benchoua *et al.* (2006) encontraron una reducción en dos componentes importantes del complejo mitocondrial II: las subunidades hierro-azufre (Ip) y FAD; motivo por el cual, sugieren que los defectos en el

complejo II mitocondrial, son determinantes en la muerte de neuronas estriatales en pacientes de la EH.

1.2.1. Modelo Farmacológico de la EH

Para el estudio de los mecanismos involucrados con el desarrollo de la EH, se ha hecho uso de diferentes modelos, los cuales se pueden subdividir en modelos transgénicos y farmacológicos. El primer grupo engloba a los organismos (generalmente ratones), que expresan fragmentos N-terminales de m-Htt de diferentes tamaños; el gen humano *Hd* mutado completo y los modelos *knock-in*, en los que se inserta una expansión del triplete CAG en el gen homólogo de la EH en ratones; mientras que el segundo grupo consiste en la aplicación de diferentes compuestos que imiten fenotípicamente la sintomatología de la EH, entre ellos se encuentran el ácido kaínico, el ácido iboténico, el ácido quinolínico (AQ) (análogos de glutamato) y el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (Brouillet *et al.*, 2005).

En el caso particular del 3-NP, este compuesto comenzó a ser considerado un modelo fenotípico de la EH, tras el descubrimiento de que su ingesta accidental ocasiona degeneración estriatal (Brouillet, 2014; Hernández-Echeagaray *et al.*, 2012), y su uso ha permitido dilucidar algunos de los mecanismos de degeneración neuronal ligados dicha enfermedad; siendo los defectos energéticos, la excitotoxicidad secundaria y el estrés oxidativo, los principales mecanismos asociados al daño producido por el 3-NP en modelos murinos (Damiano *et al.*, 2010; Brouillet *et al.*, 2005).

El 3-NP actúa inhibiendo a la enzima succinato deshidrogenasa (SDH; figura 3), esto debido a su similitud estructural con el succinato, de modo que el 3-NP, ocupa el sitio catalítico de la enzima. La SDH es el principal constituyente del complejo II de la cadena transportadora de electrones y del ciclo de Krebs (Brouillet *et al.*, 2005), y se encarga de la oxidación de succinato a fumarato, por lo tanto, su inhibición conlleva a la reducción de los niveles de ATP, a una disminución del potencial de membrana mitocondrial y a una redistribución del citocromo c (Túnez y Santamaría, 2009; Brouillet *et al.*, 2005).

En modelos murinos, diferentes estudios señalan que la inyección crónica de 3-NP produce alteraciones motoras, las cuales siguen un patrón de desarrollo particular (Borlogan *et al.*, 1995; Hamilton y Gould, 1987), en el cual se pueden distinguir al menos dos etapas: la primera, ocurre durante los primeros días de tratamiento y en ésta los organismos presentan hiperactividad (con una marcha descoordinada y movimientos de balanceo); mientras que

durante la segunda etapa los organismos presentan hipoactividad. Lo anteriormente mencionado sustenta la idea de que el 3-NP imita la progresión de las alteraciones motoras de la EH.

Algunas otras alteraciones inducidas por la intoxicación con 3-NP incluyen: la activación de la respuesta inflamatoria a través del incremento en los niveles de la interleucina-6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como de la caspasa-3 (Kumar *et al.*, 2011) un indicador de la muerte por apoptosis. En el trabajo elaborado por Rodríguez *et al.* (2010) se encontró que el 3-NP produce vacuolización, lo cual podría indicar algún tipo de autofagia; y conjuntamente se observó una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD). Se sabe además, que el 3-NP produce una alteración en la expresión de neurotrofinas; en el caso particular del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), se ha visto que la expresión de los niveles del mRNA de dicho factor se ven incrementados tras la administración del 3-NP (Revisado en Wu *et al.*, 2010); no obstante en el trabajo elaborado por Espíndola *et al.* (2012), se reportó una disminución significativa en la expresión del mRNA de BDNF en el estriado de ratones.

Finalmente, se ha visto que el 3-NP puede producir alteraciones en la transmisión sináptica, de modo que la intoxicación con esta neurotoxina provoca un cambio en la excitabilidad de las NEMs, así como también altera la morfología de dichas neuronas, reduciendo la longitud dendrítica y el número de espinas dendríticas presentes en las NEMs del núcleo estriado (Mendoza *et al.* 2014).

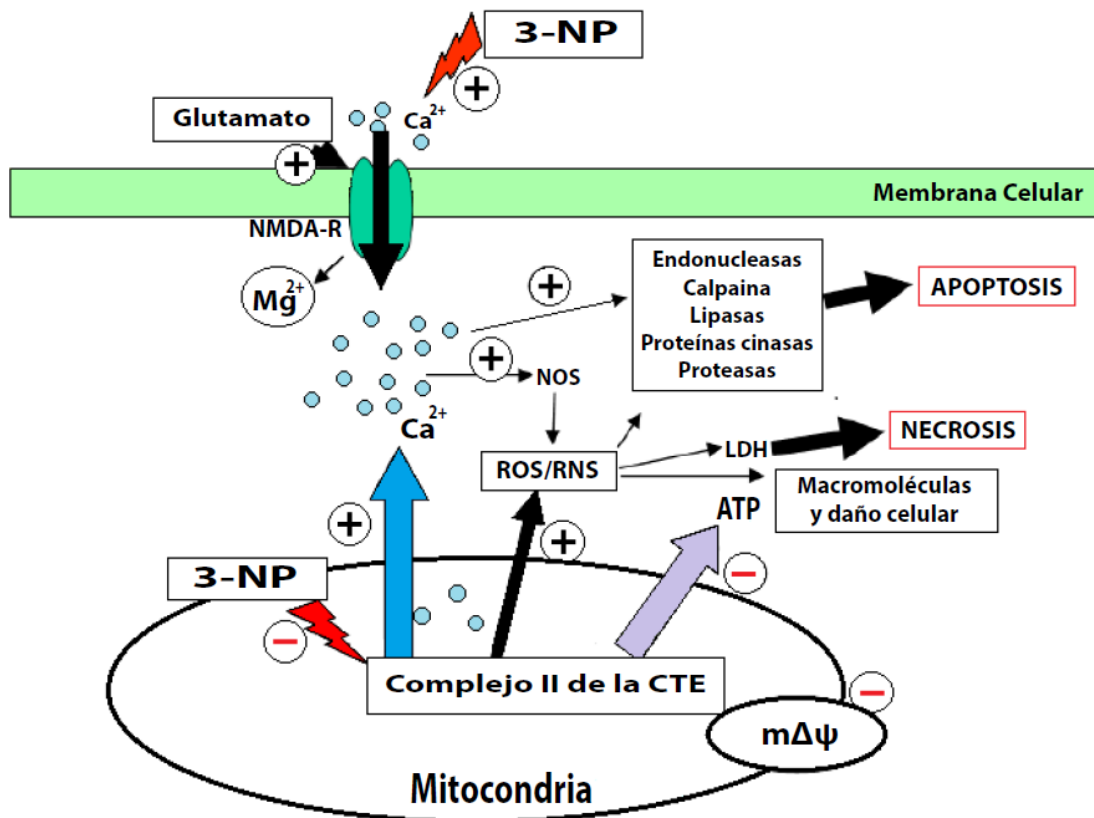


Figura 3. Alteraciones intracelulares producidas por el 3-NP. Al generar la inhibición de la SDH, el 3-NP provoca una disminución de los niveles de ATP y en el potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$). Además, esta neurotoxina provoca una mayor susceptibilidad de las neuronas al glutamato: debido a una disminución en el potencial de membrana celular, se libera el Mg^{2+} presente en el poro de los receptores NMDA dependientes de voltaje (NMDA-R). La activación de estos receptores conduce a la entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma y a la activación de enzimas dependientes de calcio, tales como calpaínas y la oxido nítrico sintasa (NOS). En conjunto, estos eventos conducen a la muerte celular, ya sea por apoptosis o por necrosis. CTE: cadena transportadora de electrones; ROS: especies ractivas de oxígeno; RNS: especies reactivas de nitrógeno; LDH: lactato deshidrogenasa (Modificado de Tunéz *et al.*, 2010).

1.3. Transmisión sináptica

Las neuronas establecen sitios especializados de contacto unas con otras, conocidos como sinapsis, estos sitios permiten que exista una comunicación entre estas células, dando como resultado un proceso de transmisión de información fundamental para las funciones neuronales: la transmisión sináptica (Purves *et al.*, 2004; Bear *et al.*, 2007).

Con base en su mecanismo de transmisión, existen dos tipos de sinapsis: eléctrica y química. Por una parte, la sinapsis eléctrica permite la propagación rápida de señales despolarizantes (Kandel *et al.*, 2013), esto es posible debido a la proximidad entre las neuronas pre- y postsináptica, las cuales poseen en su membrana uniones gap. Dichas uniones poseen canales que se encuentran alineados, de tal modo que se forman poros a través de los cuales ocurre el flujo de la corriente iónica entre ambas células (Purves *et al.*, 2004). Por otra parte se encuentra la sinapsis química, que a diferencia de la sinapsis eléctrica, el espacio entre las neuronas pre- y postsináptica es mayor (conocido como hendidura sináptica) y se encuentra mediada por la acción de neurotransmisores. Estos neurotransmisores son liberados tras la llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica, en la cual se produce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; esto a su vez promueve el incremento del flujo de dicho ion al interior de la terminal presináptica, promoviendo así la fusión de vesículas sinápticas con la membrana. Una vez que ocurre el proceso de liberación de neurotransmisor, este difunde a través de la hendidura sináptica y se une a receptores específicos en la membrana postsináptica; la unión del neurotransmisor a estos receptores provoca cambios en el flujo iónico en las células postsinápticas, a través de la apertura o cierre de canales (Kandel *et al.*, 2013; Purves *et al.* 2004).

1.3.1. Modulación sináptica

La modulación sináptica o neuromodulación se define como la habilidad de las neuronas de alterar sus propiedades eléctricas en respuesta a cambios bioquímicos intracelulares que resultan de la estimulación sináptica u hormonal. Esta habilidad es sumamente importante puesto que permite la reconfiguración de circuitos neuronales, lo cual es esencial para la adaptabilidad de sistema nervioso (Nadim y Bucher, 2014; Kaczmarek y Levitan, 1987).

La neuromodulación se encuentra mediada por una gran variedad de sustancias conocidas como neuromoduladores (que incluyen pequeñas moléculas transmisoras, aminas biogénicas, neuropéptidos, entre otras), cuyos efectos y liberación difieren de la transmisión sináptica rápida (Nadim y Bucher, 2014). A diferencia de los neurotransmisores, los cuales ejercen un efecto breve y rápido sobre la membrana postsináptica, los neuromoduladores poseen un efecto más lento y duradero mediante el aumento, prolongación, inhibición o limitación del efecto del neurotransmisor (Snell, 2007; Cooper *et al.*, 2003; Hasselmo, 1995).

Los mecanismos mediante los cuales los neuromoduladores actúan son diversos, y pueden dividirse en dos tipos principales: presinápticos y postsinápticos. Por un lado, la modulación presináptica tiene como consecuencia un cambio en la liberación de neurotransmisor; dicho cambio puede deberse a la activación de receptores en la neurona presináptica que propicien modificaciones en la frecuencia de disparo de dicha neurona, en las conductancias iónicas de la terminal sináptica, o bien, en el transporte, recaptura, síntesis, almacenamiento, liberación o catabolismo de un neurotransmisor y/o sus precursores. Por otra parte, en la modulación postsináptica el efecto final es un cambio en el patrón de disparo de la neurona postsináptica de manera independiente de la liberación de neurotransmisor; éste tipo de modulación propicia modificaciones en las conductancias iónicas, cambios a largo plazo en el número de receptores que se encuentran en la neurona postsináptica o en la afinidad de estos receptores a sus ligandos (Nadim y Bucher, 2014; Cooper *et al.*, 2003).

1.4. Factores neurotróficos/Neurotrofinas

Por definición, los factores neurotróficos pueden entenderse como aquellos factores secretados que posean un efecto de mantenimiento en las neuronas. En este grupo se incluyen polipéptidos como el factor neurotrófico ciliar, el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF), así como algunas proteínas entre las que se incluyen el factor de crecimiento transformante beta (TGF β -1) y Sonic hedgehog (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008).

Dentro de la amplia variedad de factores neurotróficos, se encuentran las neurotrofinas; estas constituyen un grupo de péptidos estructuralmente similares que en mamíferos, incluyen a NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 (Lewin y Carter, 2014). En el sistema nervioso, se sabe que las neurotrofinas participan en procesos como: la supervivencia neuronal, el crecimiento y orientación axonal y dendrítico; la regulación en la estructura y conexiones sinápticas, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Chao, 2003); además se sabe que para el desarrollo de determinadas poblaciones neuronales es necesaria la acción de múltiples neurotrofinas y la expresión coordinada de sus receptores específicos (Skaper, 2008).

En células neuronales, la síntesis proteica de las neurotrofinas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso, dando como productos formas inmaduras o pro-neurotrofinas (que se conforman por una secuencia señal, un prodominio y la secuencia de la proteína madura).

Estas últimas, se almacenan en vesículas secretoras y son procesadas por proteasas de la familia de la proproteína convertasa para convertirlas a su forma madura. Es importante mencionar que las proneurotrofinas pueden ser co-secretadas con sus formas maduras y poseer actividad biológica (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008).

Tras su maduración en las vesículas secretoras, las neurotrofinas se asocian de manera no covalente en homodímeros de aproximadamente 13 kDa, donde cada subunidad posee una cadena principal, la cual consiste en dos pares de láminas β antiparalelas que generan una forma alargada y se estabilizan por un nudo de cisteína formado por tres puentes disulfuro (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008). En cuanto a su secreción en neuronas, esta ocurre de manera similar a la de los neuropéptidos, de modo que las neurotrofinas son empaquetadas en vesículas de núcleo denso que se transportan de manera anterógrada a los axones y se secretan en la terminal axónica. Asimismo, dicha secreción ocurre por dos vías: en el caso de NGF, NT-3 y NT-4/5 lo hace a través de la vía constitutiva, mientras que BDNF se secreta a través de la vía regulada (Lewin y Carter, 2014).

1.4.1. Receptores a neurotrofinas

Las neurotrofinas ejercen sus efectos a través de la interacción con dos tipos de receptores transmembranales: el receptor a neurotrofinas p75 ($p75^{NTR}$) y los receptores tirosina-cinasa (Trk) (figura 4; Skaper, 2008).

El primero de estos, $p75^{NTR}$, pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), cuya estructura consiste en dominio extracelular con 4 motivos ricos en cisteína, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. Se sabe que las cuatro neurotrofinas se unen con la misma afinidad a éste receptor; de igual manera, existe evidencia de que las formas inmaduras de estas neurotrofinas se unen a $p75^{NTR}$ con alta afinidad promoviendo vía apoptótica mediada por el receptor (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008, Roux y Barker, 2002).

En cuanto a los receptores Trk, estos son proteínas integrales de membrana compuestas de tres dominios: uno extracelular, uno transmembranal y uno citoplasmático. Por un lado, el dominio extracelular, que actúa como el sitio de unión al ligando, consiste en un grupo rico en cisteína, seguido por tres repeticiones ricas en leucina y dos dominios C2 similares a inmunoglobulina; siendo el segundo dominio similar a Ig la principal región de unión de las neurotrofinas. Por otro lado, el dominio transmembranal de los receptores Trk termina en un

dominio citoplasmático, éste último contiene un dominio de tirosina cinasa, el cual se encuentra rodeado de residuos de tirosina que actúan como sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras y enzimas (Kandel *et al.* 2013; Skaper, 2008; Lewin y Carter, 2014).

Existen tres tipos de receptores tirosina cinasa: TrkA, TrkB y TrkC; cada uno de estos posee alta afinidad por cada una de las diferentes neurotrofinas, de modo que NGF se une al receptor TrkA, BDNF y NT-4/5 al TrkB, y NT-3 al TrkC; no obstante, NT-3 puede interactuar también, con menor especificidad, con TrkA y TrkB (Skaper, 2008).

Es importante mencionar que aunque los receptores $p75^{NTR}$ y Trk actúan de manera independiente, se tiene evidencia de que existe una interacción física y funcional entre ambos. Por un lado, se ha observado que en neuronas que expresan ambos tipos de receptores, estos pueden alterar las propiedades de señalización el uno del otro (Lewin y Carter, 2014); mientras que, por otro lado, se tiene la perspectiva de un posible efecto alostérico del $p75^{NTR}$ sobre los receptores Trk, de modo que $p75^{NTR}$ puede incrementar la afinidad de los diferentes tipos de receptores Trk con las neurotrofinas (Roux y Barker, 2002).

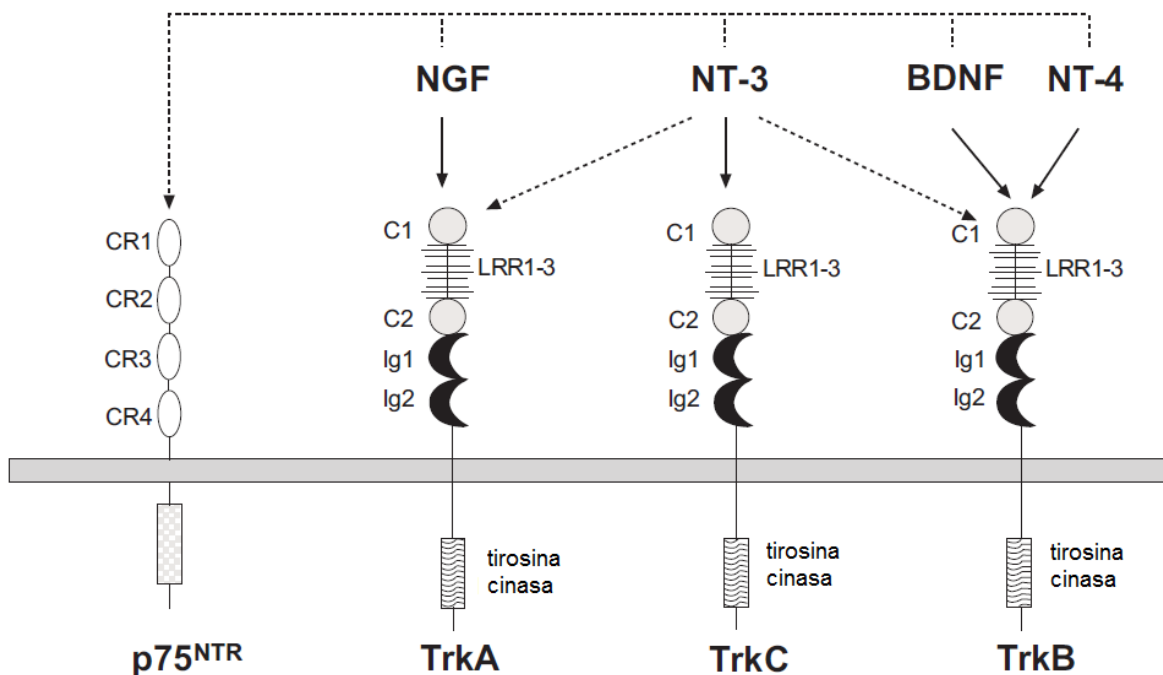


Figura 4. Receptores a neurotrofinas. Todas la neurotrofinas se unen con la misma afinidad al receptor $p75$, sin embargo las neurotrofinas muestran cierta especificidad en su interacción con los receptores Trk: NGF se une a TrkA, BDNF y NT-4/5 unen TrkB y NT-3 se une a TrkC. Existe la posibilidad de que NT-3 interactue con los receptores TrkA y TrkB, aunque con menos afinidad. CR1-CR4: motivos ricos en

cisteína; C1 y C2: sitios ricos en cisteína; LRR1-3: sitios ricos en leucina; Ig1 e Ig2: dominios similares a inmunoglobulina (Modificado de Skaper, 2008).

1.4.2. Vías de señalización activadas por neurotrofinas

Las neurotrofinas, al interactuar con los receptores Trk, ocasionan la dimerización de los mismos, produciendo su activación y la subsecuente fosforilación de residuos específicos de tirosina, esto a su vez crea sitios de unión para proteínas efectoras que inician la activación de vías de señalización intracelular (Kandel *et al.* 2013; Lewin y Carter, 2014). Las principales vías de señalización activadas por los receptores Trk son: MEK/ERK, PI3K/AKT y PLC- γ /PKC (figura 5); la activación de estas vías se involucra no solo con la supervivencia celular, sino también, con mecanismos moleculares subyacentes al crecimiento y arborización neuronal, así como al fortalecimiento de la transmisión sináptica (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008).

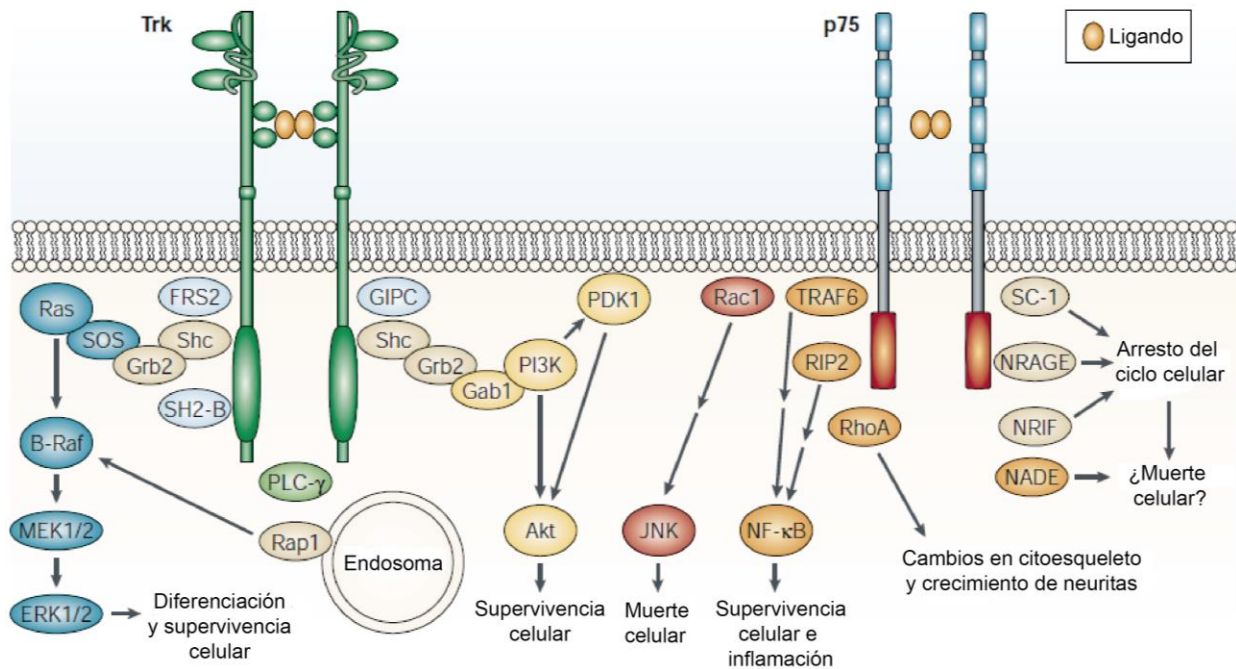


Figura 5. Vías de señalización activadas por neurotrofinas. La unión de las neurotrofinas (ligando) con sus receptores p75 y Trk desencadena la activación de diferentes vías de señalización. En el caso de la activación del receptor p75, se promueve la señalización de NF- κ B (factor nuclear κ B) y la quinasa N-terminal Jun (JNK), así como también modula la actividad de RhoA; los efectos de la activación de las vías mediadas por p75^{NTR} incluyen la apoptosis, la supervivencia celular, elongación de neuritas y el arresto del ciclo celular. Por otra parte la activación de los receptores Trk induce la activación de vías

como: MEK/ERK, PI3K/AKT y PLC- γ /PKC: estas últimas median procesos de diferenciación y supervivencia celular (Modificado de Chao, 2003).

1.4.2.1. MEK/ERK

Esta vía se asocia principalmente con la diferenciación celular; su señalización se desencadena tras el reclutamiento de la proteína Shc, que a su vez crea un sitio de unión para las proteínas Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) y SOS (*Son of Seveless*). Como consecuencia de la formación del complejo Grb2-SOS, ocurre la activación de Ras. Esta última proteína, estimula la señalización de diferentes cinasas, que como resultado final promueven la activación de MEK y ERK, dicha activación puede conducir al crecimiento axonal local así como al inicio de los eventos transcripcionales mediados por CREB (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008).

1.4.2.2. PI3K/AKT

La señalización de la vía de PI3K se encarga de promover funciones tales como la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación neuronal. Esta vía puede activarse de dos maneras: a través del reclutamiento de Gab-1 (*Grb2-associated binder-1*) o de la fosforilación de sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) del receptor Trk. PI3K activada genera fosfoinosítidos que desencadenan la activación de dos cinasas: la proteína ribosómica S6-cinasa p70 y la cinasa de serina/treonina AKT. Esta última cinasa, puede incrementar la traducción de proteínas a través de la vía de la proteína diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) y así promover el crecimiento axonal; o bien inhibir al factor de transcripción *forkhead* FKHL1, que regula la expresión de genes pro-apoptóticos, promoviendo la supervivencia neuronal (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008).

1.4.2.3. PLC γ 1/PKC

Esta vía se desencadena mediante el reclutamiento de PLC- γ 1 a un sitio de acoplamiento en el receptor Trk. Una vez que se activa a PLC- γ , esta hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato en diacilglicerol (DAG) e inositol tri-fosfato (IP3). El IP3 conduce a la liberación de las reservas de Ca²⁺ intracelulares, que a su vez activa enzimas dependientes de Ca²⁺ como las CaM cinasas y la calcineurina fosfatasa. Además, la liberación de Ca²⁺ y la producción de DAG promueven la activación de la proteína cinasa C (PKC). La vía de PLC- γ 1 se ha asociado a la actividad de los receptores TrkB en la modulación de la transmisión sináptica y en la potenciación a largo plazo (Lewin y Carter, 2014; Skaper, 2008).

1.4.3. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

La neurotrofina BDNF, ha sido estudiada debido a que posee una importante participación en la función sináptica; su expresión es abundante en el sistema nervioso central en desarrollo y maduro, así como también en tejidos periféricos (músculo, hígado y tejido adiposo) (Noble *et al.*, 2011). De manera particular, en el SNC, el mRNA de BDNF se expresa principalmente en la corteza cerebral e hipocampo, y en menor medida en el septum, hipotálamo y en los núcleos adrenérgicos del tronco cerebral; sin embargo, la forma madura de la neurotrofina se ha reportado en regiones como el prosencéfalo basal, el núcleo estriado, el tronco encefálico y el cerebelo (Bodai y Marsh, 2012; Tapia-Arancibia *et al.*, 2004).

Esta neurotrofina colocaliza con su receptor TrkB, y su participación en la función sináptica está ligada a la formación, la estabilidad y la morfología de las sinapsis, así como también se ha destacado su participación en la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo y en la corteza visual. Los mecanismos mediante los cuales BDNF modula la actividad sináptica pueden ser presinápticos o postsinápticos, tanto en sinapsis glutamatérgicas, como en las GABAérgicas (Carvalho *et al.*, 2008). Además, se sabe que esta neurotrofina contribuye en gran medida a la supervivencia de las neuronas estriatales, sin embargo, es importante resaltar que su síntesis ocurre en neuronas corticales, desde las cuales es transportada al núcleo estriado a través de vesículas mediante transporte axonal (Damiano *et al.*, 2010).

La secreción de BDNF, a diferencia del resto de las neurotrofinas, ocurre por la vía regulada. Se ha reportado que esto sucede debido a la actividad de una proteína convertasa llamada furina, el procesamiento de esta enzima dirige al resto de las neurotrofinas a ser secretadas por la vía constitutiva, sin embargo, en la red trans-Golgi, BDNF es menos susceptible a la escisión por dicha convertasa (Al-Qudah y Al-Dwairi, 2016; Lu, 2003). Aunado a esto, en la secreción de BDNF el Ca^{2+} juega un papel muy importante, ejemplo de esto es la secreción de esta neurotrofina mediada por glutamato a través de sus receptores metabotrópicos e ionotrópicos. En el caso de la secreción mediada por receptores metabotrópicos, estos al activarse inducen la generación de IP₃ el cual activa canales de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, provocando un incremento en el Ca^{2+} citoplasmático y eventualmente a la liberación de BDNF. Mientras que, la liberación de BDNF mediada por receptores ionotrópicos, ocurre a través de la activación de los receptores AMPA, la cual produce el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de calcio activados por voltaje (Revisado en: Al-Qudah y Al-Dwairi, 2016).

1.4.3.1. Papel y/o alteraciones de BDNF en la EH y en el modelo farmacológico de la EH

Algunas de las posibles causas que se han atribuido a la degeneración selectiva de las NEMs estriatales en la EH es debido a la reducción de los niveles de BDNF en la corteza cerebral y estriado observados tanto en pacientes, como en modelos murinos transgénicos de la EH (Bodai y Marsh, 2012; Damiano *et al.*, 2010). En condiciones normales, la Htt regula la transcripción y tráfico intracelular de BDNF, de modo que al encontrarse poliglutaminada, la m-Htt afecta la producción y señalización de la neurotrofina (Bodai y Marsh, 2012).

En el modelo farmacológico de la EH, utilizando el 3-NP, BDNF también muestra alteraciones. En cuanto a la expresión de la neurotrofina, mientras que la inyección intraestriatal con 3-NP provoca un incremento en el mRNA de BDNF en la corteza cerebral, la intoxicación sistémica por 3-NP provoca una disminución en la expresión del mRNA de BDNF (Espíndola *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2010). Por otra parte, en cuanto a la transmisión sináptica, se ha visto que en tejido proveniente de ratones tratados con 3-NP, se reduce la actividad moduladora de la neurotrofina (Mendoza *et al.*, 2014).

La importancia BDNF en la EH y en el modelo del 3-NP no radica únicamente en la disminución de dicho factor neurotrófico, sino también en la idea de que el incremento y/o mantenimiento de los niveles de BDNF en corteza cerebral y núcleo estriado puede prevenir la neurodegeneración estriatal. Sin embargo existe una limitación importante, ya que se ha demostrado que la administración oral o sistémica de BDNF resulta inadecuada, debido a que la neurotrofina se descompone por enzimas digestivas y no puede cruzar la barrera hematoencefálica (Begni, Riva y Cattaneo, 2016).

1.5. Antioxidantes

En los últimos años, la investigación sobre el tratamiento y prevención de algunas patologías ha enfocado su atención al uso de moléculas antioxidantes presentes en distintos alimentos, esto debido a la asociación existente entre el consumo de alimentos y bebidas ricas en antioxidantes y la prevención de enfermedades (Scalbert *et al.*, 2002). Una de estas moléculas antioxidantes es el ácido caféico (AC). A continuación se mostrará información precisa acerca de éste compuesto y del amplio espectro de actividades que le son atribuidas en algunos procesos patológicos del sistema nervioso.

1.5.1. Ácido caféico

El AC (figura 6) es un compuesto fenólico perteneciente al grupo de los ácidos hidroxicinámicos. Su alta prevalencia en alimentos como frutas, vegetales y condimentos; y en bebidas como el café, el vino y el té, lo convierte en el compuesto más abundante en la dieta humana. Este compuesto predomina en la forma de conjugados de éster, el más común de estos es el ácido clorogénico (CGA) (un conjugado de AC y ácido quínico); sin embargo se tiene evidencia de que en la digestión el CGA puede hidrolizarse y dar como resultado una mayor absorción de AC (Leopoldini, 2011; IARC, 1993).

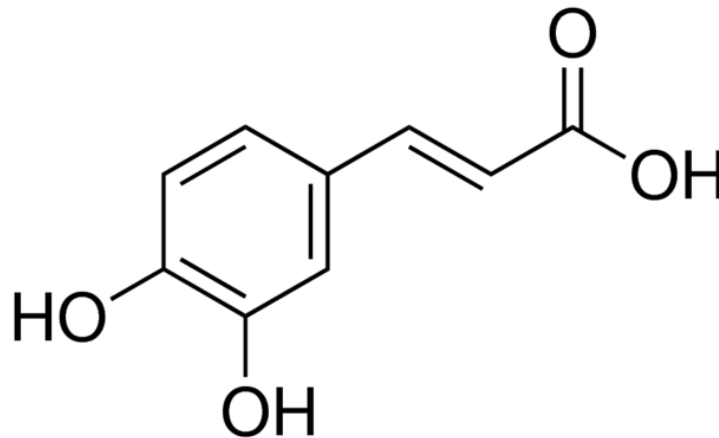


Figura 6. Estructura química del ácido caféico (AC) o ácido 3,4-dihidroxicinámico. Imagen obtenida de Sigma Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0625?lang=es®ion=MX>).

Diferentes grupos de investigación han indagado sobre el efecto del AC en diferentes patologías, y se ha llegado a la conclusión que, aunado a su actividad antioxidante, el AC posee propiedades biológicas y farmacológicas, como: antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas, inmunomoduladoras y neuroprotectoras (Leopoldini, 2011). Esta última propiedad se le ha atribuido dado que se ha demostrado que, tras la suplementación alimentaria con AC en ratones, el contenido de este metabolito se ve incrementado en tejido cerebral, lo cual significaría que el AC puede atravesar la barrera hematoencefálica tras su ingesta oral (Tsai *et al.*, 2011).

Por una parte, la actividad neuroprotectora del AC se le ha atribuido en gran medida a su actividad antioxidante, esto debido a que en diferentes modelos de depresión, estrés, isquemia cerebral y neurodegeneración, en los cuales se ha observado un incremento en marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo, el tratamiento con AC actúa disminuyendo los niveles de

malondialdehído (MDA, un indicador de la peroxidación lipídica), suprimiendo la producción de óxido nítrico (NO) y además, incrementando los niveles y actividad de diferentes sistemas de defensa antioxidante como SOD, glutatión (GSH) y CAT (Taram *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Mallik *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Gul *et al.*, 2016; Deshmukh *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2015; Oboh *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2011; Kalonia *et al.*, 2009). Cabe mencionar que la actividad antioxidante del AC, no se limita a la protección del tejido cerebral, sino también lo hace en diferentes órganos como riñón e hígado (Kim *et al.*, 2015).

Por otra parte, la actividad antiinflamatoria del AC se ha asociado también a la neuroprotección ejercida por este compuesto; por ejemplo, en dos modelos *in vivo* diferentes, uno de la Enfermedad de Alzheimer (Wang *et al.*, 2016) y otro de depresión inducida con lipopolisacárido (LPS) (Mallik *et al.*, 2016); se encontró que el AC protegió a los organismos del deterioro cognitivo y las alteraciones locomotoras (derivadas de cada modelo respectivamente), mediante la disminución de los niveles de citocinas inflamatorias como IL-6 y TNF- α . No obstante, Tsai *et al.* (2011) reportan que en un modelo de la Enfermedad de Parkinson, el AC disminuye no sólo los niveles de IL-6 y TNF- α , sino también de otras citocinas como la interleucina-1beta (IL-1 β), la interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-10 (IL-10). Se ha considerado que los efectos del AC en la respuesta inflamatoria son debidos a que este compuesto actúa inhibiendo a la enzima 5-lipooxigenasa (5-LO) (Liang *et al.*, 2015). De acuerdo por los resultados obtenidos por Luo *et al.* (2016); el AC actúa de manera similar al bloqueo de la expresión de 5-LO en la reducción de los niveles de citoquinas inflamatorias en un modelo de estrés leve crónico (CUMS, por sus siglas en inglés) en ratas.

En contraste con lo anterior, la interacción entre el AC y la 5-LO ha mostrado ser importante no sólo en la regulación de la respuesta inflamatoria, sino también en la transcripción de BDNF. En un estudio elaborado por Takeda *et al.* (2006) se observó que el AC atenúa la disminución en la expresión de mRNA de BDNF en la corteza frontal de ratones sometidos a la prueba de nado forzado; sin embargo, en ratones que no expresan la 5-LO, el AC no mitigó la disminución en la transcripción del mRNA de la neurotrofina (Dzitoyeva *et al.*, 2008).

Otro efecto importante reportado para el AC es su actividad inhibitoria en la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE) (Oboh *et al.*, 2013). Deshmukh *et al.* (2016) reportaron que el AC atenúa las alteraciones ocasionadas por la administración intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) en ratas previniendo la hipofunción

colinérgica, mediante la disminución de la actividad de la AChE. Además del efecto del AC sobre la actividad de enzimas del sistema colinérgico, Akomolafe *et al.* (2017) encontraron que el AC posee un efecto inhibitorio sobre enzimas de los sistemas monoaminérgico y purinérgico, tales como la monoamino oxidasa (MAO-A), E-NTPDasa y ecto-5'-nucleotidasa; para estas dos últimas enzimas, los autores sugieren que la inhibición ejercida por el AC puede estar fuertemente asociada a la actividad de este metabolito como quelante de Fe^{2+} y Cu^{2+} .

Finalmente, cabe mencionar que el efecto neuroprotector del AC y su derivado el ácido caféico fenetil éster (CAPE, por sus siglas en inglés) ha sido escasamente explorado en modelos de la EH. Por un lado, Bak *et al.* (2016) diseñaron un protocolo para investigar el efecto neuroprotector *in vivo* del CAPE ante la toxicidad estriatal inducida por la administración sistémica de 3-NP; en dicho estudio el CAPE al previno las alteraciones motoras provocadas por el 3-NP, y redujo los marcadores de astrogliosis y de activación de microglia/macrófagos en el estriado de ratones tratados con 3-NP. Por otro lado, Kalonia *et al.* (2009) reportó que ante la administración intraestriatal del ácido quinolónico (AQ, también considerado un modelo farmacológico de la EH), el tratamiento con AC, disminuyó las alteraciones histológicas en células estriatales y en la actividad enzimática de los complejos I, II y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, provocadas por el 3-NP.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad aún no se cuenta con un tratamiento establecido para retrasar el inicio o prevenir la progresión de la EH, únicamente se recurre al tratamiento de los síntomas de la enfermedad, sin embargo, a pesar de que en algunos casos este tratamiento sintomático puede ayudar al paciente a adaptarse a los cambios en sus capacidades durante un cierto periodo de tiempo, existe una alta probabilidad de que algunos medicamentos que resulten útiles para mejorar algunos síntomas, provoquen efectos secundarios que empeoren otros síntomas. (Mayo Clinic Staff, 2018; Frank, 2014). Debido a lo anterior, resulta de suma importancia el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan prevenir y/o atenuar las alteraciones producidas en la EH. Un punto clave en el desarrollo de dichas estrategias terapéuticas comprende el periodo pre sintomático de la enfermedad, ya que se sabe que durante éste, a pesar de no existir muerte neuronal, sí ocurre una disfunción neuronal (Ross y Tabrizi, 2011).

El uso del 3-NP como modelo farmacológico ha resultado de gran utilidad para el entendimiento de los mecanismos patológicos relacionados con la EH, entre los que destacan el déficit energético, los defectos mitocondriales y el daño oxidativo. En experimentos *in vivo*, el daño causado por esta neurotoxina dependerá en gran medida de la concentración y duración de los tratamientos, y se ha demostrado que dosis bajas (15 mg/kg) durante un periodo subcrónico (5 días) son suficientes para producir daños histopatológicos y en la transmisión sináptica, que mimeticen los estadios tempranos de la enfermedad (Mendoza *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2010).

El ácido caféico (AC) debido a su amplio espectro de propiedades biológicas y farmacológicas, (antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas, inmunomodulatorias y neuroprotectoras), ofrece una de las posibles alternativas terapéuticas para el tratamiento y prevención de procesos degenerativos del sistema nervioso asociados al daño oxidativo, el cual se ha demostrado que ocurre en la EH y en animales usados en el modelo farmacológico del 3-NP.

3. HIPÓTESIS

Si el daño oxidativo se encuentra asociado a la degeneración inducida por el 3-NP, entonces, el tratamiento *in vivo* con antioxidante como el AC, podría contribuir a prevenir el daño estriatal generado por la neurotoxina, así como mejorar y/o restaurar la neuromodulación de BDNF, incluso a dosis bajas de la neurotrofina en el modelo farmacológico del 3-NP.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar, el efecto neuroprotector *in vivo* del ácido caféico en el modelo de neurodegeneración estriatal inducido con el ácido 3-nitropropionico.

Objetivos particulares:

- Determinar si el pre-tratamiento y co-tratamiento con el AC pueden prevenir las alteraciones provocadas con el 3-NP en la RSP corticoestriatal.
- Determinar si el pre-tratamiento y co-tratamiento con el AC restablecen la actividad neuromodulatoria de bajas concentraciones BDNF en la vía corticoestriatal, aún ante la intoxicación con el 3-NP.
- En caso de preservarse la actividad moduladora de BDNF en los diferentes grupos de tratamiento con AC, determinar si su efecto es presináptico o postsináptico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Fármacos

Para los tratamientos *in vivo* se utilizó ácido caféico (Sigma Aldrich; Laboratorio de Fitoquímica, Unidad de Biotecnología y Prototipos, FES Iztacala, UNAM) y ácido 3-nitropropiónico (Sigma Aldrich); ambos compuestos se disolvieron en una solución de buffer fosfato 0.1 M pH 7.4. La solución de ácido caféico utilizada fue preparada minutos previos a su aplicación, mientras que la solución de 3-NP preparada se almacenó a una temperatura de 4°C evitando su exposición directa a la luz.

Para el registro electrofisiológico se utilizó bicuculina (Sigma Aldrich), de la cual se preparó una solución stock 10 mM en agua bidestilada. La neurotrofina BDNF (PreProtech, Inc) utilizada se preparó en una solución stock de 10 µg/ml y fue disuelta en una solución de buffer fosfato (monobásico y dibásico) 100 mM preparada con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1%.

5.2. Animales y tratamiento

Se utilizaron ratones macho (Harlan, México (ahora Envigo); Bioterio de la FES Iztacala, UNAM) de la cepa C57BL/6, con una edad de 3 a 4 semanas al inicio de los tratamientos. Durante el periodo experimental, los animales se alojaron en grupos de 5 organismos en cajas de acrílico (Plexiglas) a temperatura ambiente (24-26°C) en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12h con libre acceso a alimentos y agua. Se formaron 5 grupos experimentales, los cuales recibieron vía intraperitoneal los tratamientos indicados en la figura 7:

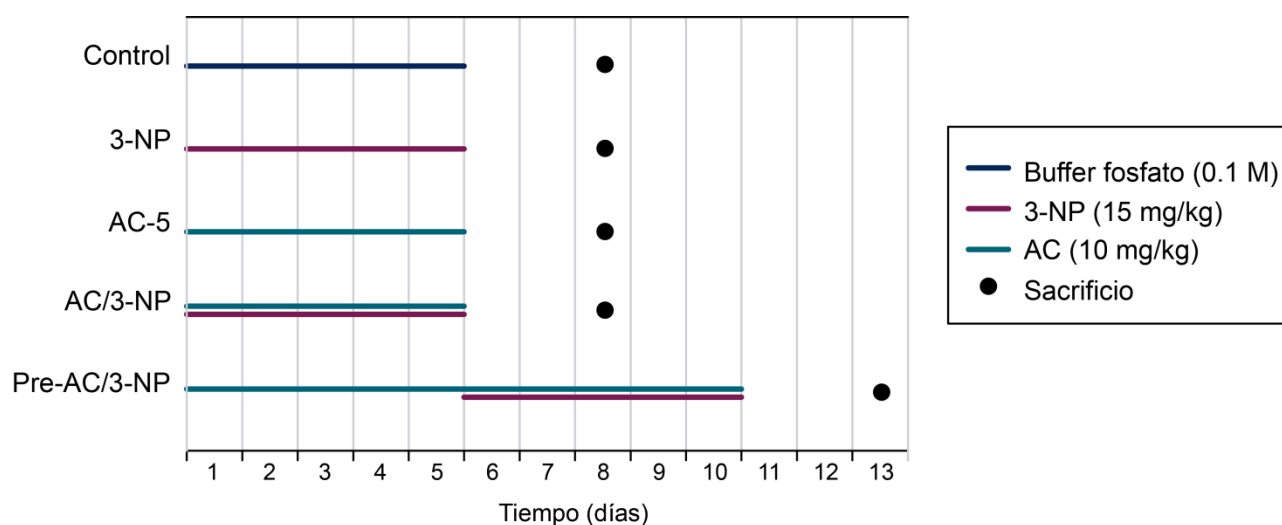


Figura 7. Esquema de tratamientos aplicados a cada uno de los grupos experimentales. Las dosis fueron administradas vía intraperitoneal una vez al día según la duración del tratamiento del grupo correspondiente. El grupo Control recibió una inyección diaria de solución buffer fosfato 0.1 M (vehículo) durante 5 días. El grupo 3-NP recibió, durante 5 días, una inyección diaria de 3-NP a una concentración de 15 mg/kg. El grupo AC-5 recibió una dosis diaria de ácido caféico (10 mg/kg) durante un periodo de 5 días. El grupo AC/3-NP recibió conjuntamente, durante 5 días, dos inyecciones: la primera de ellas fue de ácido caféico (10 mg/kg) y la segunda de 3-NP (15 mg/kg). Finalmente, el grupo Pre-AC/3-NP recibió un pretratamiento de 5 días con ácido caféico (10 mg/kg), seguido de 5 días de aplicación conjunta de ácido caféico (10 mg/kg) y 3-NP (15 mg/kg).

5.3. Obtención del tejido cerebral

Dos días después de la última dosis de tratamiento; los ratones fueron anestesiados con éter y sacrificados por decapitación. Se extrajo el cerebro de los organismos, y se mantuvo en solución salina baja en calcio (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 y 10 mM glucosa; pH 7.4), oxigenada (95% O_2) y a baja temperatura (4°C); posteriormente, se retiraron el cerebelo y los bulbos olfatorios; se separaron ambos hemisferios y se obtuvieron cortes sagitales de 400 micras de grosor en un vibratomo (PELCO, 1000 Plus Sectioning System). Todo el procedimiento de obtención de rebanadas cerebrales se realizó en la solución salina baja en calcio previamente mencionada. Una vez obtenidas las rebanadas, éstas se mantuvieron en reposo en solución salina de Krebs (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 26 mM NaHCO_3 , 0.2 mM tiurea, 0.2 mM ácido ascórbico, y 10 mM glucosa; pH 7.4), oxigenada al 95% y a temperatura ambiente. Al cabo de 1 a 2 horas, las rebanadas de cerebro fueron utilizadas para la obtención de registro electrofisiológico (Mendoza *et al.*, 2014).

5.4. Registro electrofisiológico

Las rebanadas de cerebro obtenidas se llevaron a una cámara de inmersión con flujo constante de solución fisiológica de Krebs (1-1.5 ml/min), oxigenada (95% O_2 y 5% CO_2) y a una temperatura de 34°C. Todos los experimentos se llevaron a cabo en presencia de bicuculina (compuesto utilizado para bloquear las respuestas inhibitorias producidas por GABA) a una concentración de 10 μM .

Para este proyecto se obtuvieron registros extracelulares, esto significa que se obtuvo la respuesta de la actividad conjunta y sincronizada de un grupo de células denominado población

neuronal. Para la obtención de estos registros electrofisiológicos se emplearon dos electrodos. El primero fue un electrodo de estimulación bipolar que se colocó en el cuerpo calloso, en la región dorsal del estriado. El segundo electrodo (elaborado de borosilicato y lleno con la misma solución fisiológica de Krebs) se empleó para registrar las respuestas sinápticas poblacionales (RSP) en el estriado dorsal.

Las RSP se obtuvieron empleando el protocolo por pulso pareado (PPP) (Apéndice 2). De manera breve, el PPP consiste en dar dos pulsos de la misma intensidad y duración, la separación entre cada uno de los pulsos fue de 50 ms; este protocolo se utilizó para observar cambios en la facilitación sináptica y determinar si la modulación de BDNF ocurría de manera presináptica o postsináptica. Cabe mencionar que las respuestas a los diferentes estímulos del PPP se consideraron de la siguiente manera: RSP1 (respuesta sináptica poblacional al estímulo 1) y RSP2 (respuesta sináptica poblacional al estímulo 2).

De cada registro obtenido se elaboró una curva intensidad-amplitud, esto con la intención de conocer la intensidad de estimulación mínima necesaria para evocar una RSP, así como la amplitud máxima de dicha respuesta. La intensidad de estimulación aplicada se encontró en un rango de 10 a 40 V, y una duración de 80 a 200 μ S. Con base en dichos parámetros, se procedieron a grabar las RSP con una intensidad de estimulación media durante un periodo de 35 a 40 minutos.

5.5. Modulación de BDNF

Para determinar la actividad neuromodulatoria de la neurotrofina BDNF se realizó lo siguiente: una vez determinada la intensidad de estimulación y amplitud media de la RSP, se grabaron 10 minutos de control durante los cuales se procuró que la amplitud media de las RSP se mantuviera estable. Solo los registros que cumplieron con esta condición fueron utilizados para determinar la neuromodulación de BDNF. Transcurridos los 10 minutos de control, se añadió al flujo de solución fisiológica de Krebs el BDNF en una concentración de 20 ng/ml. Los posibles cambios en la actividad sináptica poblacional se registraron durante un periodo de 20 a 30 minutos después de la adición de la neurotrofina al medio.

5.6. Análisis de los resultados

Los datos obtenidos fueron procesados con los programas Origin 9.1 y SigmaPlot 12.0 para la realización del análisis estadístico. Se compararon tanto la amplitud de la RSP1 (la cual fue

normalizada al 100% para cada uno de los grupos), como la relación de pulso pareado (PPR; Apéndice 2); y se consideraron los primeros y últimos 10 minutos de cada uno de los experimentos.

Para la evaluación de la modulación de BDNF, a cada grupo se le realizó una prueba de t pareada, con la intención de saber si existieron diferencias en la amplitud de RSP1 antes y después de la adición de la neurotrofina. La misma prueba se realizó para conocer los posibles cambios en el PPR bajo las mismas condiciones.

Finalmente, para establecer posibles diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento, los datos fueron evaluados con las pruebas no paramétricas de Kolmogorov-Smirnov y Kruskal-Wallis.

6. RESULTADOS

6.1. La amplitud de la RSP1 varía según el grupo de tratamiento

Como primer paso, para cada uno de los registros obtenidos, se elaboró una curva intensidad-amplitud, ésta establece la relación existente entre la intensidad de estimulación aplicada y la magnitud de la RSP evocada. La intención de obtener estas curvas intensidad-amplitud, fue la de conocer la intensidad de estimulación necesaria para obtener la amplitud media de las RSP y así poder observar los posibles cambios debidos a la modulación de BDNF. En la figura 8A se muestran las curvas intensidad-amplitud obtenidas de los diferentes grupos de tratamiento. En la mayoría de los grupos (a excepción de AC-5) la amplitud máxima de la RSP1 se encontró a 2x (2 umbral), a pesar de que a dicho umbral la amplitud de la RSP1 del grupo 3-NP tiende a ser menor en comparación con el resto de los grupos, éste presentó diferencias estadísticas únicamente con el grupo AC-5 ($t=4.884$, $P<0.001$; Apéndice 3).

Además de las diferencias con el grupo 3-NP, el grupo AC-5 también mostró diferencias significativas con el resto de los grupos de tratamiento (figura 8); a partir de esto se puede deducir que el tratamiento sistémico con AC incrementa la amplitud de la respuesta sináptica.

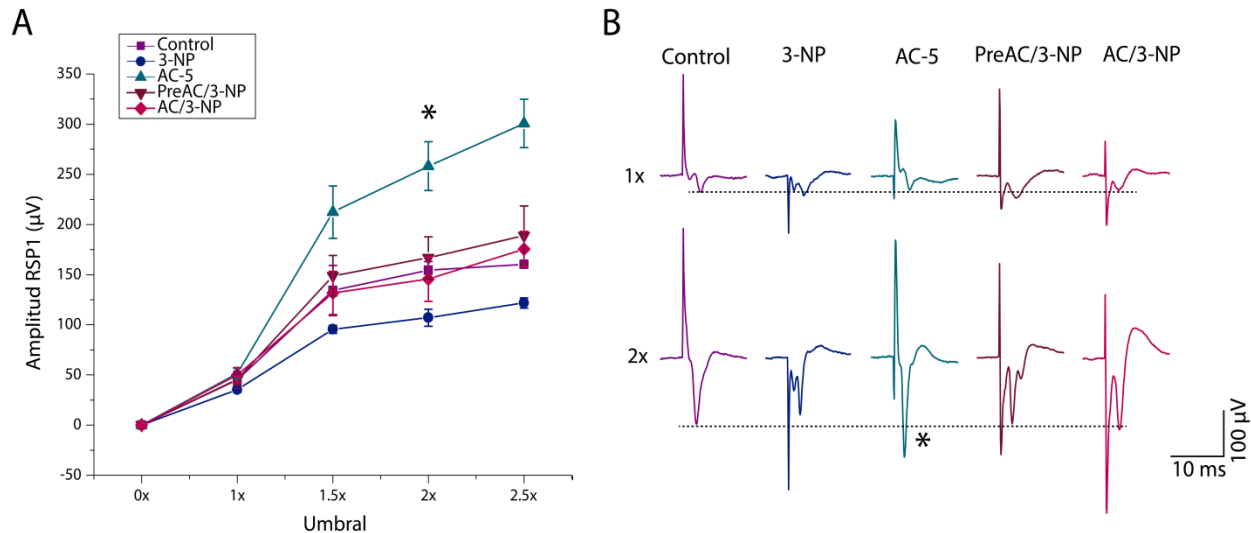


Figura 8. Curvas intensidad-amplitud obtenidas de los diferentes grupos de tratamiento. En **A)** se observa la amplitud de la RSP1 (μV) obtenida de cada uno de los grupos de tratamiento en función de la intensidad de estimulación aplicada, esta última se expresó en múltiplos umbral, donde 1x representa el voltaje mínimo necesario para producir una respuesta. Control ($n=5$; promedio \pm SEM), 3-NP ($n=6$; promedio \pm SEM), AC-5 ($n=11$; promedio \pm SEM), PreAC/3-NP ($n=7$; promedio \pm SEM), y AC/3-NP ($n=9$; promedio \pm SEM). En **B)** se muestran trazos representativos para el umbral 1x y 2.5x de cada uno de los grupos de tratamiento, las líneas punteadas indican una comparación entre la amplitud de las RSP1 del

grupo Control y el resto de los grupos. * Diferencia significativa con respecto al resto de los grupos ($P < 0.050$).

6.2. La amplitud de la RSP1 se mantiene estable durante el transcurso de los experimentos

Para garantizar que los cambios observados en la amplitud de la RSP1 son debidos a un efecto modulador de la neurotrofina (BDNF) y no a cambios propios de las poblaciones neuronales, se obtuvieron registros control para cada uno de los grupos de tratamiento. Como se observa en la figura 9A, la respuesta sináptica poblacional se mantuvo estable durante los 30 minutos en los que se grabaron los registros electrofisiológicos, de modo que ninguno de los grupos presentó variaciones en la amplitud de la RSP1 durante dicho periodo.

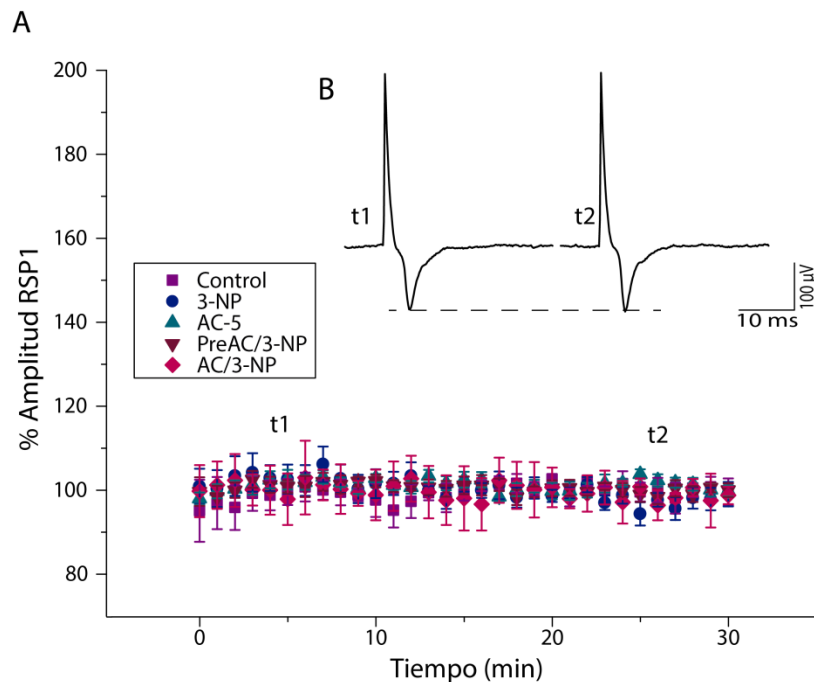


Figura 9. Registros control de los diferentes grupos de tratamiento. En **A)** se muestra el curso temporal de la amplitud de la RSP1 normalizada al 100% de cada uno de los grupos. Control ($n=4$, promedio \pm SEM), 3-NP ($n=8$, promedio \pm SEM), AC-5 ($n=9$, promedio \pm SEM), PreAC/3-NP ($n=8$, promedio \pm SEM), y AC/3-NP ($n=5$, promedio \pm SEM). En **B)** se muestran trazos representativos del grupo Control, en el tiempo 1 (t_1 , 5 minutos) y en el tiempo 2 (t_2 , 25 minutos) del curso temporal.

6.3. Modulación de BDNF en los grupos Control y 3-NP

Previamente, se ha visto que BDNF modula la actividad sináptica corticoestriatal, incrementando la amplitud de las RSP a una concentración de 50 ng/ml; y que en tejido de ratones tratados sistémicamente con 3-NP, se disminuye la actividad neuromodulatoria ejercida por esta neurotrofina (Mendoza *et al.*, 2014). Para este proyecto se procedió a evaluar si BDNF ejerce una actividad moduladora sobre la actividad sináptica corticoestriatal a una concentración menor a la previamente reportada. En el grupo Control se observó que la adición de la

neurotrofina a una concentración de 20 ng/ml produjo un efecto modulador diferencial sobre la respuesta sináptica corticoestriatal (figura 10A), de modo que en el 57.17% de los experimentos (Control_{DIS}) se observó una disminución en la amplitud de la RSP1, mientras que en el 42.86% restante (Control_{INC}) se observó un incremento en la amplitud de la RSP1.

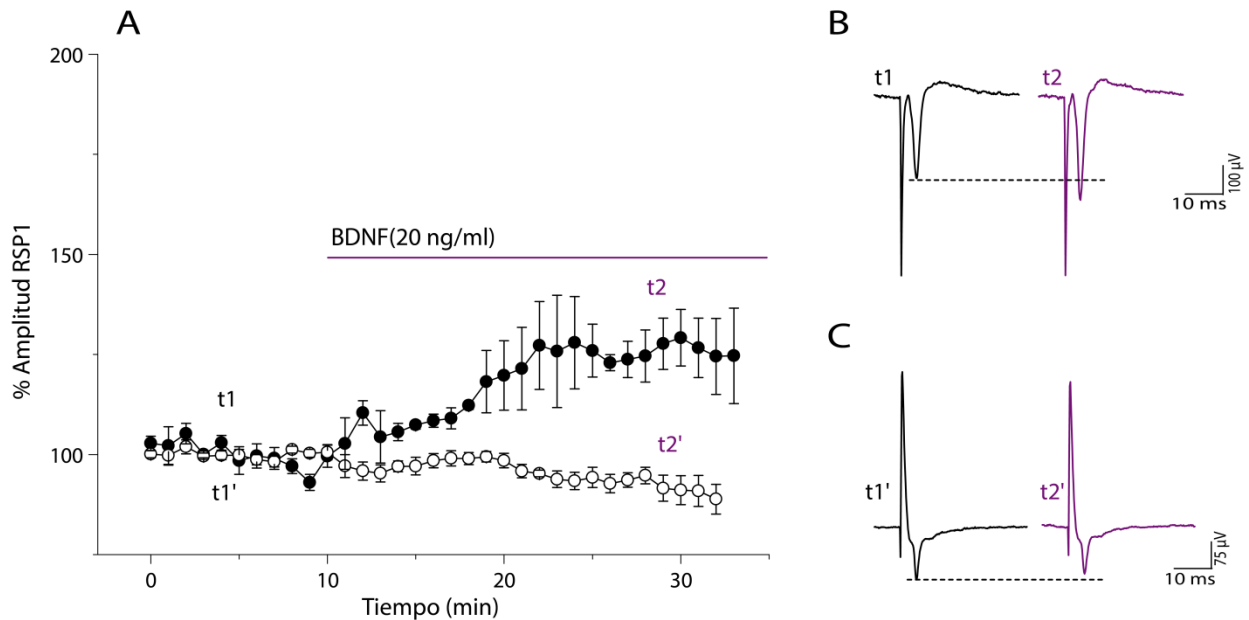


Figura 10. Efecto modulador diferencial de BDNF (20 ng/ml) sobre la actividad sináptica corticoestriatal en el grupo Control. En **A)** se muestra el curso temporal de la amplitud de la RSP1 normalizada al 100%. La neurotrofina tuvo un efecto modulador diferencial, como se puede observar: en círculos negros se representa al subgrupo Control_{INC}; en el cual se observa un incremento en la amplitud de la RSP1, que corresponde al 42.86% de los experimentos (n=3, promedio±SEM). Mientras que, en círculos blancos se representa al subgrupo Control_{DIS}; en el cual ocurrió una disminución en la amplitud de la RSP1, que corresponde al 57.17% de los experimentos elaborados (n=4; promedio±SEM). En **B)** se muestran trazos representativos del subgrupo Control_{INC}, el trazo en negro corresponde a la amplitud de la RSP1 antes de la adición de BDNF (t1), el trazo en color corresponde a la amplitud de la RSP1 después de la adición de BDNF (t2). En **C)** se muestran trazos representativos Control_{DIS}, el trazo en negro corresponde a la amplitud de la RSP1 antes de la adición de BDNF (t1'), el trazo en color corresponde a la amplitud de la RSP1 después de la adición de BDNF (t2').

En el subgrupo Control_{DIS}, ocurrió una disminución en la amplitud de la RSP1 del 7.245% (±0.727%) (promedio±SEM, figura 11A). Dicha disminución mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con la amplitud de la RSP1 antes de la adición de la neurotrofina ($t_{10}=9.970$, $P<0.001$). Por otra parte, en el subgrupo Control_{INC}, se observó un incremento de la

RSP1 del 25.791% ($\pm 1.119\%$) (promedio \pm SEM, figura 11B). Para este subgrupo, se encontró además, que existen diferencias estadísticamente significativas en la amplitud de la RSP1 antes y después de la aplicación de BDNF ($t_{10}=-23.054$, $P=<0.001$).

Para conocer si la modulación de BDNF ocurre de manera pre- o postsináptica, se evaluó la relación por pulso pareado (PPR) antes y después de la adición de BDNF al medio. En ninguno de los subgrupos del grupo Control se encontró un cambio significativo en el PPR (Control_{DIS}: $W=2.000$, $P=0.875$; Control_{INC}: $t_2=3.526$, $P=0.072$; figura 11C y D); lo cual sugiere que la modulación diferencial de BDNF ocurre de manera postsináptica.

Por otra parte, en el grupo 3-NP se observó que al contrario que en el grupo Control, BDNF (20 ng/ml) no mostró una modulación diferencial, debido a que en el 100% de los experimentos se observó un incremento en la amplitud de la RSP1 (figura 12A). Dicho incremento fue del 4.060% ($\pm 1.058\%$) (promedio \pm SEM, figura 12B); y se encontró que existe una diferencia significativa en la amplitud de la RSP1 tras la adición de la neurotrofina ($t_{10}=-3.836$, $P=0.003$). Asimismo, en este grupo se observó que BDNF no provocó un cambio significativo en el PPR después de su adición al medio ($t_4=2.195$, $P=0.093$; figura 12C), el cual indicaría que la acción de BDNF ocurre en la postsinapsis.

La comparación en la amplitud de la RSP1 entre los diferentes subgrupos del grupo Control y el grupo 3-NP (Figura 18), después de la administración de BDNF (20 ng/ml), arrojó la siguiente información: la disminución en la RSP1 observada en el subgrupo Control_{DIS}, es estadísticamente diferente del incremento en la amplitud de la RSP1 observado en el grupo 3-NP. Asimismo, el incremento de la amplitud de la RSP1 del subgrupo Control_{INC} fue estadísticamente diferente del incremento producido por BDNF en el grupo 3-NP en la amplitud de la RSP1 ($H_4=40.998$, $P<0.05$, Kruskal-Wallis, Análisis de Varianza de una vía) (Apéndice 3)

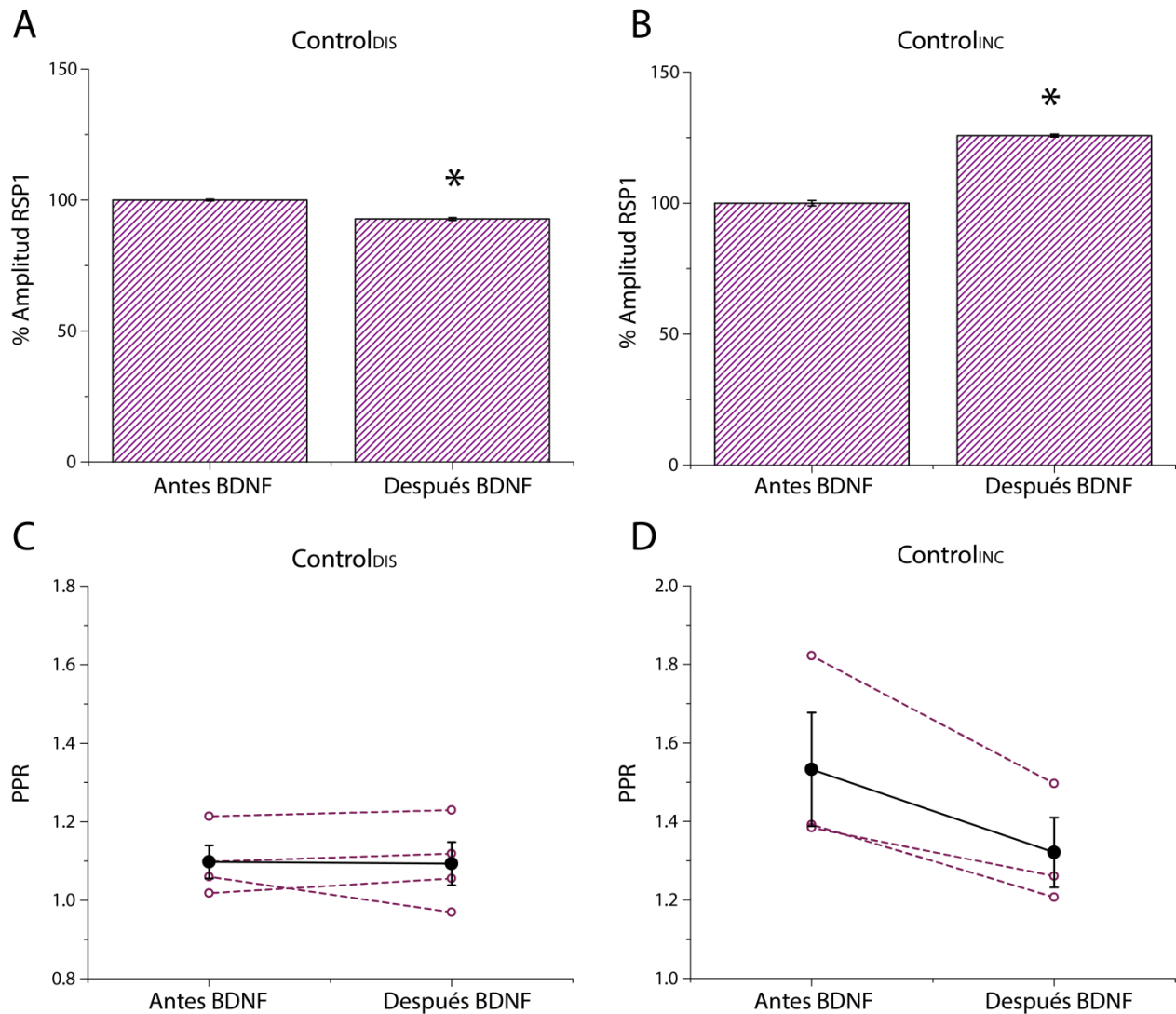


Figura 11. Cambios en la amplitud de la RSP1 y en el PPR en los diferentes subgrupos identificados en el grupo Control. En **A)** se observa que en el subgrupo Control_{DIS}, ocurrió una disminución del 7.245% ($\pm 0.727\%$) en la amplitud de la RSP1 ($*P < 0.05$; $n = 4$; promedio \pm SEM); en este subgrupo no se observó un cambio en el PPR, tal como se muestra en **C)**. Por otra parte, en **B)** se observa que, en el caso del subgrupo Control_{INC}, la amplitud de la RSP1 incrementó en un 25.791% ($\pm 1.119\%$) ($*P < 0.05$; $n = 3$; promedio \pm SEM). En **D)** se observa que en este último subgrupo no ocurrió un cambio significativo en el PPR tras la adición de la neurotrofina.

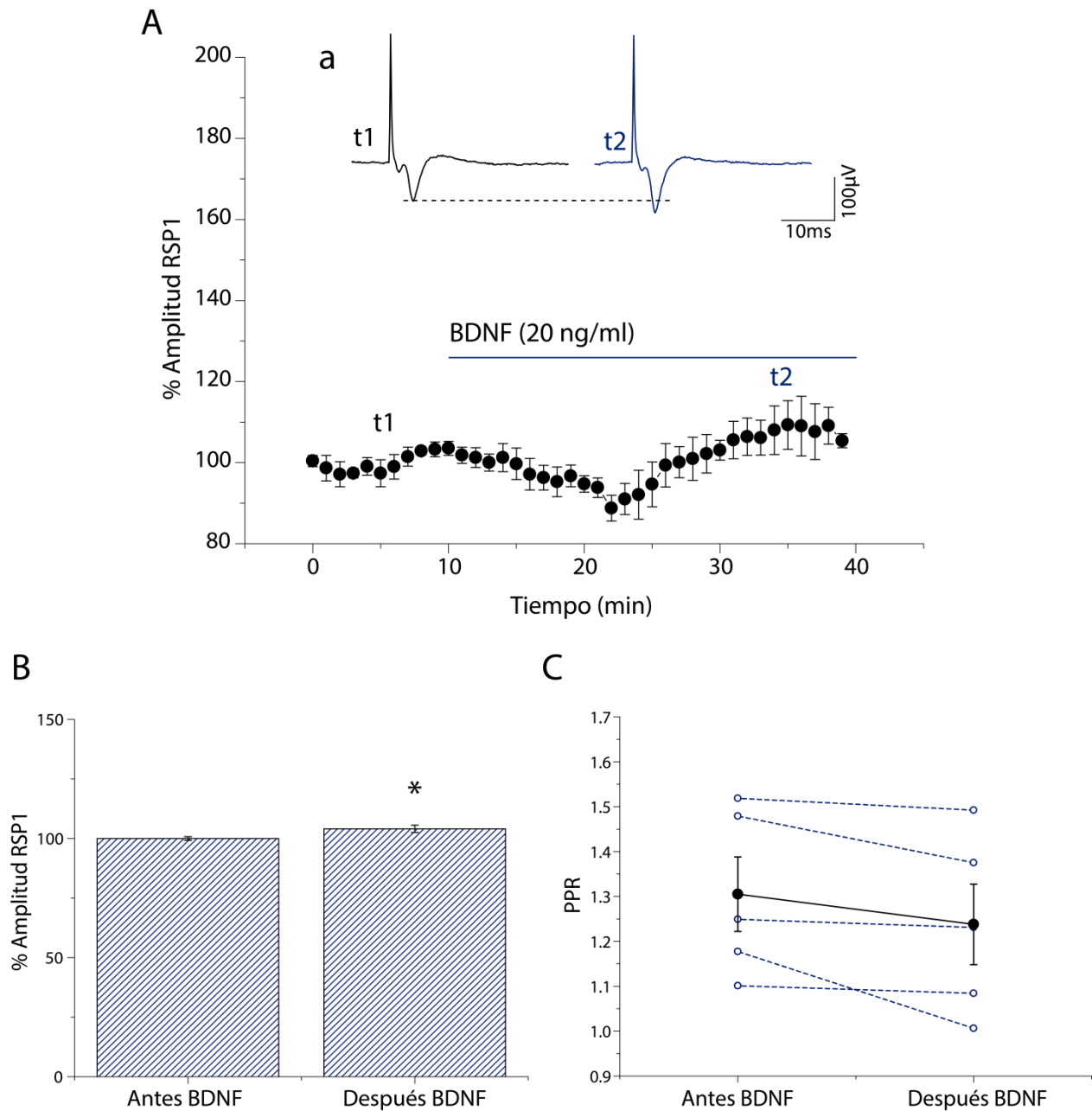


Figura 12. Efecto modulador de BDNF (20 ng/ml) en el grupo 3-NP. En **A**) se muestra el curso de la amplitud de la RSP1 normalizada al 100% ($n=5$, promedio \pm SEM). En **a**) se muestran trazos representativos del curso temporal: el trazo en negro corresponde a la amplitud de la RSP1 antes de la adición de BDNF (t1) y el trazo en color corresponde a la amplitud de la RSP1 después de la adición de BDNF (t2). **B**) BDNF produjo un incremento significativo ($*P=0.003$) del 4.060% ($\pm 1.058\%$) (promedio \pm SEM). **C**) La administración de la neurotrofina no produjo un cambio en el PPR ($n=5$, promedio \pm SEM).

6.4. Modulación de BDNF en el grupo AC-5

Los resultados anteriormente presentados demostraron que una dosis de 20 ng/ml de BDNF es suficiente para producir cambios en la actividad sináptica corticoestriatal tanto en tejido proveniente de ratones control, como en tejido de ratones tratados con 3-NP. En el presente trabajo se buscó comprobar si el AC posee un efecto protector ante la intoxicación con 3-NP, por tal motivo fue importante determinar si el tratamiento con AC por sí sólo producía cambios en la modulación ejercida por BDNF a una baja concentración. En la figura 13A se puede observar que la neurotrofina BDNF produce un incremento en la amplitud de la RSP1 en el 100% de los experimentos elaborados (n=7), dicho incremento observado fue del 31.063%±3.230% (promedio±SEM), y se encontraron diferencias significativas entre la amplitud de la RSP1 antes y después de la adición con la neurotrofina ($t_{10}=-9.617$, $P<0.001$; figura 13B).

Adicionalmente, el análisis del PPR antes y después de la administración de BDNF indicó que no existe un cambio significativo en relación entre la amplitud de la RSP2 y la RSP1 ($t_6=2.311$, $P=0.060$; figura 13C), esto indicaría que la modulación de BDNF en el grupo AC-5 ocurre de manera postsináptica.

Como se pudo apreciar en la figura 12A, la modulación en el grupo AC-5, no produjo dos efectos como en el grupo Control. Sin embargo, sí produjo un incremento en la amplitud de la RSP1, el cual fue significativamente diferente del incremento en el grupo 3-NP, más no del aumento observado en el subgrupo Control_{INC} (Figura 18) ($H_4=40.998$, $P<0.05$, Kruskal-Wallis, Análisis de Varianza de una vía, Apéndice 3). Lo anterior podría estar indicando que, el incremento en la RSP1 en presencia de BDNF tanto en condiciones control, como en el tratamiento sistémico con AC es similar, sin embargo, en comparación con el grupo 3-NP, el AC por sí solo incrementa la modulación de BDNF a una baja concentración.

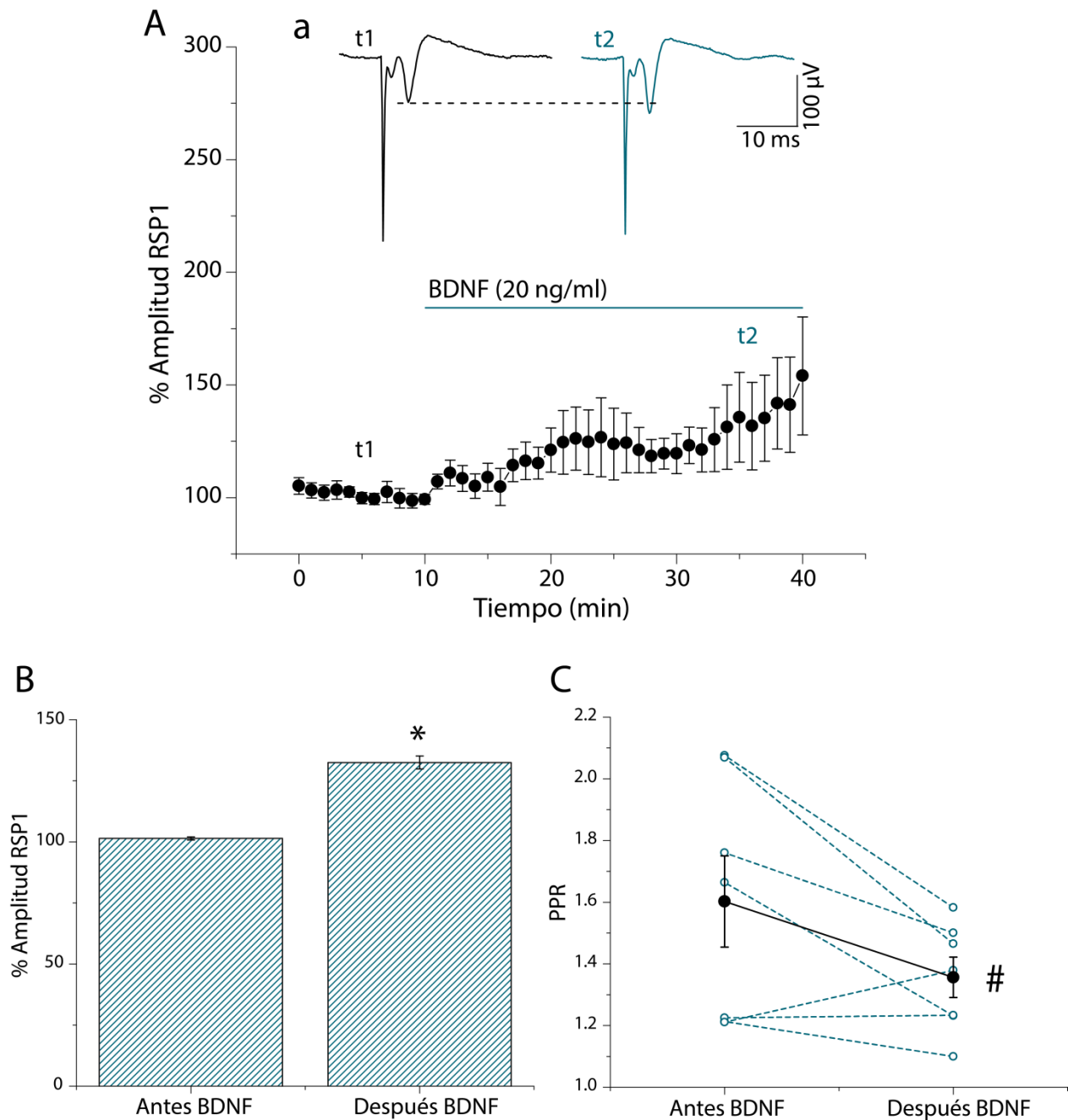


Figura 13. Modulación de BDNF (20 ng/ml) sobre la actividad sináptica corticoestriatal en el grupo AC-5. En **A**) se muestra el curso temporal de la amplitud de la RSP1 normalizada al 100%, ($n=7$, promedio \pm SEM). En **a**) se muestran trazos representativos obtenidos del curso temporal, donde: el trazo en negro corresponde a la amplitud de la RSP1 antes de la administración de BDNF (t1), el trazo en color corresponde a la amplitud de la RSP1 después de la administración de la neurotrofina (t2). En **B**) se puede apreciar que BDNF produjo un incremento significativo en la amplitud de la RSP1 en presencia de BDNF ($P<0.001$; $n=7$, promedio \pm SEM). En **C**) se muestra el PPR antes y después de la adición de la neurotrofina (promedio \pm SEM). # denota que el análisis estadístico arrojó que a pesar de que no existen

diferencias significativas ($P=0.060$), la media muestral del PPR antes de la adición de la BDNF es mayor que la media muestral del PPR en presencia de la neurotrofina en una cantidad mayor que la esperada por casualidad.

6.5. Modulación de BDNF en los grupos de pretratamiento con AC (PreAC/3-NP) y de co-tratamiento con AC y 3-NP (AC/3-NP)

Al conocer que la modulación de la neurotrofina BDNF a una concentración baja (20 ng/ml) parece incrementar en tejido de ratones tratados únicamente con AC, se propusieron dos esquemas de tratamiento con el fin de averiguar si el AC mejora o restablece la modulación *in vitro* de BDNF aún bajas concentraciones de la neurotrofina.

En el caso del pretratamiento con AC seguido de la aplicación conjunta del antioxidante con la neurotoxina 3-NP (grupo PreAC/3-NP), se observó que BDNF ejerció un efecto modulador diferencial tal como se muestra en la figura 14A; el primer subgrupo considerado PreAC/3-NP_{INC}, representa el 63.64% de los experimentos ($n=7$), en éste se observó un marcado incremento en la amplitud de la RSP1 tras la adición de la neurotrofina, dicho incremento en la respuesta sináptica fue del $32.477\% \pm 2.560\%$ ($n=7$; promedio \pm SEM), y fue estadísticamente significativo ($t_{10}=-12.688$, $P=<0.001$; figura 14D).

El segundo subgrupo (PreAC/3-NP_{NE}) identificado para el grupo de pretratamiento con AC representó el 36.36% de los experimentos ($n=4$), este subgrupo fue separado debido a que no se observaba un cambio evidente en la amplitud de la RSP1 durante el curso temporal (figura 14A, círculos blancos), no obstante el análisis estadístico arrojó que en presencia de BDNF ocurre un leve incremento en respuesta sináptica del $3.301\% \pm 0.565\%$ ($n=4$, promedio \pm SEM) el cual es significativamente diferente ($t_{10}=-5.847$, $P=<0.001$; figura 14E).

En cuanto al análisis del PPR en los distintos subgrupos identificados en el grupo PreAC/3-NP se encontró que en el subgrupo PreAC/3-NP_{INC} ocurrió un cambio significativo en el PPR tras el tratamiento con BDNF ($t_6=3.966$; $P=0.007$; figura 14F). De igual manera, en el subgrupo PreAC/3-NP_{NE} se encontró que existe un cambio muy sutil, pero estadísticamente significativo ($t_3=4.094$, $P=0.026$; figura 14G) en el PPR antes y después de la presencia de BDNF en el medio. Lo anterior demuestra que, por lo menos en el grupo PreAC/3-NP, BDNF tiende a incrementar la RSP, ya sea de manera notoria o sutil; y en ambos casos la modulación de la neurotrofina ocurre mediante mecanismos presinápticos.

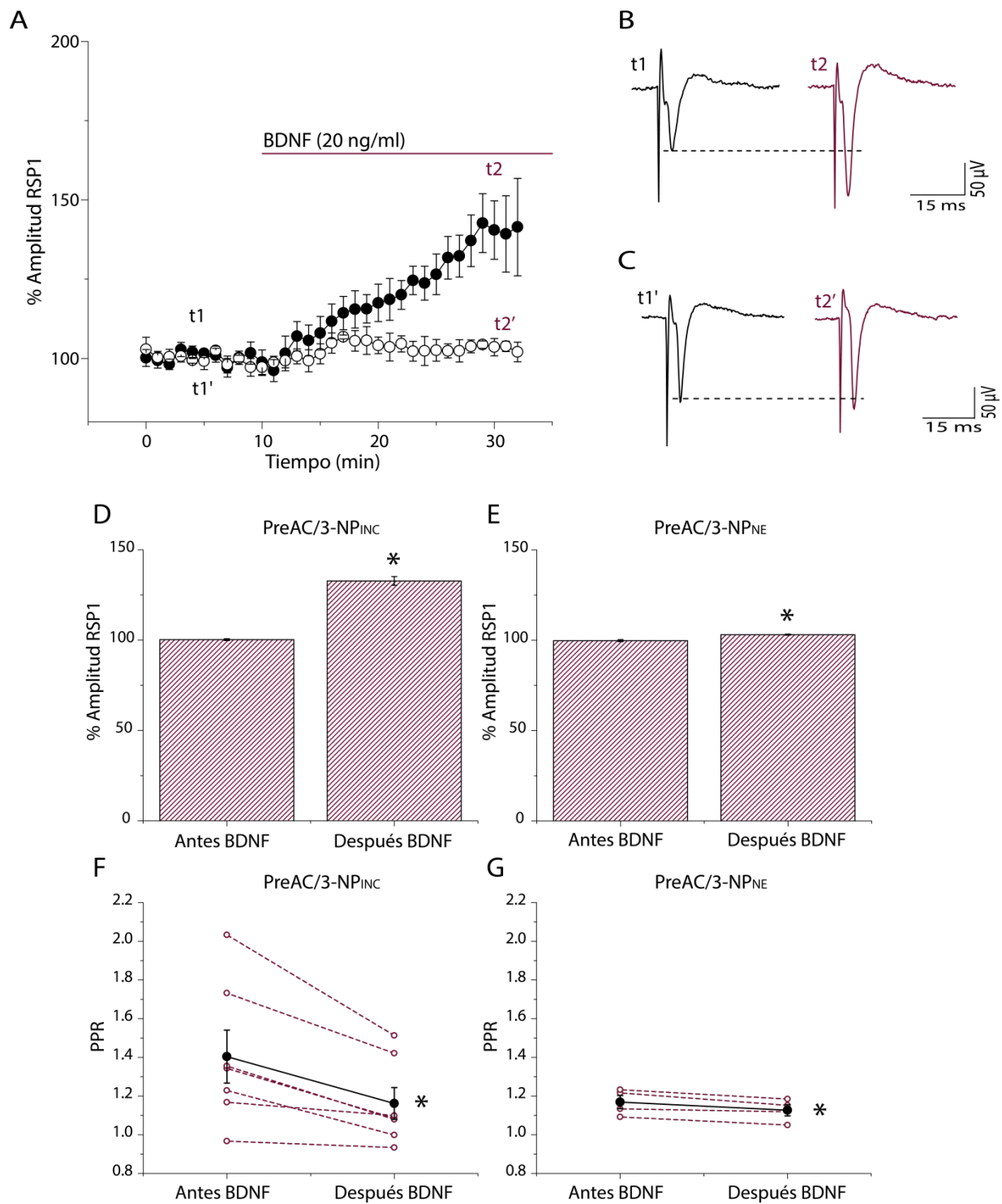


Figura 14. Modulación diferencial de BDNF (20 ng/ml) sobre RSP corticoestriatal en el grupo PreAC/3-NP. En **A**) se muestra el curso temporal de la amplitud de la RSP1 normalizada al 100%. BDNF mostró tener un efecto modulador diferencial, de modo que se pudieron distinguir dos subgrupos: PreAC/3-

NP_{INC} (en círculos negros, n=7, promedio±SEM) y PreAC/3-NP_{NE} (en círculos blancos, n=4, promedio±SEM); en ambos subgrupos la amplitud de la RSP1 crece en presencia de BDNF, sin embargo, en el caso del subgrupo PreAC/3-NP_{NE} lo hace de manera más sutil en comparación con el subgrupo PreAC/3-NP_{INC}. En **B**) se muestran trazos representativos del subgrupo PreAC/3-NP_{INC}, el trazo en negro corresponde al periodo previo a la aplicación de la neurotrofina (t1), mientras el trazo en color representa la amplitud de la RSP1 en presencia de BDNF (t2). En **C**) se muestran trazos representativos del subgrupo PreAC/3-NP_{NE}, el trazo en negro corresponde a la amplitud de la RSP1 antes de la adición de BDNF (t1'), el trazo en color corresponde a la amplitud de la RSP1 después de la adición de BDNF (t2'). En **D**) se observa que en el subgrupo PreAC/3-NP_{INC}, ocurrió un incremento del 32.477%±2.560% (*P<0.001; n=7; promedio±SEM) en la amplitud de la RSP1; en este subgrupo se observó un cambio significativo en el PPR, tal como se muestra en **F**) (*P=0.007; n=7; promedio±SEM). Por otra parte, en **E**) se observa un menor incremento (del 3.301%±0.565%; n=4, promedio±SEM) de la RSP en el subgrupo PreAC/3-NP_{NE}, el cual es significativo (*P<0.001). El PPR de este último subgrupo se muestra en **G**), donde también ocurrió un cambio significativo en la relación por pulso pareado (*P=0.026; n=4, promedio±SEM).

Por otra parte, en el caso del co-tratamiento con 3-NP y AC se observó que nuevamente, BDNF tuvo un efecto diferencial sobre la respuesta sináptica corticoestriatal (figura 15). En el primer subgrupo identificado (AC/3-NP_{NE}), que representó 63.64% de los experimentos (n=7), ocurrió un ligero incremento en la respuesta sináptica del 1.497%±0.467% (promedio±SEM), dicho cambio mostró tener diferencias significativas (t₁₀=-3.202, P=0.009; figura 16A). Mientras que el segundo subgrupo identificado (AC/3-NP_{INC}), correspondió al 36.36% de los experimentos (n=4), se observó un incremento en la RSP1 del 48.114%±1.861% (promedio±SEM), el cual fue un cambio estadísticamente significativo (t₁₀=-25.857, P<0.001; figura 16B)

El análisis del PPR antes y después de la adición de BDNF al medio mostró que, en el caso del subgrupo AC/3-NP_{NE} la modulación de la neurotrofina ocurrió en la postsinapsis, esto debido a que no ocurrió un cambio significativo (t₆=1.687, P=0.143; figura 16C) en la relación de pulso pareado en presencia de la neurotrofina. Por su parte, en el subgrupo AC/3-NP_{INC}, el PPR parece disminuir tras la adición de BDNF en el medio (figura 16D), lo cual podría indicar que la acción de la neurotrofina en el incremento de la amplitud de la RSP1 ocurre en la postsinapsis, no obstante el cambio en el PPR no fue estadísticamente significativo (t₃=2.565; P=0.083).

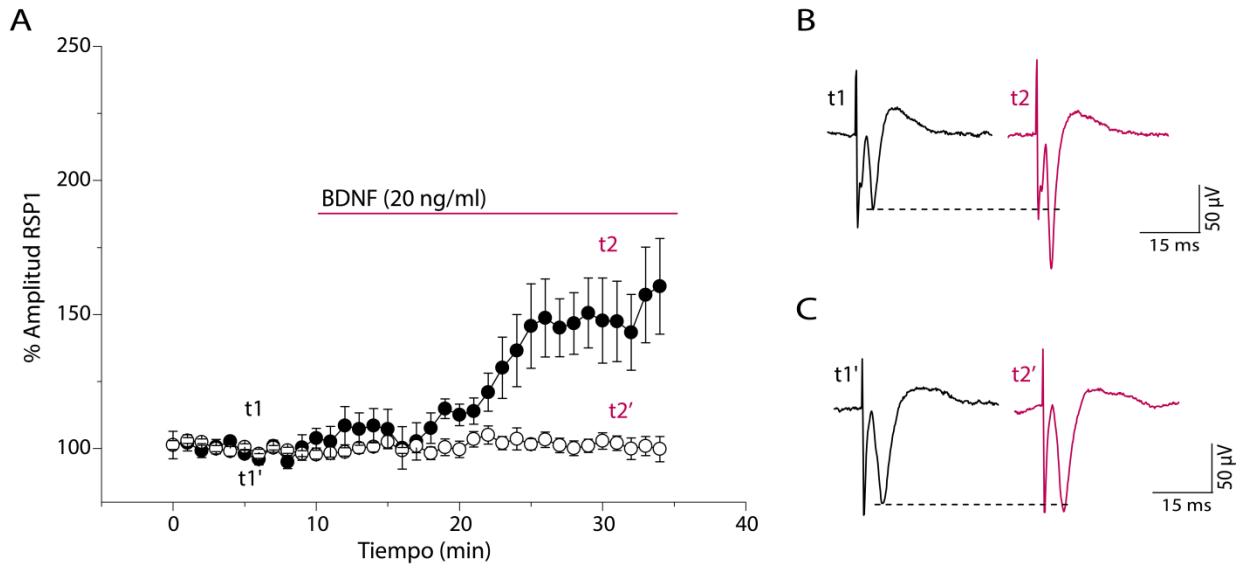


Figura 15. Efecto moduladorio diferencial de BDNF (20 ng/ml) sobre la actividad sináptica corticoestriatal en el grupo AC/3-NP. En **A)** se muestra el curso temporal de la amplitud de la RSP1 normalizada al 100%. La neurotrofina tuvo un efecto moduladorio diferencial: en círculos negros se representa al subgrupo AC/3-NP_{INC}; en el cual se aprecia un incremento en la amplitud de la RSP1, que corresponde al 36.36% de los experimentos (n=4, promedio±SEM). Por otra parte, en círculos blancos se representa al subgrupo AC/3-NP_{NE}; en el cual ocurrió una disminución en la amplitud de la RSP1, que corresponde al 63.64% de los experimentos elaborados (n=7; promedio±SEM). En **B)** se muestran trazos representativos del subgrupo AC/3-NP_{INC}, el trazo en negro corresponde a la amplitud de la RSP1 antes de la adición de BDNF (t1), el trazo en color corresponde a la amplitud de la RSP1 después de la adición de BDNF (t2). En **C)** se muestran trazos representativos AC/3-NP_{NE}, el trazo en negro corresponde a la amplitud de la RSP1 antes de la adición de BDNF (t1'), el trazo en color corresponde a la amplitud de la RSP1 después de la adición de BDNF (t2').

En los dos tratamientos con AC aplicados (PreAC/3-NP y AC/3-NP) se encontró que BDNF a 20 ng/ml prosee un efecto moduladorio diferencial evidente al igual que en el grupo Control, no obstante, en comparación con este último, los subgrupos considerados como NE (no efecto aparente) mostraron un incremento discreto en la amplitud de la RSP1, a diferencia del subgrupo Control_{DIS}, dónde se observó un decremento evidente. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los subgrupos PreAC/3-NP_{NE} y AC/3-NP_{NE}; sin embargo, cada uno de estos subgrupos tuvo diferencias significativas con el subgrupo Control_{DIS} (figura 17) ($H_4=42.849$, $P<0.05$; Kruskal-Wallis, Análisis de Varianza de una vía).

Finalmente, al analizar los subgrupos en los cuales se observó un incremento en la amplitud de la RSP1 se encontró que el subgrupo PreAC/3-NP_{INC} mostró diferencias estadísticamente significativas con los grupos 3-NP y AC/3-NP_{INC}. Mientras que el subgrupo AC/3-NP_{INC}, mostró diferencias significativas tanto con los grupos 3-NP y AC-5, así como con el subgrupo Control_{INC} (figura 17) ($H_4=42.849$, $P<0.05$; Kruskal-Wallis, Análisis de Varianza de una vía, Apéndice 3).

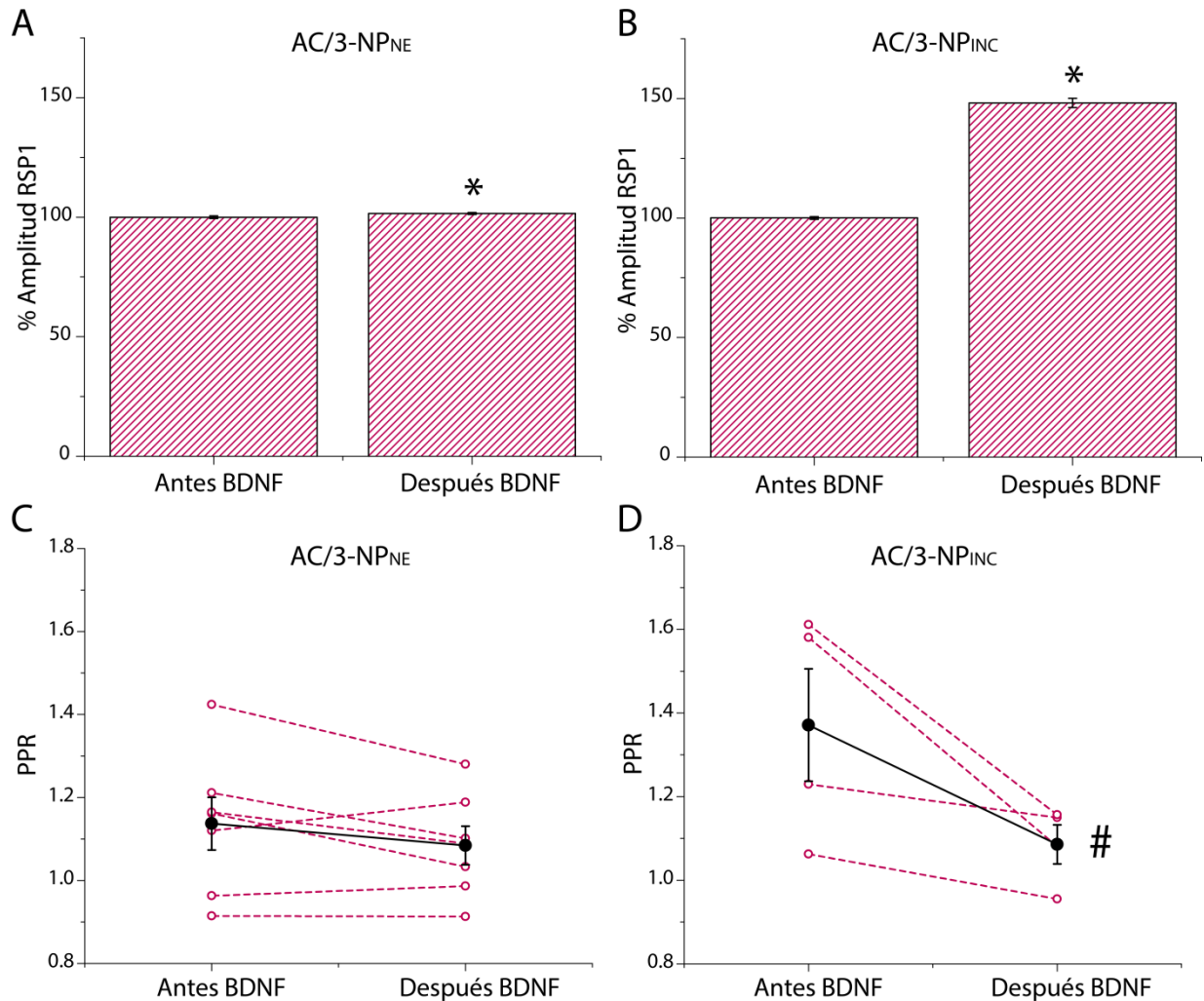


Figura 16. Cambios en la amplitud de la RSP1 y en el PPR en los diferentes subgrupos identificados en el grupo AC/3-NP. En **A)** se observa que el subgrupo AC/3-NP_{NE} ocurrió un ligero incremento del $1.497\pm 0.467\%$ ($n=7$; promedio \pm SEM), el cual resultó ser estadísticamente significativo ($*P=0.009$); en este subgrupo no se encontró un cambio en el PPR (**C)** tras la adición de la neurotrofina ($P=0.143$). Por su parte, en **B)** se observa el incremento ocurrido en el subgrupo AC/3-NP_{INC}, el cual fue del $48.114\pm 1.861\%$ ($n=4$; promedio \pm SEM) y estadísticamente significativo ($*P=<0.001$). En **D)** se muestra que existe una disminución en el PPR en presencia de BDNF, sin embargo dicho cambio no fue significativo ($*P=0.083$).

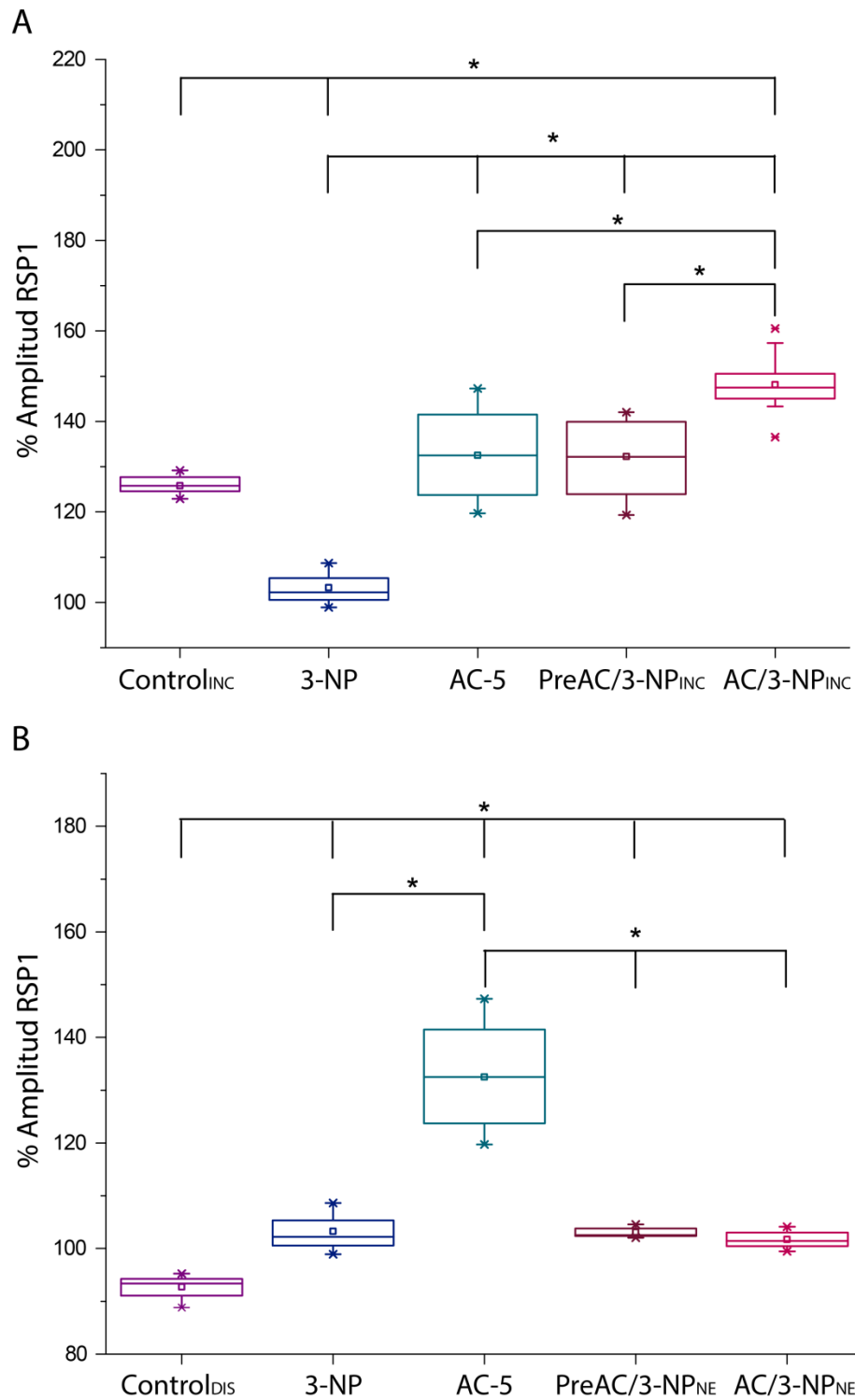


Figura 17. Comparaciones múltiples de la amplitud de la RSP1 tras la adición de BDNF (20 ng/ml) en los diferentes grupos de tratamiento. En **A)** se muestran las comparaciones entre los subgrupos de tratamiento en los cuales se observó un efecto marcado de la neurotrofina.* denota las diferencias estadísticas encontradas ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis, Análisis de Varianza de una vía). En **B)** se muestran

las comparaciones entre los subgrupos en los cuales no se observó un efecto de BDNF o en los cuales la neurotrofina provocó una disminución de la RSP1. * denota las diferencias estadísticas encontradas ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis, Análisis de Varianza de una vía).

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto protector del AC en la transmisión sináptica corticoestriatal

En el presente trabajo se mostró que el tratamiento *in vivo* con la toxina 3-NP genera cambios en la transmisión sináptica corticoestriatal, ya que la amplitud máxima de las RSP registradas en tejido proveniente de ratones tratados con 3-NP tiende a ser menor en comparación con las RSP registradas en tejido de ratones control. Estos cambios en la transmisión sináptica corticoestriatal habían sido previamente reportados por Mendoza *et al.* (2014); quienes encontraron que, en ratones tratados sistémicamente con el 3-NP, ocurre un cambio en los umbrales de estimulación necesarios para evocar una RSP, siendo necesario un mayor voltaje de estimulación en comparación con el tejido proveniente de ratones control. En relación con lo anterior, el presente trabajo muestra que los esquemas de tratamiento con AC (PreAC/3-NP y AC/3-NP), parecen mantener las propiedades de estimulación de las poblaciones neuronales estriatales de manera muy similar a las condiciones control, sugiriendo un efecto neuroprotector del AC frente a la degeneración estriatal producida por la intoxicación con 3-NP.

Se tiene evidencia de que el 3-NP produce un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como aniones superóxido y radicales hidroxilo; moléculas altamente reactivas derivadas de la formación de óxido nítrico (NO), como el peroxinitrito (ONOO^-), así como una disminución en la actividad de enzimas de respuesta antioxidante tales como CAT, GPX y SOD (Bak *et al.*, 2016; Hernández-Echeagaray *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2010; Liot *et al.*, 2009; Brouillet *et al.*, 2005), estos eventos conducirían al daño oxidativo celular. De acuerdo con los datos obtenidos de las curvas intensidad-amplitud (figura 8), el AC, en el modelo del 3-NP, podría estar mitigando el daño oxidativo producido por la neurotoxina debido a su actividad antioxidante. Diversos estudios señalan que el tratamiento *in vitro* e *in vivo* con AC previene la peroxidación lipídica y suprime la formación de NO ante agentes estresores como LPS (Mallik *et al.*, 2016), H_2O_2 (Gul *et al.*, 2016), STZ (Deshmukh *et al.*, 2016), isquemia cerebral global (Liang *et al.*, 2015), proteína β amiloide ($\text{A}\beta$) (Kim *et al.*, 2015), Fe^{2+} , nitroprusiato de sodio y AQ (Obloh *et al.*, 2013; Kalonia *et al.*, 2009); adicionalmente, se ha reportado que, además de reducir los marcadores de estrés oxidativo mencionados

anteriormente, el AC actúa incrementando los niveles de antioxidantes endógenos, tales como CAT, GSH y SOD (Wang *et al.*, 2016; Mallik *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2015; Kalonia *et al.*, 2009).

Con respecto a lo anterior, en un estudio teórico se encontró que el AC, en su interacción directa con las ROS puede actuar como eliminador de radicales (ej. OH[•]) mediante dos mecanismos: la transferencia de un átomo de hidrógeno o la formación de un aducto, siendo el grupo hidroxilo del carbono 4 de su anillo aromático el sitio más reactivo en dicha actividad (Leopoldini *et al.*, 2011). Otro mecanismo antioxidante del AC es su actividad como quelante de Fe²⁺ y Cu²⁺ (Akomolafe *et al.* 2017); otras moléculas con esta última propiedad (ej. diacetil bis (N (4) -metiltiosemicarbazonato) Cu (II), Cull (atm), desferrioxamina B y ácido rodotorulico) han sido utilizadas en la prevención del daño oxidativo, ya que intervienen en reacciones que conducen a la producción de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2015; Leopoldini *et al.*, 2011).

Pese a que la actividad antioxidante del AC ha sido reportada como el principal mecanismo neuroprotector del AC, diferentes estudios señalan que esta molécula puede interactuar con distintas enzimas, entre ellas: la cinasa ERK, la 5-LO y la AChE. A continuación se mencionará parte de la evidencia existente de dichas interacciones y de qué manera podrían contribuir como mecanismo de neuroprotección en el modelo farmacológico de la EH.

En primer lugar, un estudio elaborado por Yang *et al.* (2014), identificó a ERK1/2 como una molécula blanco del AC en su efecto quimiopreventivo contra el desarrollo de cáncer de piel inducido por radiación solar ultravioleta en ratones. En este mismo estudio se resolvió la estructura de cocrystal del complejo formado por ERK y el AC, y se encontró que el AC forma puentes de hidrógeno con el sitio de unión a ATP de la enzima, promoviendo su inhibición. No obstante, otros estudios han señalado que el AC potencia la diferenciación celular inducida con NGF en cultivos de células PC12 (Moosavi *et al.*, 2017); y promueve la supervivencia celular en condiciones de privación de suero y ante la toxicidad de la acroleína y A β , se corroboró que estos efectos fueron mediados por la activación de la vía de señalización de MEK/ERK (Moosavi *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2013; Sul *et al.*, 2009).

La activación de la vía de señalización de MEK/ERK se ha asociado a la regulación transcripcional de BDNF (Ramírez *et al.* 2015). La expresión de esta neurotrofina y de su receptor TrkB se ha visto alterada en corteza y estriado de ratones tratados sistémicamente con

3-NP (Mendoza *et al.*, 2014; Espíndola *et al.*, 2012). Es posible que el AC, al interactuar con ERK, prevenga las alteraciones en la expresión de BDNF provocadas por el 3-NP; este mismo efecto del AC en la prevención de la disminución de dicha neurotrofina ha sido previamente reportado por otros grupos de trabajo en diferentes modelos de trastornos relacionados al sistema nervioso (Luo *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2011; Dzitoyeva *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2006).

No obstante, la vía de señalización de MEK/ERK, no ha sido la única asociada al mantenimiento de los niveles de BDNF mediados por el AC en otros modelos. Por ejemplo, se ha demostrado que, en bajas dosis, el pretratamiento con AC puede atenuar la disminución en la expresión de RNAm de BDNF en la corteza frontal de ratones sometidos a la prueba de nado forzado (Takeda *et al.*, 2006). Posteriormente, en ese mismo modelo, se reportó que en ratones que no expresan la 5-LO, el AC no mitigó la disminución del RNAm de BDNF; sugiriendo entonces un posible mecanismo regulatorio del AC en la transcripción de BDNF a través de la interacción de este metabolito con la 5-LO (Dzitoyeva *et al.*, 2008).

Los estudios mencionados previamente sugieren que la interacción entre el AC con ERK y con la 5-LO, en ambos casos resulta en la regulación transcripcional de BDNF; esto resulta de suma importancia para el efecto protector del AC observado en los grupos PreAC/3-NP y AC/3-NP, y estaría en relación con el mantenimiento de la arborización dendrítica de las NEMs, más que a la supervivencia celular, esto debido a que se sabe que, BDNF además de ser un factor importante para la supervivencia de las NEMs estriatales, juega un papel fundamental en la estructura dendrítica de estas mismas células (Baquet *et al.*, 2004); y a que la administración sistémica con la neurotoxina 3-NP produce cambios morfológicos en la arborización dendrítica de las NEMs (Mendoza *et al.*, 2014).

Debido a lo anterior, resultaría interesante indagar si, en el modelo del 3-NP, el AC interactúa con la cinasa ERK y/o con la 5-LO; regulando tanto la expresión de BDNF como la arborización dendrítica de las NEMs, y si es a través de este mecanismo que brinda un efecto neuroprotector. Así como también, saber si a través de este mecanismo, ocurre un cambio en la morfología de las NEMs que pudiera explicar el incremento en la RPS que provoca por sí solo el AC (Grupo AC-5).

Por otra parte, con respecto a la interacción reportada entre el AC y la AchE, diversos estudios señalan que el AC protege a animales de deterioro cognitivo y daño cerebral mediante la

inhibición de la AChE (Akomolafe *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016; Deshmukh *et al.*, 2016; Oboh *et al.*, 2013). De manera particular, en la EH se ha observado que ocurren diversas alteraciones relacionadas con el sistema colinérgico, tanto en tejido postmortem de pacientes con la EH, como en modelos transgénicos y farmacológicos de la enfermedad. Entre dichas alteraciones se encuentran: la disminución de receptores muscarínicos en núcleo caudado, putamen y globo pálido en pacientes con la EH (Wasket y Yamamura, 1978; Wastek *et al.*, 1976), y en corteza y núcleo estriado de ratones transgénicos R6/2 (Cha *et al.*, 1999); además de una disminución en la actividad de la ChAT (enzima encargada de la síntesis de acetilcolina), cerebro post-mortem de pacientes diagnosticados con la EH y en el modelo de intoxicación crónica con el 3-NP (dicha alteración se encuentra correlacionada con el grado de severidad de la patología) (Araujo y Hilt, 1998; Ferrante *et al.*, 1987; Wastek *et al.*, 1976); también se sabe que la actividad de la AChE (enzima encargada de la degradación de acetilcolina), puede no verse afectada o bien incrementar conforme progresa la enfermedad (Manyam *et al.*, 1990; Hammond y Brimijoin, 1988; Ferrante *et al.*, 1987). Por último, ocurre una disminución en los niveles de colina en líquido cefalorraquídeo de pacientes con la enfermedad, la cual podría indicar un déficit en el transporte de colina hacia el cerebro (Manyam *et al.*, 1990).

Lo anteriormente mencionado indica que existe una hipofunción colinérgica en la EH y sus diferentes modelos; por lo cual, el AC como inhibidor de la AChE, podría mitigar la pérdida de la función de la acetilcolina en el sistema nervioso. En relación con lo anterior, se han probado algunos inhibidores reversibles de la AChE, como el donepezilo, rivastigmina y galantamina, para el tratamiento de pacientes sintomáticos de la EH, y se ha encontrado que su acción ayuda a mejorar la función cognitiva de los pacientes, mas no la función motora (Vattakatuchery y Kurien, 2013); sin embargo, Park *et al.* (2008) mostraron que, ante la intoxicación por 3-NP, en estadios relativamente tempranos del proceso de neurodegeneración, la galantamina ofrece un efecto neuroprotector cuyos mecanismos no solo incluyen la inhibición de la AChE, sino también la disminución del estrés oxidativo y la modulación de receptores nicotínicos de acetilcolina. Ambos efectos asociados a la neuroprotección de la galantamina son similares a los atribuidos al AC, por lo cual sería importante indagar si el efecto protector del AC en el modelo farmacológico del 3-NP, involucra de manera directa el mantenimiento de la función colinérgica en el núcleo estriado.

7.2 Efecto moduladorio de BDNF

En el presente trabajo se evaluó la modulación de BDNF en la respuesta glutamatérgica corticoestriatal en tejido proveniente de ratones sometidos a diferentes tratamientos (figura 7) y en condiciones control, a una concentración más baja (20 ng/ml) a la previamente reportada por otros trabajos (Mendoza *et al.*, 2014; Leßmann y Heumann, 1998; Song *et al.*, 1998; Levine *et al.*, 1995); esto para indagar si el tratamiento *in vivo* con AC restauraba y/o mejoraba la modulación de BDNF, aún ante la intoxicación con el 3-NP.

De acuerdo con Mendoza *et al.* (2014); el tratamiento *in vivo* con la neurotoxina 3-NP reduce el efecto moduladorio de BDNF en la sinapsis corticoestriatal; esto probablemente debido a una disminución en el número de receptores TrkB en el núcleo estriado, así como a una reducción en la longitud dendrítica y el número de espinas de las NEMs. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la modulación de BDNF en el grupo tratado con 3-NP (con un incremento de la amplitud de la RSP1 del $4.060\% \pm 1.058\%$; promedio \pm SEM), es significativamente menor en comparación con el grupo Control (Control_{INC}: incremento de la RSP1 del $27.791\% \pm 1.119\%$; promedio \pm SEM), así como el grupo que fue tratado únicamente con AC (incremento de la RSP1 del $31.063\% \pm 3.230\%$; promedio \pm SEM) y los grupos de pre-tratamiento y co-tratamiento con AC y 3-NP (PreAC/3-NP_{INC}: incremento de la RSP1 del $32.477\% \pm 2.560\%$; promedio \pm SEM, y AC/3-NP_{INC}: incremento de la RSP1 del $48.114\% \pm 1.861\%$; promedio \pm SEM, Apéndice 3). Esto estaría indicando que el tratamiento con AC, preservó el efecto moduladorio de BDNF en el incremento de la respuesta sináptica glutamatérgica, aun a una concentración baja de la neurotrofina (20 ng/ml).

Adicionalmente, los resultados obtenidos indicaron que al menos en 3 grupos experimentales (Control, PreAC/3-NP y AC/3-NP), BDNF ejerció un efecto moduladorio diferencial. En el caso del grupo Control se observó que en el 57.17% de los experimentos BDNF provocó una disminución en la amplitud de la RSP ($7.245\% \pm 0.727\%$; promedio \pm SEM), mientras que en el 42.86% de los experimentos se observó un incremento de dicha respuesta ($27.791\% \pm 1.119\%$; promedio \pm SEM); a su vez en los grupos PreAC/3-NP y AC/3-NP, se identificaron diferentes subgrupos, dos en los cuales se observó que BDNF produjo un incremento de la RSP corticoestriatal (PreAC/3-NP_{INC} y AC/3-NP_{INC}), y otros dos en los cuales BDNF provocó un leve incremento de la RSP (PreAC/3-NP_{NE} y AC/3-NP_{NE}), sin embargo, fue estadísticamente significativo.

Diferentes grupos de trabajo han reportado que la aplicación de BDNF no produce cambios evidentes en la transmisión sináptica en cierto porcentaje de sus experimentos (Mendoza *et al.*, 2014; Balkowiec, Kunze y Katz, 2000; Leßmann y Heumann, 1998; Levine *et al.* 1995). Lo anterior fue atribuido a una propiedad intrínseca de las neuronas, más que a un acceso limitado de las células a la neurotrofina. De manera particular, en el estudio realizado por Leßmann y Heumann (1998), se encontró que BDNF ejerce un efecto modulador presináptico de la liberación de glutamato en células del hipocampo, sin embargo, se hizo hincapié en que para que se produzca una mejora de la transmisión sináptica glutamatérgica debe ocurrir una facilitación por pulso pareado en las sinapsis evaluadas.

El incremento en la liberación de glutamato reportado por Leßmann y Heumann (1998) podría explicar el incremento en la amplitud de la RSP1 en los subgrupos PreAC/3-NP_{INC} y PreAC/3-NP_{NE}; subgrupos en los cuales se encontró una acción presináptica de la neurotrofina. No obstante, se sabe que BDNF afecta no solamente la liberación de glutamato, sino también de dopamina (un importante modulador de las vías del circuito corticoestriatal), tanto en núcleo estriado, como en otras regiones cerebrales (Goggi *et al.*, 2002; Goggi *et al.*, 2003; Neal *et al.*, 2003). Dichos efectos en la liberación de dopamina se encontró son producidos debido a un incremento de los niveles de Ca²⁺ intracelular y a la activación de las vías de MEK/ERK y PI3K/AKT (Goggi *et al.*, 2002; Goggi *et al.*, 2003). Otro efecto de BDNF en la presinapsis se reportó en un estudio realizado en neuronas de hipocampo en cultivo, en el cual BDNF incrementó la tasa de disparos espontáneos, así como la frecuencia y amplitud de corrientes postsinápticas excitatorias, esto debido a un cambio en el disparo presináptico (Levine *et al.*, 1995).

Por otra parte, en el presente trabajo se encontró que en distintos grupos experimentales el efecto de BDNF fue postsináptico (Control_{INC}, Control_{DIS}, 3-NP, AC-5, AC/3-NP_{INC} y AC/3-NP_{NE}). Se ha observado que en la postsinapsis BDNF actúa incrementando Na⁺ (Kafitz *et al.*, 1999), así como también la actividad de los receptores a glutamato de tipo NMDA (Suen *et al.*, 1997; Song *et al.* 1998; Levine *et al.*, 1998; Crozier *et al.*, 2008). Levine *et al.* (1998) reportaron que BDNF, a través de la activación de su receptor TrkB, aumenta la actividad glutamatérgica mediada por NMDA mediante el incremento en la probabilidad de apertura del receptor en la densidad postsináptica. Posteriormente, Crozier *et al.* (2008) resaltaron que para que BDNF produzca un incremento en la transmisión sináptica glutamatérgica, es importante no solo la

activación simultánea de TrkB y NMDA, sino también la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular.

Los cambios incitados por BDNF en las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} ; así como en la actividad de NMDA explicarían en gran medida el incremento en la RSP corticoestriatal encontrado en los grupos Control_{INC}, 3-NP, AC-5 y AC/3-NP_{INC}; sin embargo no explican la baja respuesta de las poblaciones neuronales a la aplicación de BDNF en el subgrupo AC/3-NP_{NE}, ni la disminución en la amplitud de la RSP1 encontrada en el subgrupo Control_{DIS}. Una posible explicación a esto, es la inhibición de la respuesta de los receptores a glutamato AMPA mediada por BDNF a través de la activación de TrkB (Song *et al.* 1998; Balkowiec *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la supresión de los receptores a glutamato que no son NMDA en respuesta a la administración de BDNF, actúa como un sistema de protección para las neuronas contra la activación masiva del receptor de glutamato (Song *et al.* 1998). Considerando esto, pareciera que en condiciones Control las neuronas responden de manera diferencial a BDNF, ya sea incrementando la respuesta sináptica glutamatérgica a través de la activación de los receptores NMDA o bien suprimiendo dicha respuesta mediante la inhibición de los receptores AMPA; estos mecanismos moduladores postsinápticos parecen preservarse en el grupo de co-tratamiento con AC y 3-NP (AC/3-NP).

En relación con lo anterior, el grupo PreAC/3-NP, al igual que en grupo Control y AC/3-NP, BDNF tuvo un efecto diferencial, sin embargo los mecanismos parecen ser diferentes puesto que el efecto modulador de BDNF en el grupo de pretratamiento ocurre en la presinapsis. Para el caso particular del subgrupo PreAC/3-NP_{NE}, es probable que la adición de BDNF no provoque un incremento marcado de la RSP debido a que exista ya una actividad moduladora ejercida por el BDNF endógeno, tal como se ha propuesto en otros trabajos (Leßmann y Heumann, 1998; Jia, Gall y Lynch, 2010), y que se ha indicado juega un papel potente y esencial en la generación de una potenciación estable (Jia *et al.*, 2010).

Finalmente, un último mecanismo al cual podría atribuirse la modulación diferencial de BDNF en los grupos Control, PreAC/3-NP y AC/3-NP, se encuentra relacionado con la actividad de los canales de K^+ rectificadores entrantes (Kir) y con las vías de procesamiento de la información del núcleo estriado: la vía directa e indirecta. Por un lado, se ha demostrado que la activación del receptor TrkB mediada por BDNF tiene efectos diferentes sobre distintos tipos de canales Kir3.x; por un BDNF provoca la inhibición de los Kir3.1 y Kir 3.4; mientras que los Kir3.2, no son

sensibles a la inhibición debida a la activación de TrkB (Rogalski *et al.*, 2000). Cabe resaltar que, aunque este tipo de canales Kir3.x (encargados de la hiperpolarización del potencial de membrana) se han identificado en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Kubo *et al.*, 2005), no se ha reportado que se expresen de manera diferencial en neuronas de la vía directa o de la vía indirecta. No obstante, en el estudio elaborado por Zhai *et al.* (2016) se demostró que existe una modulación diferencial de los Kir en las NEMs la cual parece estar relacionada con el tipo de receptores a dopamina que sean activados en dichas neuronas, de modo que la activación de receptores de tipo D1 (presentes en neuronas de la vía directa), incrementa la corriente de los Kir, mientras que la activación de receptores D2 (presentes en neuronas de la vía indirecta) inhibe la corriente de estos canales. Esta modulación diferencial de los canales Kir fue atribuida a la actividad de los canales Kir2.x; estos últimos han sido identificados en las NEMs estriatales y se su función principal es el mantenimiento del potencial de membrana en reposo (Kubo *et al.*, 2005; Prüss *et al.*, 2003). Por lo cual su activación inhibición supondría la despolarización de la membrana, probablemente contribuyendo al incremento de la RSP1 observado en los subgrupos Control_{INC}, PreAC/3-NP_{INC} y AC/3-NP_{INC}; mientras que su activación supondría una hiperpolarización del potencial de membrana o bien que este último tendiera al potencial de reposo de las células, lo cual podría explicar que en algunos subgrupos de los grupos Control, PreAC/3-NP y AC/3-NP, no se observe un cambio o bien ocurra una disminución en la amplitud de la RSP1.

8. CONCLUSIONES

- El tratamiento *in vivo* de ácido caféico (10 mg/kg), previene del daño estriatal provocado por la administración subcrónica de la neurotoxina 3-NP; manteniendo las propiedades de estimulación de las poblaciones estriatales similares a las observadas en condiciones control.
- En condiciones control, la adición de 20 ng/ml de BDNF provoca una modulación diferencial sobre la respuesta glutamatérgica corticoestriatal, provocando un incremento de dicha respuesta en el 57.17% de los experimentos, y una disminución en el 42.86% restante.
- En tejido proveniente de ratones tratados sistémicamente con 3-NP, la adición 20 ng/ml de BDNF provoca una disminución en la actividad moduladora de la neurotrofina, tal como se había reportado para con concentraciones más altas de la misma (50-100 ng/ml).
- El ácido caféico administrado *in vivo* (10 mg/kg), por sí solo incrementa la amplitud respuesta glutamatérgica corticoestriatal; sin embargo no altera la modulación de BDNF (20 ng/ml) en comparación con condiciones control.
- Al aplicar un pretratamiento con ácido caféico, seguido de la aplicación conjunta de dicho antioxidante con el 3-NP, BDNF a una baja concentración (20 ng/ml) produjo una modulación diferencial de la respuesta glutamatérgica corticoestriatal, similar a la observada en condiciones control.
- La aplicación del ácido caféico en conjunto a la intoxicación generada por el 3-NP, produjo una modulación diferencial de BDNF sobre la sinapsis glutamatérgica estriatal, y en el caso de los experimentos en los cuales se produjo un incremento marcado de la respuesta sináptica, dicho incremento fue mayor que en condiciones control.

APÉNDICE 1: ALTERACIÓN DE LA VÍA CORTICOESTRIATAL EN LA EH

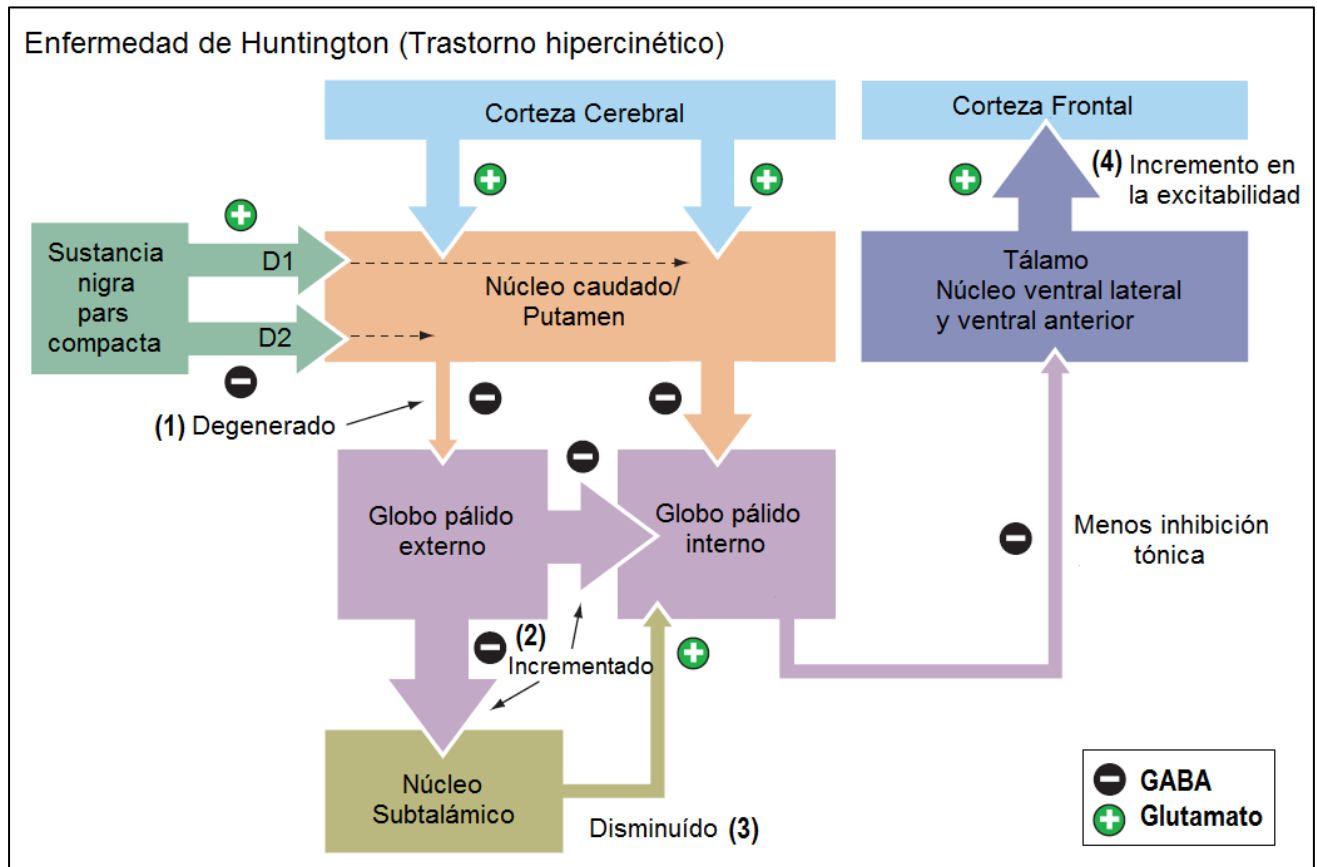


Figura 18. Alteración de la vía corticoestriatal en la EH. En enfermedades hiperkinéticas como la EH, la proyección del caudado y el putamen del globo pálido (segmento externo) está disminuido (1). Este efecto aumenta la inhibición tónica del globo pálido al núcleo subtalámico (2), haciendo que el núcleo subtalámico excitatorio sea menos efectivo para oponerse a la acción de la vía directa (3). Por lo tanto, la excitación talámica de la corteza aumenta (4), lo que lleva a una actividad motora mayor y a menudo inadecuada (Modificado de Purves *et al.*, 2004).

APÉNDICE 2: PROTOCOLO POR PULSO PAREADO

El protocolo por pulso pareado (PPP) consiste en dar dos estímulos de la misma intensidad y la misma duración, separados por un intervalo de aproximadamente 50ms. Este protocolo se empleó para conocer si la modulación de la neurotrofina BDNF ocurre de manera presináptica o postsináptica, para lo cual se evaluó la relación por pulso pareado (PPR; paired pulse ratio, por sus siglas en inglés), el cual es un cociente que resulta de la relación entre la amplitud de la RSP2 y la RSP1 ($PPR = (RSP2/RSP1) * 100$).

Este protocolo se explica mediante la Teoría de Calcio Residual propuesta por Katz y Miledi (1968); en esta se explica que al dar el primer estímulo la membrana de la neurona presináptica se despolariza y se incrementan los niveles de Ca^{2+} intracelular en la terminal presináptica; este incremento en el Ca^{2+} intracelular permite la fusión de las membranas que contienen neurotransmisor con la membrana presináptica, liberando así su contenido al espacio sináptico. No obstante, el amortiguamiento de Ca^{2+} suele ser más lento que la entrada de este ion a la célula, de modo que al llegar el segundo estímulo, este produciría la entrada de la misma cantidad Ca^{2+} a la célula, propiciando que esta última cantidad de Ca^{2+} se sume a la cantidad de Ca^{2+} remanente del primer estímulo y por lo tanto se incremente la liberación del neurotransmisor. Cuando ocurre lo anteriormente mencionado, la amplitud de la RSP2 es mayor que la amplitud de la RSP1, a esto se le conoce como facilitación por pulso pareado (PPF). Sin embargo, puede ocurrir que el primer estímulo propicie una entrada masiva de Ca^{2+} a la neurona presináptica, la cual permita la liberación de casi toda la cantidad de neurotransmisor, de modo que al llegar el segundo estímulo ocurra una liberación menor a la del primero; en este caso se observaría que la amplitud de la RSP2 es menor en comparación con la amplitud de la RSP1; ocurriendo lo que se conoce como depresión por pulso pareado (PPD).

Debido a que tanto la PPF como la PPD son consideradas formas de plasticidad sináptica de corto plazo (Colino *et al.*, 2002; Leßmann y Heumann, 1998); por lo cual un cambio en el PPR significaría que la modulación de un fármaco ocurre en la presinapsis, y por el contrario, cuando no ocurre algún cambio en el PPR tras la adición de un fármaco, significa que este actúa a nivel postsináptico.

APÉNDICE 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

CURVAS INTENSIDAD AMPLITUD

- **Umbral 1x**

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks lunes, agosto 27, 2018, 05:29:45 p. m.

Data source: Data 1 in CIA

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control 1x	5	0	36.500	30.205	64.500
3-NP 1x	6	0	33.745	29.345	42.243
AC-5 1x	11	0	45.260	40.820	66.120
PreAC/3-NP 1x	7	0	35.940	33.730	62.460
AC/3-NP	9	0	46.390	34.425	52.620

H = 4.765 with 4 degrees of freedom. (P = 0.312)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.312)

- **Umbral 1.5x**

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks lunes, agosto 27, 2018, 05:27:49 p. m.

Data source: Data 1 in CIA

One Way Analysis of Variance lunes, agosto 27, 2018, 05:27:49 p. m.

Data source: Data 1 in CIA

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Control 1.5x	5	0	134.192	55.932	25.014
3-NP 1.5x	6	0	95.448	9.846	4.019
AC-5 1.5x	11	0	212.285	86.921	26.208
PreAC/3-NP 1.5x	7	0	148.819	53.541	20.237
AC/3-NP 1.5x	9	0	131.736	64.462	21.487

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	64494.641	16123.660	3.828	0.012
Residual	33	138994.541	4211.956		
Total	37	203489.182			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.012).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.707

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0.050
AC-5 1.5x vs. 3-NP 1.5x	116.837	3.547	0.012	Yes
AC-5 1.5x vs. AC/3-NP 1.5 x	80.550	2.761	0.081	No
AC-5 1.5x vs. Contro l1.5x	78.093	2.231	0.233	No
AC-5 1.5x vs. PreAC/3-NP 1.5x	63.467	2.023	0.308	No
PreAC/3-NP 1.5x vs. 3-NP 1.5x	53.370	1.478	0.620	No
AC/3-NP 1.5 x vs. 3-NP 1.5x	36.287	1.061	0.828	No
Contro l1.5x vs. 3-NP 1.5x	38.744	0.986	0.800	No
PreAC/3-NP 1 vs. AC/3-NP 1.5	17.083	0.522	0.938	No
PreAC/3-NP 1 vs. Contro l1.5x	14.627	0.385	0.912	No
Control1.5x vs AC/3-NP 1.5x	2.456	0.0679	0.946	No

- **Umbral 2x**

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranksviernes, agosto 24, 2018, 01:07:55 p. m.

Data source: Data 1 in CIA

One Way Analysis of Variance

viernes, agosto 24, 2018, 01:07:55 p. m.

Data source: Data 1 in CIA

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
control	5	0	154.312	19.453	8.700
3-NP	6	0	107.072	20.778	8.482
AC-5	11	0	258.200	80.888	24.389
PreAC/3-NP	7	0	166.781	55.246	20.881
AC/3-NP	9	0	145.602	66.394	22.131

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	114043.743	28510.936	7.669	<0.001
Residual	33	122679.055	3717.547		
Total	37	236722.798			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.010: 0.923

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0.050
AC-5 vs. 3-NP	151.128	4.884	<0.001	Yes
AC-5 vs. AC/3-NP	112.598	4.109	0.002	Yes
AC-5 vs. control	103.888	3.159	0.027	Yes
AC-5 vs. PreAC/3-NP	91.419	3.101	0.027	Yes
PreAC/3-NP vs. 3-NP	59.710	1.760	0.423	No
control vs. 3-NP	47.240	1.280	0.692	No
AC/3-NP vs. 3-NP	38.531	1.199	0.665	No
PreAC/3-NP vs. AC/3-NP	21.179	0.689	0.872	No
PreAC/3-NP vs. control	12.469	0.349	0.927	No
Control vs. AC/3-NP	8.710	0.256	0.799	No

MODULACIÓN DE BDNF (en los grupos dónde se vio efecto)

- **Comparación entre el porcentaje de amplitud de la RSP1 de todos los grupos**

- **Antes de la adición de BDNF**

One Way Analysis of Variance

lunes, julio 30, 2018, 02:56:39 p.m.

Data source: Data 1 in Datos Ceci

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.662)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.401)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Control	12	1	100.000	3.304	0.996
3NP	12	1	100.000	2.443	0.736
PreAC 3NP	12	1	100.242	1.768	0.533
AC 3NP	12	1	100.030	1.810	0.546
AC	12	1	101.423	2.158	0.651

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	16.610	4.153	0.743	0.567
Residual	50	279.449	5.589		
Total	54	296.060			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.567).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.049

The power of the performed test (0.049) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

- **Después de la adición de BDNF**

RSP1 después de la aplicación de BDNF en los grupos INC

One Way Analysis of Variance

lunes, septiembre 10, 2018, 01:00:18 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.080)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks lunes, septiembre 10, 2018, 01:00:18 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control INC BDNF	11	0	125.781	124.540	127.678
3NP BDNF	11	0	102.237	100.581	105.349
AC5 BDNF	11	0	132.502	123.725	141.520
PreAC3NP INC BDNF	11	0	132.161	123.943	139.915
AC3NP INC BDNF	11	0	147.470	145.024	150.567

H = 40.998 with 4 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
AC3NP INC BDNF vs 3NP BDNF	472.000	8.883	Yes
AC3NP INC BDN vs Control INC B	279.000	6.549	Yes
AC3NP INC BDN vs PreAC3NP INC	203.000	6.330	Yes
AC3NP INC BDNF vs AC5 BDNF	196.000	9.101	Yes
AC5 BDNF vs 3NP BDNF	276.000	6.478	Yes
AC5 BDNF vs Control INC BDNF	83.000	2.588	No
AC5 BDNF vs PreAC3NP INC BDNF	7.000	0.325	Do Not Test
PreAC3NP INC BDNF vs 3NP BDNF	269.000	8.388	Yes
PreAC3NP INC vs Control INC B	76.000	3.529	Do Not Test
Control INC BDNF vs 3NP BDNF	193.000	8.961	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

***Comparación de los grupos en los cuales se arrojó "Do Not Test"**

Modulación BDNF AC-5 y PreAC/3-NP INC

Mann-Whitney Rank Sum Test

lunes, septiembre 10, 2018, 01:38:32 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.225)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.920)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
AC5 BDNF	11	0	132.502	123.725	141.520
PreAC3NP INC BDNF	11	0	132.161	123.943	139.915

Mann-Whitney U Statistic= 59.000

T = 128.000 n(small)= 11 n(big)= 11 (P = 0.948)

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.948)

Modulación BDNF Control INC y PreAC/3-NP INC

Mann-Whitney Rank Sum Test lunes, septiembre 10, 2018, 01:43:15 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.515)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control INC BDNF	11	0	125.781	124.540	127.678
PreAC3NP INC BDNF	11	0	132.161	123.943	139.915

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control INC BDNF	11	0	125.781	124.540	127.678
PreAC3NP INC BDNF	11	0	132.161	123.943	139.915

Mann-Whitney U Statistic= 37.000

T = 103.000 n(small)= 11 n(big)= 11 (P = 0.131)

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.131)

- **Comparación del PPR antes y después de la adición de BDNF de cada grupo**
 - **Grupo: Control**

Paired t-test: lunes, agosto 27, 2018, 10:54:17 a. m.

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.439)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Control	4	1	1.533	0.251	0.145
Control BDNF	4	1	1.321	0.154	0.0889
Difference	4	1	0.211	0.104	0.0600

t = 3.526 with 2 degrees of freedom. (P = 0.072)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.0466 to 0.469

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.072)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.454

The power of the performed test (0.454) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

○ **Grupo: 3-NP**

Paired t-test: viernes, agosto 24, 2018, 12:39:51 p.m.

Data source: PPR por experimento in Datos Ceci

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.095)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
3NP	6	1	1.305	0.185	0.0827
3NP BDNF	6	1	1.238	0.201	0.0897
Difference	6	1	0.0673	0.0685	0.0306

t = 2.195 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -0.0178 to 0.152

Two-tailed P-value = 0.0931

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.093)

One-tailed P-value = 0.0466

The sample mean of treatment 3NP exceeds the sample mean of treatment 3NP BDNF by an amount that is greater than would be expected by chance, rejecting the hypothesis that the population mean of treatment 3NP BDNF is greater than or equal to the population mean of treatment 3NP. (P = 0.093)

Power of performed two-tailed test with alpha = 0.050: 0.390

○ **Grupo: AC-5**

Paired t-test:

viernes, agosto 24, 2018, 12:40:58 p.m.

Data source: PPR por experimento in Datos Ceci

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.639)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
AC	8	1	1.603	0.391	0.148
AC BDNF	8	1	1.356	0.174	0.0656
Difference	8	1	0.246	0.282	0.107

t = 2.311 with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -0.0145 to 0.507

Two-tailed P-value = 0.0602

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.060)

One-tailed P-value = 0.0301

The sample mean of treatment AC exceeds the sample mean of treatment AC BDNF by an amount that is greater than would be expected by chance, rejecting the hypothesis that the population mean of treatment AC BDNF is greater than or equal to the population mean of treatment AC. (P = 0.060)

Power of performed two-tailed test with alpha = 0.050: 0.492

○ **Grupo: PreAC/3-NP**

Paired t-test:

lunes, agosto 27, 2018, 01:51:28 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 Todos vs todos

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.522)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Pre AC	7	0	1.404	0.362	0.137
Pre AC BDNF	7	0	1.162	0.218	0.0825
Difference	7	0	0.242	0.162	0.0611

t = 3.966 with 6 degrees of freedom. (P = 0.007)

95 percent confidence interval for difference of means: 0.0929 to 0.392

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.007)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.898

- **Grupo: AC/3-NP**

Paired t-test:

lunes, agosto 27, 2018, 05:43:44 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 Todos vs todos

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.271)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
AC3NP inc	4	0	1.371	0.269	0.134
AC3NP BDNF inc	4	0	1.086	0.0936	0.0468
Difference	4	0	0.286	0.223	0.111

t = 2.565 with 3 degrees of freedom. (P = 0.083)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.0687 to 0.640

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.083)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.372

The power of the performed test (0.372) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

MODULACIÓN DE BDNF (en los grupos dónde no se vio efecto o se observó una disminución)

- **Comparación entre el porcentaje de amplitud de la RSP1 de todos los grupos**
 - **Antes de la adición de BDNF**

One Way Analysis of Variance miércoles, junio 06, 2018, 01:19:40 p.m.
ANOVA condiciones control

Data source: Mod de Bdnf no efecto in Datos Ceci

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.563)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.056)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
control	11	0	100.000	1.037	0.313
3np	11	0	100.000	2.443	0.736
pre AC 3np	11	0	99.788	1.884	0.568
AC 3np	11	0	99.997	1.741	0.525

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	0.367	0.122	0.0359	0.991
Residual	40	136.210	3.405		
Total	43	136.577			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.991).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.049

The power of the performed test (0.049) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

- **Después de la adición de BDNF**

RSP1 después de la aplicación de BDNF en grupos NE/DIS

One Way Analysis of Variance lunes, septiembre 10, 2018, 01:46:04 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks lunes, septiembre 10, 2018, 01:46:04 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control DIS BDNF	11	0	93.394	91.102	94.281
3NP BDNF	11	0	102.237	100.581	105.349
AC5 BDNF	11	0	132.502	123.725	141.520
PreAC3NP NE BDNF	11	0	102.527	102.368	103.811
AC3NP NE BDNF	11	0	101.463	100.479	103.033

H = 42.849 with 4 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
AC5 BDNF vs Control DIS BDNF	484.000	9.109	Yes
AC5 BDNF vs AC3NP NE BDNF	290.000	6.807	Yes
AC5 BDNF vs 3NP BDNF	232.000	7.234	Yes
AC5 BDNF vs PreAC3NP NE BDNF	204.000	9.472	Yes
PreAC3NP NE B vs Control DIS B	280.000	6.572	Yes
PreAC3NP NE B vs AC3NP NE BDNF	86.000	2.682	No
PreAC3NP NE BDNF vs 3NP BDNF	28.000	1.300	Do Not Test
3NP BDNF vs Control DIS BDNF	252.000	7.858	Yes
3NP BDNF vs AC3NP NE BDNF	58.000	2.693	Do Not Test
AC3NP NE BDNF vs Control DIS B	194.000	9.008	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

***Comparación de los grupos en los cuales se arrojó "Do Not Test"**

Modulación BDNF 3-NP y PreAC/3-NP NE

Mann-Whitney Rank Sum Test

lunes, septiembre 10, 2018, 01:53:44 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Normality Test (Shapiro-Wilk)

Passed

(P = 0.559)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
3NP BDNF	11	0	102.237	100.581	105.349
PreAC3NP NE BDNF	11	0	102.527	102.368	103.811

Mann-Whitney U Statistic= 55.000

T = 121.000 n(small)= 11 n(big)= 11 (P = 0.743)

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.743)

Modulación BDNF 3-NP y AC/3-NP NE

Mann-Whitney Rank Sum Test

lunes, septiembre 10, 2018, 02:00:17 p. m.

Data source: Data 1 in RSP1 comparaciones

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.791)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
3NP BDNF	11	0	102.237	100.581	105.349
AC3NP NE BDNF	11	0	101.463	100.479	103.033

Mann-Whitney U Statistic= 45.000

T = 142.000 n(small)= 11 n(big)= 11 (P = 0.325)

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.325)

- **Comparación del PPR antes y después de la adición de BDNF de cada grupo**

- **Grupo: Control**

Paired t-test:

viernes, agosto 24, 2018, 12:31:26 p.m.

Data source: ppr por experimento in Datos Ceci

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, Signed Rank Test begun

Wilcoxon Signed Rank Test

12:31:26 p.m.
PPR

viernes, agosto 24, 2018,

Data source: ppr por experimento in Datos Ceci

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	5	1	1.079	1.029	1.185
Control BDNF	5	1	1.087	0.991	1.202

W= 2.000 T+ = 6.000 T- = -4.000
Z-Statistic (based on positive ranks) = 0.365
P(est.)= 0.855 P(exact)= 0.875

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that it is due to chance (P = 0.875).

- **Grupo: PreAC/3-NP**

Paired t-test:

viernes, agosto 24, 2018, 12:42:37 p.m.

Data source: PPR por experimento in Datos Ceci

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.468)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
pre AC/3-NP	5	1	1.169	0.0673	0.0337
pre AC/3-NP BDNF	5	1	1.126	0.0577	0.0289
Difference	5	1	0.0423	0.0207	0.0103

t = 4.094 with 3 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: 0.00942 to 0.0752

Two-tailed P-value = 0.0264

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.026)

One-tailed P-value = 0.0132

The sample mean of treatment pre AC/3-NP exceeds the sample mean of treatment pre AC/3-NP BDNF by an amount that is greater than would be expected by chance, rejecting the hypothesis that the population mean of treatment pre AC/3-NP BDNF is greater than or equal to the population mean of treatment pre AC/3-NP. (P = 0.026)

Power of performed two-tailed test with alpha = 0.050: 0.772

Power of performed one-tailed test with alpha = 0.050: 0.919

- **Grupo: AC/3-NP**

Paired t-test:

viernes, agosto 24, 2018, 12:43:54 p.m.

Data source: PPR por experimento in Datos Ceci

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.577)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
AC+3-NP	8	1	1.137	0.168	0.0635
AC+3-NP BDNF	8	1	1.084	0.123	0.0466
Difference	8	1	0.0525	0.0824	0.0311

t = 1.687 with 6 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -0.0237 to 0.129

Two-tailed P-value = 0.143

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.143)

One-tailed P-value = 0.0713

The sample mean of treatment AC+3-NP does not exceed the sample mean of the treatment AC+3-NP BDNF by an amount great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability. The hypothesis that the population mean of treatment AC+3-NP BDNF is greater than or equal to the population mean of treatment AC+3-NP cannot be rejected. (P = 0.143)

Power of performed two-tailed test with alpha = 0.050: 0.296

The power of the performed test (0.296) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Power of performed one-tailed test with alpha = 0.050: 0.440

The power of the performed test (0.440) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akomolafe, S. F., Akinyemi, A. J., Ogunsuyi, O. B., Oyeleye, S. I., Oboh, G., Adeoyo, O. O., y Allismith, Y. R. (2017). Effect of caffeine, caffeic acid and their various combinations on enzymes of cholinergic, monoaminergic and purinergic systems critical to neurodegeneration in rat brain—*In vitro*. *NeuroToxicology*, *62*, 6-13.
2. Al-Qudah, M. A., y Al-Dwairi, A. (2016). Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion. *Neurosciences*, *21*(4), 306.
3. Araujo, D. M., & Hilt, D. C. (1998). Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the locomotor hypofunction and striatonigral neurochemical deficits induced by chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Neuroscience*, *82*(1), 117-127.
4. Bak, J., Kim, H. J., Kim, S. Y., y Choi, Y. S. (2016). Neuroprotective effect of caffeic acid phenethyl ester in 3-nitropropionic acid-induced striatal neurotoxicity. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, *20*(3), 279-286.
5. Balkowiec, A., Kunze, D. L., y Katz, D. M. (2000). Brain-derived neurotrophic factor acutely inhibits AMPA-mediated currents in developing sensory relay neurons. *Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1904-1911.
6. Baquet, Z. C., Gorski, J. A., y Jones, K. R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience*, *24*(17), 4250-4258.
7. Bear, M. F., Connors, B. W., y Paradiso, M. A. (Eds.). (2007). *Neuroscience* (Vol. 2). Lippincott Williams & Wilkins.
8. Begni, V., Riva, M. A., y Cattaneo, A. (2017). Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, *131*(2), 123-138.
9. Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M. C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J., Hirsch, E., Hantraye, P., Déglon, N., y Brouillet, E. (2006). Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(4), 1652-1663.
10. Bodai, L., y Marsh, L. (2012). A novel target for Huntington's disease: ERK at the crossroads of signaling. *Bioessays*. *34*(2), 142-148.
11. Borlogan, C. V., Koutouzis, T. K., Freemam, T.B., Cahill, D. W., y Sanberg, P. R. (1995) Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Research*. *697*(1-2), 254-257.

12. Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., y Blum, D. (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*. 95(6), 1521-1540.
13. Brouillet, E. (2014) The 3-NP Model of Striatal Neurodegeneration. *Current Protocols in Neuroscience*. 67(1), 9-48.
14. Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., Santos, S. D., y Duarte, C. B. (2008). Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), S310-S324.
15. Cha, J. H. J., Frey, A. S., Alsdorf, S. A., Kerner, J. A., Kosinski, C. M., Mangiarini, L., Penney Jr., J. B., Davies, S. W., Bate, G. P., y Young, A. B. (1999). Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 354(1386), 981-989.
16. Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 299.
17. Colino, A., Muñoz, J., y Vara, H. (2002). Plasticidad sináptica a corto plazo. *Revista de Neurología*, 34(6), 593-599.
18. Cooper, J. R., Bloom, F. E., y Roth, R. H. (2003). *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press, USA.
19. Crozier, R. A., Bi, C., Han, Y. R., y Plummer, M. R. (2008). BDNF modulation of NMDA receptors is activity dependent. *Journal of Neurophysiology*, 100(6), 3264-3274.
20. Damiano, M., Galvan, L., Déglon, N., y Brouillet, E. (2010). Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 52-61.
21. Deshmukh, R., Kaundal, M., y Bansal, V. (2016). Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 56-62.
22. Dzitoyeva, S., Imbesi, M., Uz, T., Dimitrijevic, N., Manev, H., y Manev, R. (2008). Caffeic acid attenuates the decrease of cortical BDNF transcript IV mRNA induced by swim stress in wild-type but not in 5-lipoxygenase-deficient mice. *Journal of Neural Transmission*, 115(6), 823-827.
23. Espíndola, S., Vilches-Flores, A., y Hernández-Echeagaray, E. (2012). 3-Nitropropionic acid modifies neurotrophin mRNA expression in the mouse striatum: 18S-rRNA is a reliable control gene for studies of the striatum. *Neuroscience Bulletin*, 28(5), 517-531.
24. Fernandes, H. B., y Raymond, L. A. (2009). NMDA receptors and Huntington's Disease. *Biology of the NMDA receptor*, 17-40.

25. Ferrante, R. J., Beal, M. F., Kowall, N. W., Richardson Jr, E. P., y Martin, J. B. (1987). Spraying of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Research*, 411(1), 162-166.
26. Frank, S. (2014). Treatment of Huntington's disease. *Neurotherapeutics*, 11(1), 153-160.
27. Goggi, J., Pullar, I. A., Carney, S. L., y Bradford, H. F. (2002). Modulation of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in rat brain striatal slices *in vitro*. *Brain Research*, 941(1-2), 34-42.
28. Goggi, J., Pullar, I. A., Carney, S. L., y Bradford, H. F. (2003). Signalling pathways involved in the short-term potentiation of dopamine release by BDNF. *Brain Research*, 968(1), 156-161.
29. Graybiel, A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 244-254.
30. Gul, Z., Demircan, C., Bagdas, D., y Buyukuysal, R. L. (2016). Protective effects of chlorogenic acid and its metabolites on hydrogen peroxide-induced alterations in rat brain slices: a comparative study with resveratrol. *Neurochemical Research*, 41(8), 2075-2085.
31. Haber, S. N. (2016). Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 1-21.
32. Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. USA: Oxford University Press.
33. Hamilton, B. F., y Gould, D. H. (1987). Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathologica*, 72(3), 286-297.
34. Hammond, P., y Brimijoin, S. (1988). Acetylcholinesterase in Huntington's and Alzheimer's diseases: simultaneous enzyme assay and immunoassay of multiple brain regions. *Journal of Neurochemistry*, 50(4), 1111-1116.
35. Hasselmo, M. E. (1995). Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behavioural Brain Research*, 67(1), 1-27.
36. Hernández-Echeagaray, E., De la Rosa-López, G., y Mendoza-Duarte, E. (2012). The Use of the Mitochondrial Toxin 3-NP to Uncover Cellular Dysfunction in Huntington's Disease. En Nagehan Ersoy Tunali, N. E. (Ed.), *Huntington's Disease — Core Concepts and Current Advances* (pp. 374-360), InTech.
37. Huang, Y., Jin, M., Pi, R., Zhang, J., Chen, M., Ouyang, Y., Liu, A., Chao, X., Liu, P., Liu, J., Ramassamy, C. y Qin, J. (2013). Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Neuroscience Letters*, 535, 146-151.

38. IARC. (1993). *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. International Agency for Research on Cancer.
39. Jia, Y., Gall, C. M., y Lynch, G. (2010). Presynaptic BDNF promotes postsynaptic long-term potentiation in the dorsal striatum. *Journal of Neuroscience*, 30(43), 14440-14445.
40. Jimenez-Sanchez, M., y Rubinsztein, D. C. (2015). Huntington's disease—the sting in the tail. *The EMBO Journal*, 34(17), 2215-2216.
41. Kaczmarek, L. K., y Levitan, I. B. (Eds.). (1987). *Neuromodulation: the biochemical control of neuronal excitability*. Oxford University Press, USA.
42. Kafitz, K. W., Rose, C. R., Thoenen, H., y Konnerth, A. (1999). Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature*, 401(6756), 918.
43. Kalonia, H., Kumar, P., Kumar, A., y Nehru, B. (2009). Effect of caffeic acid and rofecoxib and their combination against intrastriatal quinolinic acid induced oxidative damage, mitochondrial and histological alterations in rats. *Inflammopharmacology*, 17(4), 211-219.
44. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., y Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-hill.
45. Katz, B., y Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of Physiology*, 195(2), 481-492.
46. Kim, J. H., Wang, Q., Choi, J. M., Lee, S., y Cho, E. J. (2015). Protective role of caffeic acid in an A β 25-35-induced Alzheimer's disease model. *Nutrition research and practice*, 9(5), 480-488.
47. Kreitzer, A. C., y Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543-554.
48. Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C. G., Seino, S., y Vandenberg, C. A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 509-526.
49. Kumar, P., Kalonia, H., y Kumar, A. (2011). Role of LOX/COX pathways in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's Disease-like symptoms in rats: protective effect of licoferone. *British Journal of Pharmacology*, 164(2b), 644-654.
50. Labbadia, J., y Morimoto, R. I. (2013). Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8), 378-385.
51. Leßmann, V., y Heumann, R. (1998). Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures:

- presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation. *Neuroscience*, 86(2), 399-413.
52. Leopoldini, M., Chiodo, S. G., Russo, N., y Toscano, M. (2011). Detailed investigation of the OH radical quenching by natural antioxidant caffeic acid studied by quantum mechanical models. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(12), 4218-4233.
 53. Levine, E. S., Dreyfus, C. F., Black, I. B., y Plummer, M. R. (1995). Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 8074-8077.
 54. Levine, E. S., Crozier, R. A., Black, I. B., y Plummer, M. R. (1998). Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10235-10239.
 55. Lewin, G. R., y Carter, B. D. (Eds.). (2014). *Neurotrophic factors*. Berlin; Heidelberg: Springer.
 56. Liang, G., Shi, B., Luo, W., y Yang, J. (2015). The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behavioral and Brain Functions*, 11(1), 18.
 57. Liot, G., Valette, J., Pépin, J., Flament, J., y Brouillet, E. (2017). Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4), 1084-1095.
 58. Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learning & Memory*, 10(2), 86-98.
 59. Luo, Y., Kuang, S., Xue, L., y Yang, J. (2016). The mechanism of 5-lipoxygenase in the impairment of learning and memory in rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Physiology & Behavior*, 167, 145-153.
 60. Mallik, S. B., Mudgal, J., Nampoothiri, M., Hall, S., Anoopkumar-Dukie, S., Grant, G., Mallikarjuna Rao, C., y Arora, D. (2016). Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice. *Neuroscience Letters*, 632, 218-223.
 61. Manyam, B. V., Giacobini, E., y Colliver, J. A. (1990). Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase and choline measurements in Huntington's disease. *Journal of Neurology*, 237(5), 281-284.
 62. Mayo Clinic Staff. (2018) Huntington's disease. Recuperado de <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/huntingtons-disease/symptoms-causes/syc-20356117>

63. Mendoza, E., Miranda-Barrientos, J. A., Vázquez-Roque, R. A., Morales-Herrera, E., Ruelas, A., De la Rosa, G., Flores, G., y Hernández-Echeagaray, E. (2014). *In vivo* mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. *Neuroscience*, 280, 156-170.
64. Moosavi, F., Hosseini, R., Rajaian, H., Silva, T., e Silva, D. M., Saso, L., Edraki, N., Miri, R., Borges, F., y Firuzi, O. (2017). Derivatives of caffeic acid, a natural antioxidant, as the basis for the discovery of novel nonpeptidic neurotrophic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(12), 3235-3246.
65. Nadim, F., y Bucher, D. (2014). Neuromodulation of neurons and synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, 29, 48-56.
66. Neal, M., Cunningham, J., Lever, I., Pezet, S., y Malsangio, M. (2003). Mechanism by which brain-derived neurotrophic factor increases dopamine release from the rabbit retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(2), 791-798.
67. Negwer, M., y Schubert, D. (2017). Talking Convergence: Growing Evidence Links FOXP2 and Retinoic Acid in Shaping Speech-Related Motor Circuitry. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 19.
68. Nieuwenhuys, R., Voogd, J., y van Huijzen. C. (2009) *El sistema nervioso central humano*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
69. Noble, E. E., Billington, C. J., Kotz, C. M., y Wang, C. (2011). The lighter side of BDNF. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(5), R1053-R1069.
70. Nopoulos, P. C. (2016). Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues in Clinical Reserach*. 18(1), 91-98.
71. Oboh, G., Agunloye, O. M., Akinyemi, A. J., Ademiluyi, A. O., y Adefegha, S. A. (2013). Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-*in vitro*. *Neurochemical Research*, 38(2), 413-419.
72. Orr, A. L., Li, S., Wang, C. E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardin, P. G., Greenamyre, J. T., y Li, X. J. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *Journal of Neuroscience*, 28(11), 2783-2792.
73. Park, J. E., Lee, S. T., Im, W. S., Chu, K., y Kim, M. (2008). Galantamine reduces striatal degeneration in 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 448(1), 143-147.

74. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMata, A., McNamara, J.O. y Williams, A. M. (2004) *Neuroscience*. Massachusetts, USA.: Sinauer Associates.
75. Ramírez, D., Saba, J., Carniglia, L., Durand, D., Lasaga, M., & Caruso, C. (2015). Melanocortin 4 receptor activates ERK-cFos pathway to increase brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes and hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 28-37.
76. Rodríguez, E., Rivera, I., Astorga, S., Mendoza, E., García, F., y Hernández-Echeagaray, E. (2010). Uncoupling oxidative/energy metabolism with low sub chronic doses of 3-nitropropionic acid or iodoacetate *in vivo* produces striatal cell damage. *International Journal of Biological Sciences*, 6(3), 199.
77. Rogalski, S. L., Appleyard, S. M., Pattillo, A., Terman, G. W., y Chavkin, C. (2000). TrkB activation by BDNF inhibits the G protein gated inward rectifier Kir3 by tyrosine phosphorylation of the channel. *Journal of Biological Chemistry*.
78. Ross, C. A., y Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, 10(1), 83-98.
79. Roux, P. P., y Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology*, 67(3), 203-233.
80. Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., y Rémésy, C. (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282.
81. Shepherd, G. M. (Ed.). (2003). *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press.
82. Sigma Aldrich (s.f.) *Caffeic acid*. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0625?lang=es®ion=MX>
83. Skaper, S. D. (2008). The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 7(1), 46-62.
84. Snell, R. S. (2007). *Neuroanatomía clínica*. Ed. Médica Panamericana.
85. Song, D. K., Choe, B. K., Bae, J. H., Park, W. K., Han, I. S., Ho, W. K., y Earm, Y. E. (1998). Brain-derived neurotrophic factor rapidly potentiates synaptic transmission through NMDA, but suppresses it through non-NMDA receptors in rat hippocampal neuron. *Brain Research*, 799(1), 176-179.
86. Suen, P. C., Wu, K., Levine, E. S., Mount, H. T., Xu, J. L., Lin, S. Y., y Black, I. B. (1997). Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-

- methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(15), 8191-8195.
87. Sul, D., Kim, H. S., Lee, D., Joo, S. S., Hwang, K. W., y Park, S. Y. (2009). Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sciences*, 84(9-10), 257-262.
88. Takeda, H., Tsuji, M., Yamada, T., Masuya, J., Matsushita, K., Tahara, M., Limori, M., y Matsumiya, T. (2006). Caffeic acid attenuates the decrease in cortical BDNF mRNA expression induced by exposure to forced swimming stress in mice. *European Journal of Pharmacology*, 534(1-3), 115-121.
89. Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., y Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Frontiers in neuroendocrinology*, 25(2), 77-107. Taram, F., Winter, A. N., y Linseman, D. A. (2016). Neuroprotection comparison of chlorogenic acid and its metabolites against mechanistically distinct cell death-inducing agents in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research*, 1648, 69-80.
90. Tsai, S. J., Chao, C. Y., y Yin, M. C. (2011). Preventive and therapeutic effects of caffeic acid against inflammatory injury in striatum of MPTP-treated mice. *European Journal of Pharmacology*, 670(2), 441-447.
91. Túnez, I., y Santamaría, A. (2009) Modelo de la enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico. *Revista de Neurobiología*. 48(8), 430-434.
92. Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De LaCruz, V., y Santamaría, A. (2010). 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules*, 15(2), 878-916.
93. Vattakatuchery, J. J., & Kurien, R. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors in cognitive impairment in Huntington's disease: A brief review. *World Journal of Psychiatry*, 3(3), 62.
94. Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *The Lancet*, 369(9557), 218-228.
95. Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Hua, L., Han, B., Zhang, Y., Yang, X., Zeng, Z., Bai, H., Yin, H., y Lou, J. (2016). Effects of caffeic acid on learning deficits in a model of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(3), 869-875.
96. Wastek, G. J., Stern, L. Z., Johnson, P. C., y Yamamura, H. I. (1976). Huntington's disease: regional alteration in muscarinic cholinergic receptor binding in human brain. *Life Sciences*, 19(7), 1033-1039.
97. Wastek, G. J., y Yamamura, H. I. (1978). Biochemical characterization of the muscarinic cholinergic receptor in human brain: alterations in Huntington's disease. *Molecular Pharmacology*, 14(5), 768-780.

98. Wu, C. L., Hwang, C. S., Chen, S. D., Yin, J. H., y Yang, D. I. (2010). Neuroprotective mechanisms of brain-derived neurotrophic factor against 3-nitropropionic acid toxicity: therapeutic implications for Huntington's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 8-12.
99. Yang, G., Fu, Y., Malakhova, M., Kurinov, I., Zhu, F., Yao, K., Li, H., Chen, H., Li, W., Lim, D. Y., Sheng, Y., Bode, A. M., Dong, Z., y Dong, Z. (2014). Caffeic acid directly targets ERK1/2 to attenuate solar UV-induced skin carcinogenesis. *Cancer Prevention Research*.
100. Yelnik, J. (2002). Functional anatomy of the basal ganglia. *Movement Disorders*, 17(S3), S15-S21.
101. Zhao, B., Zhu, J., Dai, D., Xing, J., He, J., Fu, Z., Zhang, L., Li, Z., y Wang, W. (2016). Differential dopaminergic regulation of inwardly rectifying potassium channel mediated subthreshold dynamics in striatal medium spiny neurons. *Neuropharmacology*, 107, 396-410.