

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE

FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Control de la liberación de [³H]-GABA por receptores TrkB en la
sustancia *nigra pars reticulata*; posible papel de la dopamina.**

T E S I S

Que presenta

TANIA NOEMÍ GARCÍA MORENO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROCIENCIAS

Director de la Tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño

México, D.F.

Noviembre, 2015

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 4 DEL DEPARTAMENTO DE FISOLOGÍA , BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D.C. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO Y GRACIAS AL DONATIVO OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) No. 152326.

Agradecimientos

A mi familia, porque no podría estar aquí sin la fuerza, la confianza y el amor que ustedes siempre han tenido para mí. Con ustedes sé que siempre tendré un lugar al cual llamar hogar.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño por su paciencia al guíarme durante este proyecto.

Al Dr. Jorge Aceves Ruíz y al Dr. José Antonio Arias Montaña por su consejo y apoyo en la elaboración de este trabajo.

A los auxiliares, técnicos y estudiantes pertenecientes a los laboratorios 4 y 7 del Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias. Dar las gracias por su apoyo y compañía es la única forma que tengo para reconocer el gran favor que me hicieron al crear un ambiente agradable y sobre todo muy divertido.

如果你累了，学会休息，而不是放弃

“Si te cansas, aprende a descansar, no a renunciar”

Resumen

El BDNF es un factor neurotrófico que ha mostrado tener efectos significativos sobre la plasticidad y sobrevivencia neuronal a través de la activación de los receptores TrkB. En diferentes estudios se ha encontrado que la activación de los receptores TrkB genera un aumento en la liberación de neurotransmisores como dopamina y GABA en las terminales de distintos tipos neuronales. Así mismo, se ha sugerido que este efecto potenciador se encuentra relacionado a la interacción con los receptores dopaminérgicos durante los tratamientos crónicos con BDNF. La actividad BDNF/TrkB ha sido reportada en neuronas estriatales y en las proyecciones estriado palidales que forman parte del circuito de los ganglios basales por lo que se ha propuesto que los receptores TrkB juegan un papel importante en la regulación del control motor. En base a lo anterior, decidimos estudiar si los receptores TrkB también están presentes en las terminales estriado nigrales y producen un aumento en la liberación de GABA para participar en la regulación del control motor generado por la vía directa de los ganglios basales. Los resultados obtenidos durante este trabajo muestran que los receptores TrkB actúan de manera aislada a los receptores dopaminérgicos D1 para generar un aumento en la liberación de GABA a partir de las terminales estriado nigrales y este efecto se da a través de la activación de la PLC y la participación de los canales de Ca^{2+} de tipo P/Q.

Abstract

BDNF is a neurotrophic factor with significant effects on neuronal plasticity and survival, through activating TrkB receptors. At terminals for different neuronal types, several studies have shown that TrkB receptors activation generates an increase in neurotransmitter release like dopamine and GABA. Also, it has been shown that this enhancer effect is related to interaction with dopamine receptors in a BDNF chronic treatment. BDNF/TrkB activity has been reported at striatal neurons and striato-pallidal projections, suggesting an important role in locomotor behavior regulation. In line with this, we study the presence of TrkB receptors at striato-nigral terminals and if they can produce an increase on GABA release, regulating motor behavior generated by direct pathway of basal ganglia. Our results show that TrkB receptors act in an independent manner from D1-dopamine receptors to generate an increase in GABA release from striato-nigral terminals and this effect is due to PLC activation and P/Q calcium channels participation.

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DR	Receptor a dopamina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD 67/65	Glutamato descarboxilasa
GP _e	Globo pálido externo
GP _i	Globo pálido interno
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
IP ₃	Inositol trifosfato
IP 3-K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina (Levodopa)
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogenos
MSN	Neurona mediana espinosa
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NTF	Factor neurotrófico
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC	Proteína cinasa C
PLC- γ	Fosfolipasa C gamma
PPN	Núcleo pedúnculo pontino
p75	Receptor a neurotrofina p75
RTK	Receptor tirosina cinasa
SPN	Neurona espinosa de proyección
SNr	Sustancia negra <i>pars reticulata</i>
STN	Núcleo subtalámico

INDICE

Resumen	V
Abstract	VI
Abreviaturas	VII
1. Factores neurotróficos	1
2. Neurotrofinas	2
3. Generalidades de los receptores tipo tirosina cinasa	3
3.1 Mecanismo de activación de los RTKs	4
3.2 Vías de señalización de los RTK en general	5
3.3 Receptores p75	5
3.4 Receptores Trk	7
3.5 Activación y señalización de los receptores Trk	8
3.6 Movilización y procesamiento de receptores Trk	8
4. Receptores TrkB y BDNF	9
4.1 Mecanismo de activación de los receptores TrkB	9
4.2 Vías de señalización	10
5. Interacción entre receptores RTK y receptores acoplados a proteínas G	11
5.1 Generalidades sobre los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas	11
5.2 Interacción cruzada entre RTKs y GPCRs	12

6. Relación entre los receptores TrkB y los receptores para dopamina	14
6.1 Generalidades sobre los receptores dopaminérgicos	14
6.2 Efecto de la activación crónica de los receptores TrkB y los receptores para dopamina	15
6.3 Efecto de la activación aguda de los receptores TrkB y los receptores para dopamina	16
7. Participación de los receptores TrkB en el control de la actividad motora	17
7.1 El sistema de los ganglios basales	18
7.2 Expresión de los receptores TrkB en el circuito de los ganglios basales	19
7.3 Efecto de la activación de los receptores TrkB sobre la actividad motora	20
8. Antecedentes	21
9. Justificación	23
10. Hipótesis	23
11. Objetivos	23
11.1 Objetivo general	23
11.2 Objetivos particulares	23
12. Materiales y métodos	24
12.1 Material biológico	24
12.2 Proceso de reserpinización	24
12.3 Lesión con ácido kaínico	24
12.4 Preparación del tejido	25
12.5 Obtención de sinaptosomas	26
12.6 Estudios de liberación de [³ H]-GABA	27

12.7 Determinación de proteínas por Western Blot	29
13. Resultados	29
13.1 Presencia de receptores TrkB en terminales estriado-nigrales	29
13.2 La activación de los receptores TrkB potencia la liberación de [³ H]-GABA	31
13.3 La potenciación generada tras la activación de los receptores TrkB no depende de la actividad dopaminérgica en las terminales estriado-nigrales	34
13.4 La activación de los receptores TrkB sobre la liberación de [³ H]-GABA implica la activación de la fosfolipasa C	37
13.5 La activación de los receptores TrkB depende del influjo de calcio en la terminal estriado-nigral	38
14. Discusión	41
14.1 Presencia de receptores TrkB en terminales estriado-nigrales	41
14.1.1 La activación de recetores TrkB genera la potenciación de la liberación de [³ H]-GABA en las terminales estriado-nigrales	43
14.1.2 La relación entre la actividad de BDNF y dopamina no participa en eventos a corto plazo de las terminales estriado-nigrales	44
14.2 La activación de la PLC y la movilización de calcio son procesos indispensables para el funcionamiento de los receptores TrkB en las terminales estriado-nigrales	46
14.2.1 La potenciación en la liberación de GABA se da por medio de la activación de la vía PLC a través de los receptores TrkB	47
14.2.2 Influxo de Ca ²⁺ a la terminal tras la apertura de canales dependientes de voltaje	48
14.3 BDNF y receptores TrkB como una alternativa terapéutica para el tratamiento en desordenes motores	52

15. Conclusiones	56
16. Bibliografía	57
Anexo 1	63

1. Factores neurotróficos

La presencia de factores tróficos regulando los procesos de sobrevivencia celular y muerte programada dentro del sistema nervioso fue sugerida desde hace tiempo, cuando se observó que al realizar una axotomía (corte transversal del axón), para evitar que las neuronas alcanzaran a la célula blanco, se daba un proceso de muerte celular programada sugiriendo la presencia de factores neurotróficos (NTFs). Tiempo después la hipótesis fue validada cuando se aisló el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), cuya estructura resulto ser muy similar al factor de crecimiento nervioso (NGF), llevando así al concepto de una familia de neurotrofinas (Skaper, 2012). Recordemos que NGF regula la sobrevivencia y maduración de neuronas en desarrollo del sistema nervioso periférico, por lo que se expresa en distintas regiones del cuerpo humano, al llevar las proyecciones de estas neuronas hacia las respectivas células efectoras en los diferentes órganos del cuerpo (Sofroniew *et al.*, 2001).

En cuanto al mecanismo por el cuál ejercen su función, de manera general la activación de receptores a factores neurotróficos lleva a la activación de enzimas tirosina cinasa al interior de la célula mismas que se encargan de propagar el efecto dentro de la misma. Esto lleva a cambios en la expresión de genes, que resultan críticos para todas las respuestas celulares (Segal y Greenberg, 1996). Sin embargo, la activación y propagación de señales se da de manera diferenciada dependiendo de la estructura o mecanismo de regulación presente en cada una de las familias de receptores en las que se dividen los factores neurotróficos.

La caracterización de los mecanismos de señalización que rigen a los factores neurotróficos, está muy lejos de llegar a permitirnos entender cómo es que el simple hecho de variar la naturaleza del agente estimulante para un receptor genera la diversidad de respuestas que llevan a efectos sobre la proliferación, diferenciación y muerte programada en las células (Segal y Greenberg, 1996)

2. Neurotrofinas

Aunque en un inicio las neurotrofinas fueron identificadas como factores de acción para la sobrevivencia neuronal, actualmente son reconocidos por su amplia gama de respuestas fisiológicas que incluyen la regulación de la proliferación de tejidos, regulación del crecimiento de neuritas, modulación de respuestas sinápticas, además de las ya conocidas para la sobrevivencia y la apoptosis (Roux y Baker, 2002).

Tras varios estudios, se han identificado cuatro grupos de neurotrofinas en el humano, éstas son el NGF, BDNF y las neurotrofinas 3 (NT-3) y 4 (NT-4) (Balaratnasingam *et al.*, 2012). Aunque los efectos sobre la célula pueden ser diferenciados debido a la neurotrofina que está activando a su receptor específico, este grupo de factores de crecimiento están ligados a la unión con receptores de tipo tirosina cinasa (RTK) (Segal y Greenberg, 1996).

De hecho, tras estudiar a las neurotrofinas, se encontró que este grupo de factores neurotróficos interactúan con dos clases de receptores, los receptores tirosina cinasa de tipo tropomiosina cinasa (Trk) y los receptores para neurotrofinas p75 (p75^{NTR}), también pertenecientes a la familia RTK. De manera interesante, los receptores Trk presentan selectividad a neurotrofinas en base a los subtipos de receptor que pueden activar: TrkA responden a NGF, los receptores TrkB a BDNF y los receptores TrkC a NT-3 (Chao y Hempstead, 1995).

Debido a que cada una de las neurotrofinas interactúan ya sea con miembros de la familia p75 o Trk, podríamos esperar que todas tuvieran un efecto similar en la célula. Sin embargo, estudios realizados sobre los efectos de las neurotrofinas en procesos neurotróficos que se desencadenan en neuronas, revelaron que BDNF y NT-3 pueden tener efectos muy diferentes al unirse a las isoformas TrkB y TrkC, respectivamente, promoviendo la sobrevivencia (BDNF) o la diferenciación (NT-3) en células corticales precursoras (Segal y Greenberg, 1996).

3. Generalidades de los receptores tipo tirosina cinasa

Los receptores tirosina cinasa son proteínas de un solo pase transmembranal (TM) que juegan un papel crítico en el desarrollo, diferenciación y migración celular (Li y Hristova, 2010). En el cuerpo humano se conocen 58 RTKs, mismos que se clasifican dentro de 20 subfamilias. Todos estos receptores comparten una arquitectura molecular muy similar, conformada por una región extracelular N-terminal que funge como dominio de unión al ligando y una hélice transmembranal seguida de una región juxtamembranal que contiene el dominio tirosina cinasa (TDK) además del carboxilo terminal y una región reguladora (Lemmon y Schlessinger, 2010).

Los TDKs de cada uno de los RTKs contienen un lóbulo N y un lóbulo C que, de acuerdo a estructuras cristalizadas de varios RTKs, cuando estos se encuentran inactivos presentan configuraciones muy variadas entre cada uno de estos receptores, reflejando la diversidad en sus mecanismos de regulación; sin embargo, las formas activas son muy similares debido a que elementos clave como el “asa de activación” y la hélice αC del lóbulo N adquieren una configuración específica en cada uno de estos receptores, misma que es necesaria para dar paso a la catálisis del proceso de fosfotransferencia (Lemmon y Schlessinger, 2010) (Figura 1).

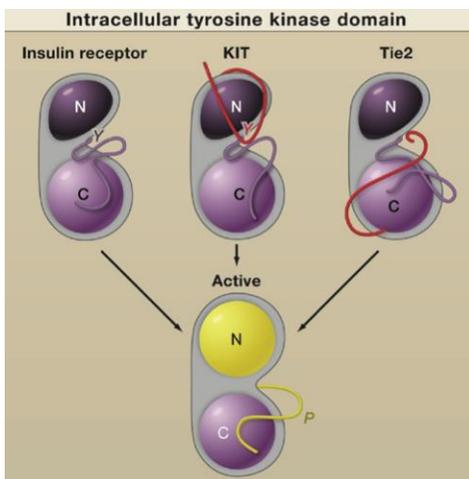


Figura 1. Conformación inactiva de los dominios N y C en los receptores a insulina, KIT y Tie2, todos pertenecientes a la familia de RTKs. Se puede observar que en el caso de KIT la región juxtamembranal (rojo) interactúa directamente con el sitio activo para estabilizar la conformación inactiva, así como la prevención de una posible autofosforilación. Mientras que en el receptor a Tie2 el segmento C-terminal es el encargado de la estabilización del dominio. Sin embargo, al ser fosforilados y pasar a la forma activa, todos los receptores adquieren una estructura similar.

Los factores neurotróficos sintetizados por las células blanco con las que interactúan las terminales de los axones que expresan los receptores específicos, son el soporte mediante el cual la neurona aferente sobrevive. Por tal motivo, y debido a que durante el desarrollo la concentración de neurotrofinas tiende a ser muy baja, es necesaria la formación de receptores que tengan una alta afinidad por su respectivo ligando (Chao y Hempstead, 1995).

3.1 Mecanismo de activación de los RTKs

La unión de neurotrofinas a miembros de la familia Trk produce respuestas biológicas a través de la activación del dominio tirosina cinasa presente en la estructura de este tipo de receptores, llevando a un aumento rápido en la fosforilación de sustratos celulares selectivos (Chao y Hempstead, 1995).

Se sugiere en base a estudios recientes, que en los RTKs existe un sencillo mecanismo para la dimerización inducida por ligando: un ligando bivalente interactúa de manera simultánea con dos receptores lo que genera un enlace cruzado que lleva a la formación del dímero (Lemon y Schelessinger, 2010). Dicha actividad bivalente o multivalente, se refiere al múltiple reconocimiento de eventos moleculares del mismo tipo que ocurren de manera simultánea entre dos entidades, en este caso los receptores tirosina cinasa. Lo anterior implica que una molécula con baja afinidad, luego de generar una acumulación de fuerza entre la afinidad de varias interacciones individuales, llegue a generar una mayor actividad biológica de una magnitud similar a la que provocaría un elemento con alta afinidad (Manhold *et al.*, 2006).

La transferencia del fosfato γ del ATP a los residuos de serina, treonina y tirosina del receptor, genera un cambio conformacional que modula la actividad del receptor. La comparación de la estructura primaria de las cinasas que activan la fosforilación de estas proteínas muestra un núcleo catalítico resguardado por secuencias reguladoras, a

través de las cuales la cinasa recibe información que determina su actividad (Cadena y Gill, 1992).

3.2 Vías de señalización de los RTK en general

En general, los RTKs cuentan con dos distintos mecanismos para transmitir la información al interior de la célula, estos son mediante la fosforilación de proteínas y mediante la interacción proteína-proteína (Cadena y Gill, 1992).

La fosforilación de proteínas se da mediante la interacción entre dos receptores de tipo RTK, a través de lo que puede denominarse como una fosforilación cruzada, esta es una respuesta extremadamente rápida hacia la unión con el ligando de los receptores para factores de crecimiento. Este proceso elimina la inhibición competitiva o la participación de sustratos alternativos. Al fosforilar a la tirosina se generan sitios de alta afinidad para la unión de proteínas específicas, este dominio se conoce como SH2 y está formado por alrededor de 100 aminoácidos. Algunas proteínas que también contienen este tipo de dominios se unen a receptores de factores de crecimiento que se encuentran fosforilados, dentro de estas se incluyen la GAP, PLC- γ , la IP 3-K y p60^{C- STC} (Cadena y Gill, 1992).

3.3 Receptores p75^{NTR}

Se sugiere que los receptores a p75, junto con los receptores Trk, juegan un papel importante en la actividad que ejercen las neurotrofinas sobre el organismo debido a que el patrón de distribución de los receptores p75, comparado con el de los receptores Trk, es mucho más amplio puesto que incluye distintos tipos celulares tales como las células de Schwann, motoneuronas, células de Purkinje, entre otras (Chao y Hempstead, 1995). Cabe mencionar, que si bien los receptores p75 y los Trk son co-

expresados en varias células, es un hecho que la expresión entre ambos receptores es independiente una de otra (Chao y Hempstead, 1995).

Si bien, la función de las neurotrofinas es mediada tanto por receptores Trk como p75, la interacción de ambos receptores no parece ser necesaria en el proceso de señalización (Barbacid, 1995). De hecho, la presencia del receptor p75 podría estar más ligada a la modulación de la respuesta celular generada por algunas neurotrofinas (Segal y Greenberg, 1996).

En base a la relación de p75 y Trk, basándose en la regulación del primero sobre el segundo Chao y colaboradores (1995) propusieron los modelos que se observan en la figura 2, en los cuales la interacción entre ambos receptores no es necesariamente directa. En la propuesta A, la coexpresión de ambos receptores podría generar un cambio conformacional en el receptor Trk, llevando a incrementar el rango de asociación a su ligando por medio de un aumento en la afinidad en el sitio de unión. En el caso del modelo B, el ligando se une en primera instancia con p75, para incrementar las concentraciones del ligando en el medio y ayudar a la unión de este con el receptor Trk. Estos modelos surgen a partir de que en algunos estudios de interacción bioquímica los receptores Trk y los p75 se co-precipitan sólo bajo ciertas condiciones.

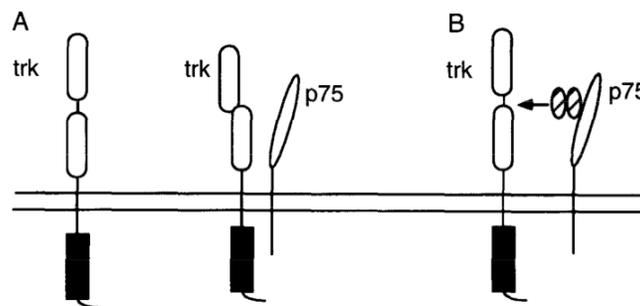


Figura 2. Dos diferentes mecanismos para interpretar las interacciones entre los receptores p75 y los Trk. (A) La presencia de los receptores p75 genera un cambio conformacional en la estructura de Trk, generando un aumento en la afinidad del sitio de unión a ligando. (B) El modelo para entrega de ligando sugiere que la neurotrofina en cuestión se une primero al receptor p75 lo que podría generar un aumento en la concentración local del ligando o una transferencia directa del ligando hacia Trk (Chao *et al.*, 1995).

3.4 Receptores Trk

La subfamilia Trk de receptores tirosina cinasa constituye la segunda clase principal de receptores a neurotrofinas en mamíferos. En cuanto a su estructura, el dominio extracelular de cada uno de los receptores que forman el dímero está conformado por una región rica en cisteína, seguida de un dominio conformado por 3 repetidos de leucina, otro conjunto rico en cisteína y dos dominios tipo inmunoglobulina, el último de estos se sugiere que es responsable de la unión al ligando. Al igual que el resto de los RTKs cada receptor tiene una hélice transmembranal que lleva hacia el citoplasma para dar paso al dominio tipo tirosina cinasa, rodeado de varios residuos de tirosina que sirven como sitios de acople que facilitan la activación de enzimas y otras moléculas citoplasmáticas (figura 3) (Roux y Barker, 2002; Skaper, 2012).

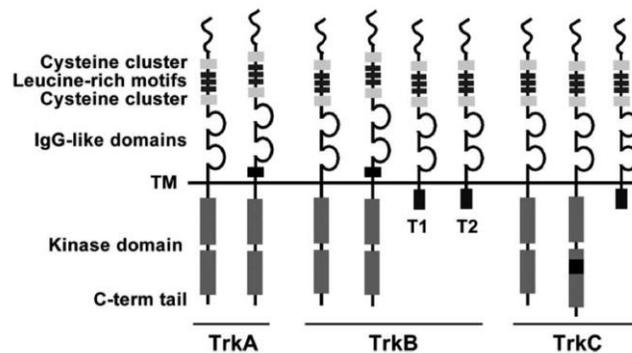


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes isoformas para cada uno de los receptores Trk presentes en mamíferos. Los tres genes que codifican para cada uno de los receptores pueden experimentar un proceso de corte y empalme, también conocido como “splicing”, llevando a la generación de isoformas más cortas debido a la falta de una secuencia corta de aminoácidos en los dominios extracelulares (TrkA y TrkB), en los dominios intracelulares (TrkB y TrkC), así como la inserción de aminoácidos en el dominio tirosina quinasa (TrkC) (Roux y Baker, 2002).

Como se observa en la figura 3, las distintas isoformas de cada uno de los receptores Trk han sido descritas; sin embargo, aún se desconoce la función precisa de estas

isoformas aunque se les ha ligado a la modulación inhibitoria de la señalización, la concentración y almacenamiento de neurotrofinas (Roux y Barker, 2002).

3.5 Activación y señalización de los receptores Trk

Diferentes estudios han indicado que los residuos Y490 y Y785 de los receptores Trk son sitios importantes para la adaptación de proteínas que desencadenan la activación de Ras, PI3-K y PLC, por lo que, la atención sobre el estudio de la señalización de los receptores TrkB se ha centrado en estas tres vías y su participación sobre el efecto de crecimiento diferenciación y supervivencia generado por su activación (Roux et al., 2002).

3.6 Movilización y procesamiento de receptores Trk

El dominio extracelular de los receptores Trk contiene múltiples sitios de glucosilación, mismos que al no ser glucosilados sirven como mecanismo de regulación al impedir que los receptores lleguen a la superficie celular y, por lo tanto, impidiendo su activación (Friedman y Greene, 1999). Sin embargo, una vez que el ligando se une y se desencadena el efecto de los receptores Trk sobre la célula, estos receptores son rápidamente endocitados por un mecanismo dependiente de clatrina mismo que puede tener impacto sobre las respuestas fisiológicas de las neurotrofinas puesto que determinan la fuerza y la duración de las cascadas de señalización que se dan tras la activación. Algunos estudios han revelado tres posibles vías a las que se someten los receptores Trk luego de la endocitosis. Una de las más estudiadas es el transporte retrogrado necesario para las respuestas tróficas sobre las neuronas, pero utilizado por una mínima cantidad de receptores Trk. Las otras vías alternativas son el tráfico hacia lisosomas, en donde los receptores son degradados para generar una regulación a la baja de los receptores en la membrana y así generar una disminución en la respuesta al ligando, y el reciclaje de receptores hacia la membrana (Chen *et al*, 2005).

Se sabe que algunos de los RTKs son regulados por un proceso de ubiquitinización que frecuentemente depende de la activación del receptor, disminuyendo los efectos generados sobre la señalización mediante la degradación del receptor. Además, se ha reportado que estos receptores se mantienen activos incluso después de ser vesiculados, por lo que una vez que el receptor es internalizado, este debe ser desfosforilado o ubiquitinizado, mientras que el ligando activo se disocia del receptor debido al pH bajo en el interior del endosoma (Lemmon y Schelessinger, 2010).

De acuerdo al estudio realizado por Chen y colaboradores, en el 2005, sobre los receptores a neurotrofinas de tipo TrkA y TrkB, se determinó que el tráfico de receptores tras la unión de su ligando específico se dirige hacia vías intracelulares alternativas. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que tras la activación de los receptores TrkA, estos se reciclan y son redirigidos hacia la superficie celular luego de que el ligando ya ha cumplido su función; mientras que los receptores TrkB son llevados hacia el interior celular para ser degradados con el fin de regular su participación en la función de la célula.

4. Receptores TrkB y BDNF

4.1 Mecanismo de activación de los receptores TrkB

Los receptores TrkB son activados específicamente por BDNF y con menor afinidad interactúan con NT-4. Al igual que los receptores Trk, estos receptores son activados una vez que se une su ligando específico, en este caso BDNF, esto lleva a la formación de un dímero entre dos receptores TrkB que se mantiene estable una vez que se han fosforilado los dos dominios tirosina cinasa que se localizan en la porción intracelular de cada receptor (Gupta et al., 2013). Aún se conoce muy poco acerca del proceso de tráfico y reciclaje de receptores Trk, pero en general, al reciclar los receptores y llevarlos de regreso a la membrana se puede generar una resensibilización funcional o la prolongación de los eventos de señalización que ocurren en la superficie celular (Chen *et al.*, 2005).

4.2 Vías de señalización

Cuando el BDNF es liberado tras la despolarización de la neurona, activa rápidamente distintas vías de señalización a través de la estimulación de su receptor específico, el receptor TrkB (Zhang *et al.*, 2012). Como se mencionó dentro de las generalidades de los RTKs, para que la activación del receptor TrkB se dé a partir de la unión con BDNF se requiere la dimerización de dos de estos receptores así como la transfosforilación entre ambos. Sólo de esta forma, la fosforilación del dímero TrkB puede desencadenar la activación de las vías MAPK, PI3-K y PLC γ (Jang *et al.*, 2010).

De manera más específica, se sabe que los receptores TrkB regulan el crecimiento y sobrevivencia neuronal mediante el control de la cascada de señalización Ras-PI3K-Akt. Además, estos receptores pueden activar la vía de señalización GRB-Ras-MAPK-Erk y así regular tanto la diferenciación como la maduración celular. Por otro lado, se ha determinado que mediante la señalización por la vía PLC γ y a través de la PKC, estos receptores regulan la plasticidad sináptica. Los receptores TrkB también pueden interactuar con p62 y otras proteínas membranales para modular la activación de MAPK/Erk (Figura 4)(Gupta *et al.*, 2013).

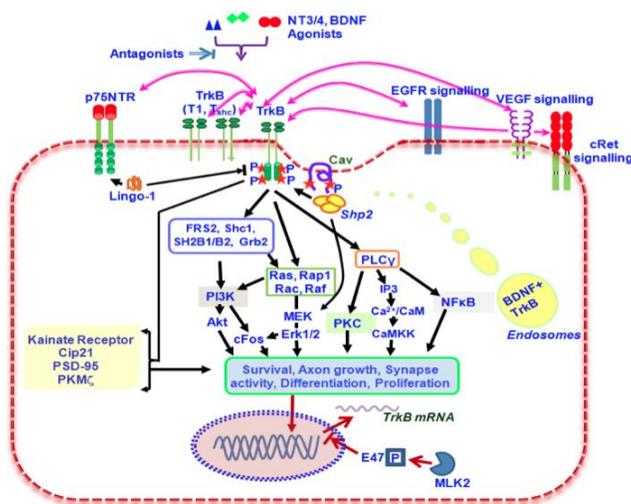


Figura 4. Representación esquemática de la señalización generada por BDNF/TrkB. La unión del factor neurotrófico lleva a la auto-fosforilación del dominio intracelular del receptor. Se muestra la interacción cruzada con otros receptores así como su regulación. La internalización y transporte de BDNF/TrkB en la célula hacia el endosoma se muestra en un diagrama simple (Gupta *et al.*, 2013).

5. Interacción entre receptores RTK y receptores acoplados a proteínas G

5.1 Generalidades sobre los receptores acoplados a proteínas G

Dentro de los receptores metabotrópicos, es decir, activados por ligando, que se encuentran presentes en la superficie celular de neuronas del sistema nervioso, se conoce un tipo de receptores que median sus acciones a través de una vía que involucra la activación de proteínas reguladas por unión a nucleótidos de guanina (Proteínas G), por lo que se les denomina receptores acoplados a proteínas G o GPCRs por sus siglas en inglés. La clonación y determinación de secuencias de más de 100 miembros de esta gran familia de receptores, muestran que constan de siete segmentos hidrofóbicos embebidos en la membrana celular, los cuales se conforman de entre 20-25 aminoácidos mismos que están predispuestos a formar α -hélices transmembranales, conectadas mediante asas intracelulares y extracelulares alternadas (Strader *et al.*, 1994).

Las proteínas G son una familia de proteínas heterotriméricas, que se conforman de tres subunidades α , β y γ . Actualmente, estas proteínas se agrupan de acuerdo a la subunidad α , debido a que se tiene como la subunidad más activa. La clasificación de proteínas G_α se divide en cuatro subtipos: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ y $G_{\alpha 12}$ (Gorwood y Hamon, 2006). La familia de proteínas $G_{\alpha s}$, o estimuladoras, se subdivide en las proteínas $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha olf}$, con sus variantes larga ($G_{\alpha s-L}$) y corta ($G_{\alpha s-S}$) originadas mediante *splicing* de las proteínas $G_{\alpha s}$ (Gorwood and Hamon, 2006). Ambas familias proteicas son capaces de activar a la adenilato ciclasa (AC) para incrementar los niveles intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Simon, Strathmann y Gautam, 1991). En cuanto a la familia de proteínas $G_{\alpha i}$, también conocidas como inhibitorias, estas se componen de los subtipos $G_{\alpha i-1}$, $G_{\alpha i-2}$, $G_{\alpha i-3}$, $G_{\alpha z}$, $G_{\alpha o-1}$, $G_{\alpha o-2}$ y $G_{\alpha t}$. Los miembros del subtipo $G_{\alpha i/o}$ inhiben la actividad de la AC y también mantienen abiertos los canales iónicos de K^+ ; mientras que, las proteínas del tipo $G_{\alpha q}$ se subdividen en $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 14}$, $G_{\alpha 15}$ y $G_{\alpha 16}$ y se sabe que todos los miembros de este grupo proteico activan a la

fosfolipasa C (Gorwood y Hamon, 2006). Por su parte las subunidades β y γ pueden activar o inhibir algunos tipos de AC y activar a la PLC- γ , a los canales de potasio rectificadores, entre otros efectores (Gainetdinov *et al.*, 2004).

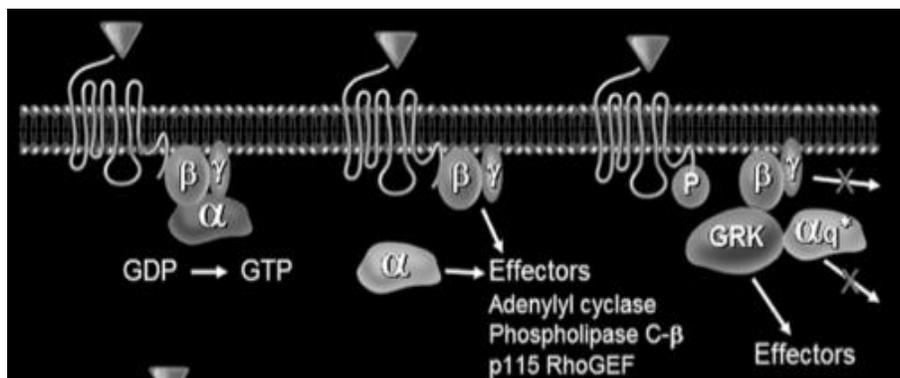


Figura 5. Representación esquemática que muestra los pasos clave de la activación y señalización de los GPCRs (Gainetdinov *et al.*, 2004).

El proceso de señalización (figura 5) se inicia cuando el ligando o agonista adecuado se une al receptor sobre la superficie celular, el dominio intracelular de los receptores cambia su conformación y esto da como resultado un estado del receptor que actúa como factor de cambio para la proteína heterotrimérica de unión a nucleótidos de guanina (Proteína G). El receptor activado facilita la liberación de GDP de la proteína G inactiva, así mismo, se une un GTP para activar a la proteína G. Una vez activada, la proteína G sus tres subunidades se disocian en dos, la subunidad α por un lado y por otra parte el complejo $\beta\gamma$, y cada una se encarga de continuar la señalización mediante diferentes vías (Premont y Gainetdinov, 2007).

5.2 Interacción cruzada entre RTKs y GPCRs

Gracias a estudios realizados en distintas regiones del sistema nervioso central, se ha llegado a determinar que los GPCRs y RTKs no operan de manera aislada, sino que funcionan en conjunto para generar una compleja red de señalización río abajo. Esta

comunicación cruzada permite a las células integrar información de diversas fuentes, produciéndose así una gran cantidad de interacciones río abajo (Shah y Catt, 2003).

En el caso de la interacción cruzada entre GPCRs y proteínas tirosina cinasa (PTK), dentro de las que se encuentran los RTKs, se puede dar de manera bidireccional (Gavi *et al.*, 2006), es decir, que las funciones de los receptores acoplados a proteínas G pueden ser modificadas tras la acción de RTKs y viceversa. Aunque este tipo de interacciones no ha sido estudiada en receptores TrkB si se ha demostrado para otros tipos de RTKs, dada la similitud que estos receptores comparten entre sí en su forma activa, podemos decir que la posibilidad de que este mecanismo se presente en las vías de señalización que implican al receptor TrkB es grande.

En el caso de los receptores RTK que responden al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), se sabe que estos disminuyen la actividad de los receptores NMDA, pero recientemente se ha demostrado que la activación de los receptores D4, presentes en la región CA1 del hipocampo, llevan a una transactivación de los receptores PDGF que bloquea la disminución de la señalización por glutamato. Por lo que se sugiere que al activar los receptores D4 se genera una transactivación por medio de la PLC γ , misma que se sabe es activada por los receptores PDGF (Shah y Catt, 2004).

Por otro lado, para estudiar la relación entre receptores RTK y GPCR, de manera experimental se ha usado la genisteína, un isoflavonoide derivado de la soya que inhibe la actividad de PTK. De acuerdo a Gavi *et al.* (2006), en el hipotálamo y el área pre-óptica del cerebro, los niveles de AMPc generados por la estimulación de AR α_1 y/o AR α_2 con norepinefrina son reducidos por la genisteína sugiriendo que las PTK están jugando un papel importante sobre la regulación de la formación de este compuesto.

En base a lo anterior podemos decir que la selectividad en la comunicación cruzada entre los sistemas de RTKs y GPCRs permite a las células integrar la información que

proviene de distintas fuentes, esto provee un intrincado manejo del control sobre múltiples mecanismos regulatorios (Shah y Catt, 2004)

6. Relación entre los receptores TrkB y los receptores a dopamina

6.1 Generalidades sobre los receptores dopaminérgicos

La dopamina (DA) es el neurotransmisor catecolaminérgico predominante en el cerebro de los mamíferos, donde participa en una gran variedad de funciones que incluyen la actividad motora, el aprendizaje, la afectividad, el reforzamiento positivo, la regulación neuroendócrina y la ingestión de alimentos (Missale *et al.*, 1998).

Los receptores para DA pertenecen a la superfamilia de GPCRs por lo que presentan la estructura característica de 7 dominios transmembranales, de 20 a 25 residuos hidrofóbicos, conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas y extracelulares y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000). Existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos presentes en mamíferos mismos que han sido agrupados en dos clases, los de la clase D1 que incluyen a los subtipos D1 y D5, y la clase D2 compuesta por los subtipos D2, D3 y D4. A nivel molecular, muchas de las propiedades de señalización están compartidas entre los subtipos dentro de una clase y la similitud en la vía de transducción de señales es uno de los criterios mediante los que estos receptores son agrupados en las diferentes clases (Neve, Seamans y Trantham-Davidson, 2004). En el caso de los receptores de tipo D1, la señalización se da a partir de la activación de proteínas G de tipo estimulador, mientras que los receptores de clase D2 activan proteínas de tipo inhibitorio al ser activados.

6.2 Efecto de la activación crónica de los receptores TrkB y los receptores a dopamina

Se sabe que los receptores a dopamina promueven la diferenciación, el mantenimiento y la sobrevivencia neuronal mediante la modulación de la transcripción de diferentes genes. Debido a que BDNF también está encargado de regular estas acciones en las neuronas, se ha sugerido que tanto la DA como BDNF y la consecuente activación de sus receptores lleven a cabo una interacción río abajo que en conjunto les permita ejercer su función. En base a esto Hasbi *et al.* (2009) realizaron un estudio en cultivos de neuronas estriatales posnatales y en tejido adulto, para analizar la posible interacción cruzada entre la activación del dímero D1-D2 y el aumento en la expresión de BDNF. Sus resultados mostraron que luego de la activación crónica del dímero D1-D2 los niveles de expresión de BDNF aumentan de manera significativa y a su vez esto genera el desarrollo temprano de los axones y dendritas en las neuronas sometidas al tratamiento. La explicación que dan para esta interacción es que mediante el acople a proteínas G_q por parte del dímero D1-D2, se desencadena la vía PLC-IP₃, misma que lleva a la movilización de Ca^{2+} a partir de los almacenes intracelulares presentes en el soma, lo que genera la activación de la calmodulina quién lleva a la activación de la CaMKII α para que está, una vez fosforilada, sea translocada hacia el núcleo y así generar la síntesis de BDNF.

En el trabajo de Iwakura *et al.* (2008) se demuestra que en cultivos de neuronas estriatales en desarrollo la DA es capaz de transactivar a los receptores Trk, en un curso temporal similar al de los GPCRs. De hecho, la activación de TrkB a partir de la señalización generada por la activación de D1 ocurre sin la necesidad de involucrar neurotrofinas, además de aumentar los niveles de fosforilación de los receptores TrkB, también aumenta su expresión en la superficie celular, a través del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la neurona. Lo que sugiere que la DA es capaz de comunicarse con la señalización generada por neurotrofinas, las cuales son responsables de un sin número de cambios morfológicos en las neuronas.

Debido a la existencia de un entrecruzamiento de las vías de señalización que implican la relación BDNF-CaMKII α y BDNF-DARPP-32, se ha llegado a sugerir que la modulación de BDNF mediante terapias farmacológicas podría estar iniciando una cascada de señales regulatorias mutuas, generando en un aumento de la plasticidad sináptica (Fumagalli *et al.*, 2006). Naturalmente, la regulación de esta función dependería de la activación tónica de ambos receptores y, en el caso de la vía BDNF-CaMKII α , de las concentraciones de calcio en la terminal sináptica.

6.3 Efecto de la activación aguda de los receptores TrkB

Se sabe que la influencia de BDNF sobre la plasticidad sináptica no se da sólo a nivel de la membrana sino también en un nivel intracelular a partir de la promoción de la síntesis de proteínas, esto significa que BDNF puede modular de manera aguda la fuerza en la respuesta de una sinapsis luego de ser estimulada. En base a esto el grupo de Lang *et al.* (2007) demostró en cultivos de neuronas piramidales en desarrollo que la aplicación de BDNF exógeno tiene dos efectos sobre las neuronas CA1, el primero activa directamente el aumento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ y, segundo, causa un aumento en la actividad de la red de señalización, probablemente modulando las funciones sinápticas. Además sugieren que los efectos del BDNF exógeno y endógeno sobre las corrientes de Ca^{2+} son distintos en cuanto a la velocidad de la respuesta, pues la liberación rápida de BDNF hacia sitios específicos genera una activación inmediata de las corrientes de calcio.

En el 2012, Amaral y Pozzo-Miller estudiaron el efecto agudo de la activación de receptores TrkB sobre neuronas piramidales de las regiones CA3 y CA1 del hipocampo. Mediante registros intracelulares de célula completa, observaron que al exponer a las células a BDNF durante 30 segundos, aumentaba la frecuencia de las corrientes miniatura post sinápticas excitatorias; así mismo, encontraron que al eliminar

el calcio intracelular, este aumento en la frecuencia se veía disminuido más no prevenido. Por otro lado, al eliminar el calcio extracelular ya no se generó el aumento en la frecuencia. Esto sugirió que para que BDNF pueda generar el aumento en las mEPSC, requiere de las fuentes de calcio tanto intracelular como extracelular y que esta movilización de calcio se da a través de los canales TRP (Receptores de potencial transitorio), los cuales pueden ser activados mediante la cascada de señalización que activa PLC γ .

Es necesario enfatizar que la mayoría de los estudios relacionados con los efectos agudos de la activación de los receptores TrkB a través de la aplicación de BDNF o de 7,8- Dihydroxiflavona, un agonista ampliamente utilizados en estudios de esta índole y tan afín a los receptores TrkB que ha sido propuesto como una alternativa terapéutica en algunos padecimientos neurodegenerativos (Gupta *et al.*, 2013), han mostrado que la acción de BDNF depende de las concentraciones de calcio; sin embargo, dado que la mayoría de estos trabajos son enfocados a electrofisiología o a cuantificar las concentraciones de calcio en la célula, aún resta determinar mediante que mecanismo de acción es que el BDNF llega a activar los canales de calcio, o bien, movilizar el calcio de los almacenes intracelulares.

7. Participación de los receptores TrkB en el control de la actividad motora

Si bien las neurotrofinas han demostrado ser la piedra angular del crecimiento, diferenciación, sobrevivencia y muerte programada de las células, estudios recientes han demostrado que su relevancia para estas acciones las hacen partícipes de cualquier proceso que implique el buen funcionamiento de la célula. Para fines de este trabajo de investigación, hemos centrado nuestra atención hacia el papel que juegan la presencia, activación y funcionamiento de los receptores TrkB dentro del circuito de los ganglios basales, el sistema encargado del control motor.

7.1 El sistema de los ganglios basales

Los ganglios basales proveen un importante sistema neuronal a través del cual la corteza ejerce un control sobre el comportamiento, esto a través de la formación de una compleja red neuronal de circuitos organizados en paralelo que son vitales para integrar la actividad de diferentes regiones corticales (asociativa, oculomotora, límbica y motora), por lo que se les ha asociado no sólo con el control del movimiento sino también con la planeación de la memoria del trabajo y la generación de emociones; sin embargo, el más notable de sus efectos es el enfocado hacia el movimiento. (Obeso *et al.*, 2002). En términos generales, la información neuronal es canalizada en el estriado, la principal región de entrada a los ganglios basales, a partir de tres principales grupos de aferencias: las vías cortico-estriatal, tálamo-estriatal y nigro-estriatal (Björklund and Hökfelt, 2005).

El 90% de la población neuronal del estriado está constituida por neuronas espinosas medianas, mismas que se subdividen en dos poblaciones basadas en sus proyecciones axonales. Una población se dirige directamente hacia la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) que es la interfase entre los ganglios basales y el resto del cerebro, mientras que la otra población proyecta de manera indirecta hacia ese mismo núcleo, al hacer un relevo del globo pálido externo (GPe) hacia el núcleo subtalámico (STN), quien se encarga de enviar la señal hacia el núcleo interfase (Gerfen y Surmeier, 2011)(Figura 6).

Una de las características que distinguen a la vía directa de la indirecta es la expresión diferencial de receptores a dopamina. Los receptores D1 se expresan en las neuronas espinosas medianas que proyectan del estriado a la SNr mientras que las neuronas que llegan hacia el globo pálido expresan receptores dopaminérgicos de tipo D2 (Gerfen y Surmeier, 2011). Esta distribución lleva a efectos regulatorios sobre el circuito que son generados a partir de los diferentes mecanismos de señalización que se activan por estos dos tipos de receptores acoplados a proteínas G.

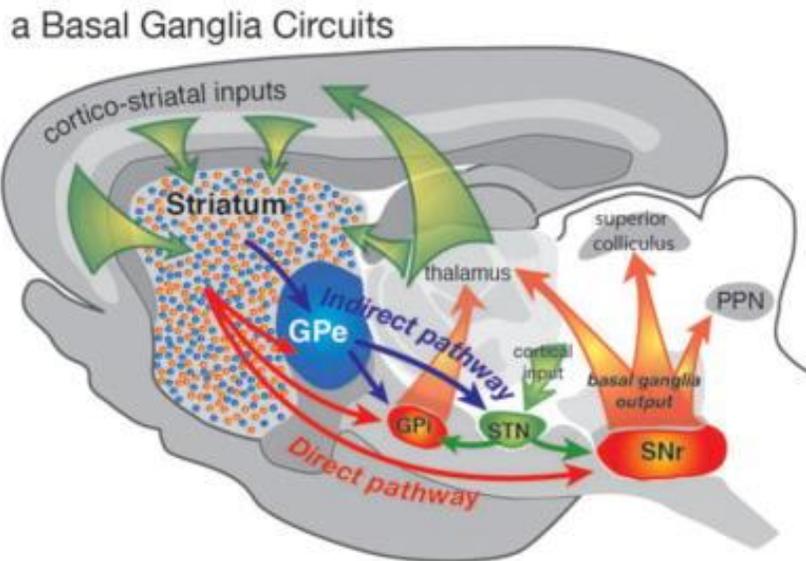


Figura 6. Circuito de los ganglios basales. El estriado recibe señales excitatorias de la corteza y el tálamo. Las señales que salen del circuito de los ganglios basales son enviadas por la porción interna del globo pálido (GP_i) y la sustancia *nigra reticulata* (SNr), la información que sale de estos núcleos va dirigida hacia el tálamo, el colículo superior y el núcleo pedúnculo pontino (PPN). La vía directa se origina a partir de las neuronas espinosas de proyección (SPNs) del estriado que expresan receptores D1 y que proyectan hacia los núcleos de salida. La vía indirecta se da a partir de las SPNs del estriado que expresan receptores D2 y que proyectan hacia la porción externa del globo pálido, mismo que en conjunto con el núcleo subtalámico forman un relevo sináptico que conecta con los núcleos de salida (Gerfen y Surmeier, 2011).

7.2 Expresión de los receptores TrkB en el circuito de los ganglios basales

Las neuronas dopaminérgicas de la porción ventral del cerebro medio, las de la sustancia negra y las del área ventral tegmental expresan BDNF (Fumagalli *et al.*, 2006). Por lo que se puede asumir que esta neurotrofina está jugando un papel importante en el funcionamiento y mantenimiento de estas neuronas. Además, en el estriado se ha encontrado RNA mensajero para BDNF y este núcleo cerebral envía una gran cantidad de proyecciones hacia la sustancia *nigra reticulata* (SNr), el estriado

además recibe gran cantidad de proyecciones provenientes de neuronas piramidales corticales, las cuales sintetizan BDNF y transportan la neurotrofina de manera anterógrada para luego ser liberada en cada potencial de acción, de manera calcio dependiente. Las aferentes dopaminérgicas al estriado también expresan receptores TrkB y liberan BDNF, el cual puede activar a los mismos receptores de las neuronas dopaminérgicas o los de las neuronas espinosas medianas. Por lo que, existe la probabilidad de que haya una fuerte interacción entre la señalización generada por DA, glutamato y BDNF/TrkB (McGinty et al., 2011).

7.3 Efecto de la activación de los receptores TrkB sobre la actividad motora

La alteración de los niveles de BDNF durante el desarrollo debido a complicaciones durante el periodo perinatal del desarrollo, eventos durante la infancia o el estrés en los adultos, está asociado con la generación de desórdenes psiquiátricos, como la esquizofrenia, y también problemas motores como la enfermedad de Huntington, debido al mal funcionamiento de la señalización por calcio y las proteínas relacionadas con esta (Hasbi *et al.*, 2009).

En el trabajo de Besusso et al., (2012), se demostró mediante la prevención de la señalización de receptores TrkB en neuronas estriado-palidales de ratón, que la activación de receptores TrkB es necesaria para el control de la inhibición de la conducta locomotora, pues la ausencia de estos receptores resulta en incremento a largo plazo de la locomoción espontánea, asociada a la pérdida en la expresión de expresión de encefalina y un aumento en la fosforilación de PKC y MAPK dependiente de la actividad de los receptores D2, llevando a una respuesta alterada de las neuronas espinosas medianas hacia las neuronas glutamatérgicas con las que hacen contacto por medio de las proyecciones que van hacia el núcleo subtalámico. En base a estos resultados, el estudio sugiere que la señalización generada por TrkB modula la actividad de las MSNs estriado-palidales integrando las entradas corticales de glutamato, probablemente, esto se esté dando en base a un aumento en la entrada de

Ca^{2+} que lleva a facilitar la regulación que tienen los receptores D2 sobre la señal estimuladora de glutamato, y de este modo mantener en balance fisiológico la transmisión de GABAérgica.

Por otro lado, la presencia de BDNF y receptores TrkB en las neuronas dopaminérgicas dentro de la sustancia *nigra pars compacta*, así como el efecto trófico que esta neurotrofina ha presentado a lo largo de diversos estudios, han generado gran interés en los grupos de investigación que estudian el proceso fisiopatológico de la enfermedad de Parkinson. De hecho, se ha encontrado que el tratamiento repetido de L-DOPA, utilizado en pacientes con esta enfermedad, presentan un aumento en los niveles corticales de BDNF lo que podría ser parte de las alteraciones en el sistema que dan pie a la generación de discinesias (Zhang et al., 2012).

8. Antecedentes

En 2002, Goggi y colaboradores demostraron que en rebanadas de estriado, al aplicar distintas concentraciones de BDNF y estimular con un aumento en la concentración de K^+ , se potencia la liberación de GABA y dopamina. Para confirmar que el efecto era dado por la actividad BDNF/TrkB se empleó K252a, un inhibidor del receptor TrkB, previniendo la potenciación en la liberación de neurotransmisor. Al parecer la actividad de receptores TrkB presinápticos tiene que ver con la estimulación de la liberación de neurotransmisor generada por la despolarización, y dado que los receptores TrkB que estimulan la liberación de GABA en el estriado ocurre muy probablemente en recurrentes colaterales y/o interneuronas GABAérgicas, es posible que estos receptores también se encuentren en las terminales estriado-nigrales modulando la liberación de GABA. Además, se ha sugerido que la liberación de dopamina es estimulada por el BDNF y los receptores TrkB, y que la dopamina modula la liberación de GABA a través de receptores D1 presinápticos; también estudiaremos si el efecto de los receptores TrkB sobre la liberación de GABA depende de la vía de activación de receptores D1 por dopamina endógena liberada durante la despolarización.

Por otro lado, Matsumoto *et al.* (2006) demostraron en cultivos de neuronas corticales en desarrollo, que el BDNF incrementaba los niveles de proteínas sinápticas relacionadas con el anclaje de vesículas a la membrana y que al bloquear la vía PLC γ con U73122 se inhibía dicho efecto. Sugiriendo que la actividad de BDNF se puede dar a partir de esta vía de señalización. De ser así, y dado que BDNF activa a los receptores TrkB, uno de los propósitos de este trabajo fue darnos a la tarea de determinar si en efecto la activación de estos receptores involucra esta vía.

Sabemos que la vía PLC-IP₃ está relacionada con la movilización del calcio intracelular, así como con el funcionamiento de los canales de calcio que se localizan en las terminales, por lo que el estudio de las corrientes de calcio es una parte fundamental del estudio de esta vía. En relación a esto, en el trabajo realizado por Jun He *et al.* (2005), sobre cultivos de neuronas corticales, se demostró que las señales de calcio evocadas por BDNF dependen tanto de la movilización de calcio intracelular como del influjo de calcio extracelular hacia el interior de la terminal, esto último posiblemente regulado por los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Esto sugiere que la señalización río abajo generada tras la activación de los receptores TrkB podría alternarse entre efectos agudos y crónicos.

Tomando en cuenta lo anterior, podemos suponer que los efectos de la interacción entre receptores dopaminérgicos, BDNF y la activación de los receptores TrkB, podría resultar en una alternativa terapéutica para los trastornos relacionados con la actividad de las neuronas dopaminérgicas que rigen el funcionamiento de los ganglios basales. Sin embargo, para poder generar tratamientos en base a el efecto de BDNF sobre la sobrevivencia y/o respuesta sináptica de las neuronas presentes en este circuito, es necesario tener una visión más clara acerca de los procesos bioquímicos de comunicación que suceden en las neuronas y que son pieza clave para los efectos neurotróficos que BDNF está generando a largo plazo sobre la sobrevivencia y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas.

9. Justificación

Debido a la importancia que la actividad de los receptores TrkB ha mostrado tener, no sólo en el crecimiento, mantenimiento y supervivencia de la célula, sino también en función de la regulación de la transmisión sináptica, es importante investigar qué papel juegan estos receptores en un sistema tan importante como lo es el circuito de los ganglios basales. Debido a que un mejor entendimiento de la actividad en conjunto de los receptores TrkB podría ser de ayuda para generar nuevas terapias para la mejora de padecimientos neurodegenerativos o alteraciones del sistema.

10. Hipótesis

Los receptores TrkB se expresan en las terminales estriado-nigrales y estimulan la liberación de [³H]-GABA involucrando a la PLC en su vía de señalización. La dopamina participa en el efecto de los receptores TrkB sobre la liberación de GABA.

11. Objetivos

11.1 Objetivo general

Estudiar el papel de los receptores TrkB presentes en las terminales estriado nigrales, en el control de la liberación de [³H]-GABA y su vía de señalización y el posible papel de la dopamina.

11.2 Objetivos particulares

- Estudiar la presencia de receptores TrkB en las terminales estriado-nigrales.
- Estudiar el efecto de la activación de los receptores TrkB sobre la liberación de [³H]-GABA en las terminales estriado-nigrales.
- Evaluar si el efecto de los receptores TrkB sobre la liberación de GABA depende de dopamina
- Evaluar si el efecto de los receptores TrkB sobre la liberación de [³H]-GABA involucra a la PLC.

12. Materiales y métodos

12.1 Material biológico

Para cada uno de los experimentos se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un rango de peso de entre 200-300 gramos. Hasta el momento previo a realizarse el experimento, las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas: alimento y agua *ad libitum*, ciclos de luz/oscuridad con una duración de 12 horas y temperatura ambiente de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

12.2 Proceso de reserpización.

Para generar la ausencia de dopamina endógena de forma aguda en los sujetos experimentales, de acuerdo a lo requerido por el protocolo experimental propuesto, se realizó un tratamiento con reserpina 16 horas antes del experimento. La reserpina fue disuelta en una solución con ácido láctico, para llevarla a una concentración de 10mg/kg de peso e inyectarla de manera subcutánea en las ratas. De acuerdo a García *et al.* (1997) la reserpina disminuye en aproximadamente un 95% los niveles de DA en el tejido.

12.3 Lesión con ácido kaínico

Los animales destinados para este protocolo experimental fueron anestesiados con una solución de ketamina (75 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) en una relación de 3:1, para luego ser colocados en un aparato para cirugía estereotáxica. Una vez colocado el sujeto experimental, se inyectó de manera unilateral 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solución de ácido kaínico disuelto en un buffer de fosfatos a concentración de 0.2 M con un pH de 7.4, mediante el uso de una jeringa Hamilton, con el fin de generar la degradación del tejido mediante un proceso de excitotoxicidad. En el núcleo estriado se administraron dos

inyecciones de 1 μ l, para la primera inyección las coordenadas utilizadas fueron: anteroposterior +1.9 mm a partir del bregma, mediolateral -2.2 mm a partir de la sutura media y dorsoventral +5.0 mm a partir de la duramadre; las coordenadas de la segunda inyección fueron: anteroposterior +0.9 mm a partir del bregma, mediolateral -3.0 mm a partir de la sutura media y dorsoventral +4.0 mm a partir de la duramadre, de acuerdo al atlas de Paxino & Watson. Una vez realizadas las inyecciones se dio un reposo de 5 minutos adicionales para la difusión de la neurotoxina. Inmediatamente después de recuperarse de la anestesia, las ratas inyectadas con ácido kaínico mostraron un comportamiento de giro contralateral al lado lesionado. Tras un periodo de 10 días bajo este último tratamiento, los animales fueron sacrificados para obtener el tejido correspondiente al estriado y la SNr para utilizarse en los distintos protocolos experimentales.

12.4 Preparación del tejido

El día del experimento, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y posteriormente fueron decapitadas para extraer el cerebro de manera inmediata, para poder fijarlo en una caja Petri y agregar solución Krebs-Henseleit normal (KH) (revisar anexo 1) fría (4°C). La preparación se llevó a un vibrátomo (CAMPDEN Instruments Ltd, USA) para obtener rebanadas de 300 μ m de espesor mediante la realización de cortes coronales. Mediante microdissección, se obtuvo la SNr de ambos hemisferios cerebrales tanto de ratas normales como de ratas tratadas con reserpina, dependiendo del protocolo experimental a realizar. Las rebanadas de SNr se colocaron en contenedores con solución Krebs-Henseleit normal a 37°C con un burbujeo constante de O₂/CO₂ (95%/5%), durante 30 minutos para estabilizar el tejido.

12.5 Obtención de sinaptosomas

Para los experimentos de Western blot, las rebanadas obtenidas mediante la microdissección se homogenizan con ayuda de un homogenizador (WiseStir HS-30E) a 400 rpm para posteriormente centrifugar a 5000 rpm, permitiendo separar los núcleos y mitocondrias. El sobrenadante se mezcla con una solución HEPES-Sacarosa 0.32 M y se ultra-centrifuga a 15,000 rpm durante 20 minutos. Se recupera la pastilla y se resuspende en nueva solución HEPES-Sacarosa 0.32 M. Los sinaptosomas son purificados mediante un gradiente diferencial de sacarosa usando soluciones HEPES-Sacarosa de concentraciones 0.32 M y 0.8 M y realizando una ultracentrifugación a 15,000 rpm. Después los sinaptosomas se congelan y son almacenados en refrigeración hasta ser usados en los experimentos.

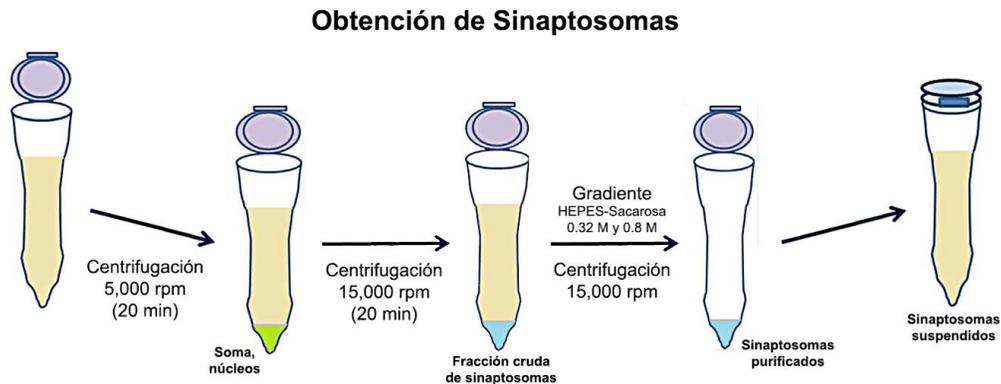


Figura 7. Procedimiento para la obtención de sinaptosomas. Cuando se obtiene el tejido deseado, este se homogeniza en una solución de HEPES 0.32M y a partir de esto se realizan una serie de centrifugaciones a diferente velocidad así como un gradiente de HEPES sacarosa con el fin de eliminar el tejido neuronal que no es de nuestro interés y así purificar los sinaptosomas, que son las terminales sinápticas aisladas del resto del tejido y que proporcionan la ventaja de mantener intacta toda la maquinaria de liberación.

12.6 Procedimiento para el experimento de liberación de [³H]-GABA

Una vez transcurrido el periodo de estabilización en las rebanadas de SNr obtenidas a partir de la microdissección, las rebanadas fueron suspendidas en una solución fisiológica con [³H]-GABA (2×10^{-8} M) durante 30 minutos en presencia de ácido aminooxiacético para evitar su degradación. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con solución KH normal para retirar el exceso de marca radioactiva no capturada. A las rebanadas de SNr previamente incubadas con [³H]-GABA se les adicionó ácido nipecótico (10 μ M) para evitar la recaptura.

Las rebanadas fueron transferidas a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, en donde se trataron con los fármacos a estudiar de acuerdo a las condiciones establecidas en el diseño para cada uno de los experimentos. Las cámaras fueron perfundidas de forma constante con solución fisiológica a 37°C en burbujeo constante, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Luego de un periodo de estabilización y de un lavado de 20 minutos, se colectaron 4 fracciones de 4 minutos para analizar la liberación basal del tejido, posteriormente se aplicó un pulso despolarizante de alto K⁺ para inducir la liberación de [³H]-GABA por despolarización de la terminal, mediante el aumento de concentración de potasio de 3 mM a 15 mM en la solución KH alto potasio (anexo 1) perfundida durante 6 colectas más. En cada experimento se corrieron 20 muestras en paralelo, mismas que se dividieron de acuerdo a cada tratamiento en base al diseño experimental en cuestión. Los fármacos fueron perfundidos a partir de la segunda colecta antes del pulso despolarizante, y durante la duración del mismo. Al terminar cada experimento, las rebanadas fueron extraídas de las cámaras y se les agregó 1 mL de HCl 1 N, por cada cámara, con el fin de degradar la membrana y cuantificar la radioactividad en el tejido. Para cada experimento diseñado, se realizaron un mínimo de 3 réplicas.

La cuantificación de [³H]-GABA liberado se realizó mediante la adición de 10 ml de líquido de centelleo a cada una de las fracciones colectadas. La radioactividad en cada muestra fue determinada mediante un contador de centelleo líquido. Los resultados obtenidos para cada fracción se obtuvieron mediante la siguiente relación:

$$F.R. = \frac{R.P.F.}{R.P.T.}$$

R.P.T.

Donde F.R. es la fracción de liberación, calculada mediante la división de la radioactividad presente por fracción (R.P.F.), sobre la radioactividad remanente en el tejido (R.P.T.). La fracción liberada se expresó en las gráficas como el cociente de la fracción “x” entre la fracción inmediata anterior al pulso despolarizante de K⁺ (cuarta fracción), esto con la finalidad de expresar la fracción de liberación por arriba del valor basal de la curva.



Figura 8. Procedimiento para la liberación de [³H]-GABA. Las rebanadas de tejido obtenidas a partir de la microdissección se estabilizan en solución Krebs Henseleit (KH) durante 30 minutos para después incubarse con [³H]-GABA el tejido. Las rebanadas se distribuyen de acuerdo a los tratamientos establecidos para después perfundir los fármacos a utilizar y coleccionar por goteo el neurotransmisor liberado hacia el medio KH. Los niveles de radiación se cuantifican por centelleometría y los datos se procesan de acuerdo a la fórmula antes descrita.

12.7 Método para la determinación de proteínas

La determinación de proteínas fue realizada a partir de los sinaptosomas de SNr, obtenidos de acuerdo a los métodos previamente descritos en este apartado. Una vez obtenidos, los sinaptosomas fueron sonicados y se les adicionó el buffer de muestra 4x. Posteriormente, se pusieron en ebullición durante 10 min, luego de ese plazo la muestra fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF, que fueron bloqueadas con leche al 7% a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente la membrana se incubó durante 16 h con anticuerpo primario específico para el receptor TrkB (*anti-rabbit α -Trk* 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se lavaron y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario (*hrp-goat antirabbit* 1:2000, Invitrogen) durante 2 h. Finalmente se reveló el resultado mediante el método de autorradiografía.

13. Resultados

13.1 Presencia de receptores TrkB están en terminales estriado-nigrales

Para confirmar la presencia de los receptores TrkB en las terminales que van del estriado a la SNr, realizamos un análisis de inmunodetección de proteínas, también conocido como *western blot*. De acuerdo al protocolo descrito anteriormente, durante la incubación se utilizó el anticuerpo primario específico para los receptores TrkB, *anti-rabbit α -TrkB* con el fin de detectar la presencia de estos receptores en el homogenado de estriado y en sinaptosomas de SNr. Tras el proceso de revelado, se comprobó la presencia de los receptores TrkB en ambos núcleos (Figura 9).

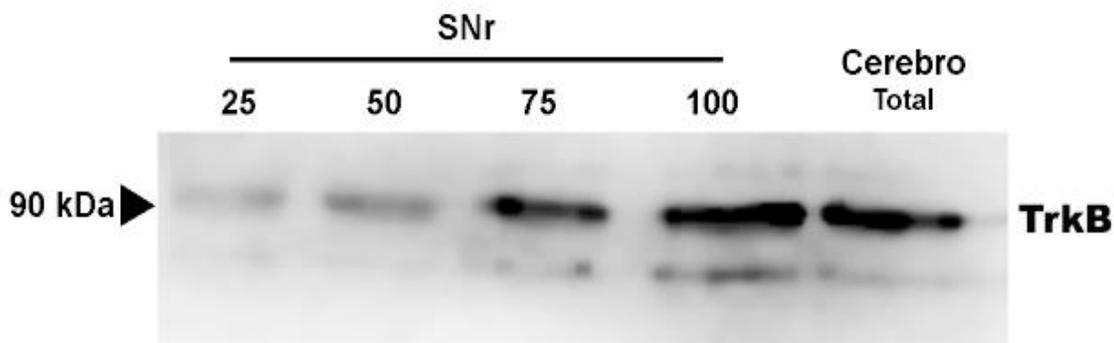


Figura 9. Detección total del receptor TrkB. Se comprobó la presencia del receptor TrkB, con un peso de 90 kDa, en la SNr. En la imagen se muestra un gradiente de concentración de proteínas a partir de los sinaptosomas obtenidos en la microdissección, en el último carril se colocaron 10 µg de homogenado de tejido cerebral a manera de control positivo.

Si bien la presencia de receptores TrkB había sido confirmada en 2009 por el grupo de Hasbi y colaboradores en neuronas del estriado, esta determinación se dio sobre las neuronas de proyección que parten del estriado hacia el globo pálido externo, por lo que en este trabajo nos dimos a la tarea de estudiar si el origen de estos receptores presentes en la SNr provenían de las proyecciones que van del estriado hacia la sustancia nigra *pars reticulata*. La estrategia experimental para corroborar que estos receptores se localizaban específicamente en las terminales estriado nigrales consistió en realizar una lesión unilateral en el núcleo estriado con ácido kaínico. Después se obtuvo el homogenado de estriado y los sinaptosomas de SNr para realizar una determinación de proteínas, con el anticuerpo específico para los receptores TrkB y así poder visualizar si había un cambio en la densidad de receptores. Como se puede apreciar en la figura 10, la degeneración neuronal provocada por este tratamiento disminuye de manera considerable la presencia de receptores TrkB tanto en el estriado como en la SNr. En base a estos resultados podemos sugerir la presencia de receptores TrkB en las terminales de las neuronas de proyección que van del estriado hacia la SNr.

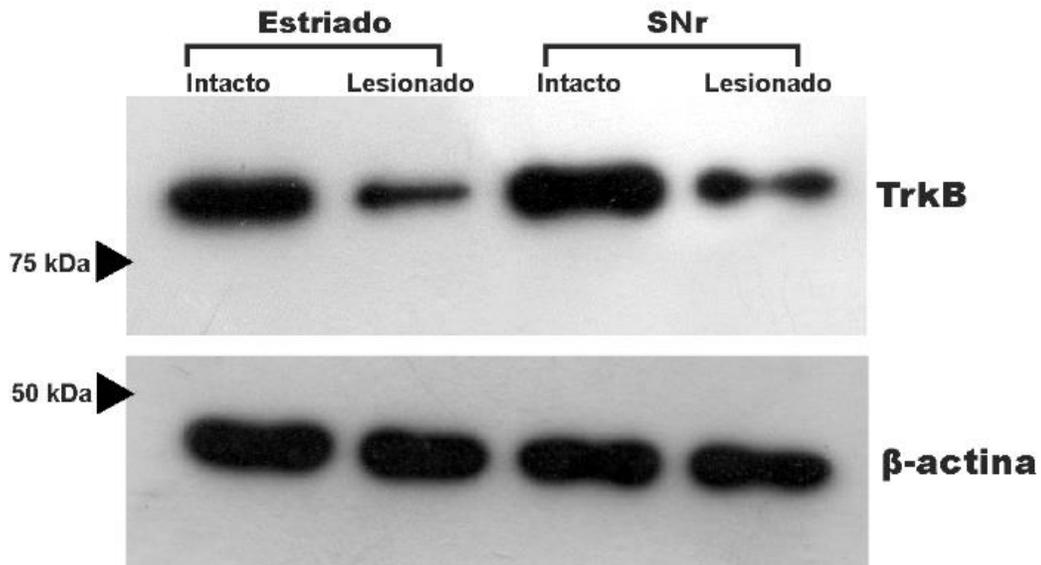


Figura 10. El receptor TrkB está presente en las terminales estriado-nigrales. La lesión estriatal se realizó con una solución de ácido kaínico 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. En la parte inferior se muestra el control de β -actina (42 kDa).

13.2 La activación de los receptores TrkB potencia la liberación de [^3H]-GABA

Debido a que la activación de los receptores TrkB, en otros sistemas neuronales, han mostrado tener un efecto potenciador en el aumento de la señalización, decidimos estudiar si este mismo efecto podría estar participando en la liberación de GABA en las terminales estriado nigrales.

En todos y cada uno de los experimentos de liberación de [^3H]-GABA los receptores TrkB fueron activados con el uso del agonista 7,8-dihidroxi flavona (7,8- DHF) en lugar de BDNF, esto debido a que se trata de un compuesto mucho más práctico en el uso experimental , además de haber mostrado tener una gran afinidad hacia el receptor TrkB (con una EC_{50} = 35 nM y una K_d = 320 nM) sin mencionar que los efectos obtenidos son muy similares a los que se presentan al utilizar BDNF, y en algunos casos incluso más potentes (Jang *et al.*, 2010). Luego de decidírnos a utilizar 7,8-dihidroxi flavona para activar a los receptores TrkB, nos dimos a la tarea de determinar

la concentración adecuada de este agonista para obtener resultados dentro de un rango estándar. Para ello realizamos una serie de experimentos de liberación de GABA en la que incubamos el tejido de SNr, obtenido mediante microdissección, con 7,8-DHF a diferentes concentraciones.

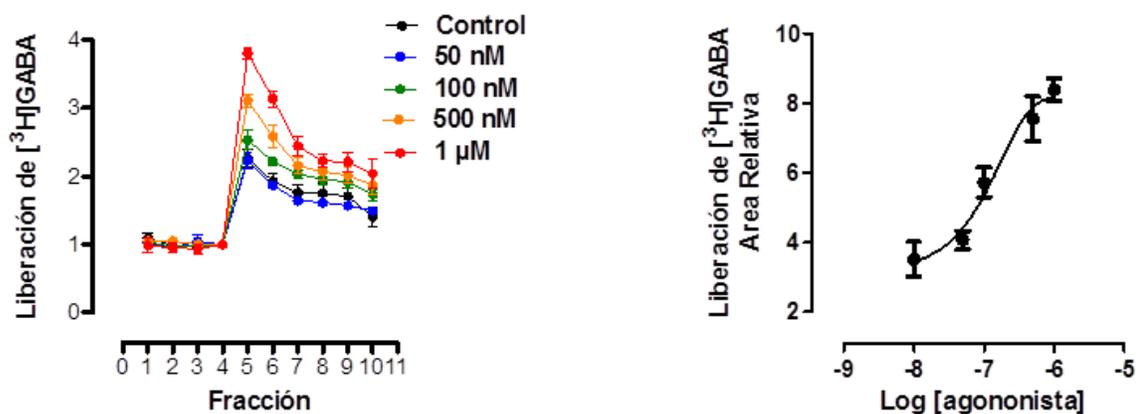


Figura 11. Efecto de la activación de receptores TrkB con 7,8-Dihydroxiflavona (7,8-DHF) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas de sustancia nigra reticulata de ratas reserpinizadas. En la gráficas a la izquierda se observan los niveles de liberación a diferentes concentraciones de 7,8-DHF, además del control. En la gráfica de la derecha se presenta el área bajo la curva en dónde se puede observar de manera más didáctica el efecto de la activación de los receptores TrkB. Los datos obtenidos sugieren una EC₅₀= 200nM.

Como se observa en la figura 11, el incremento en la liberación de [³H]-GABA tras la activación de los receptores TrkB es dependiente de la concentración de agonista 7,8-DHF que se está utilizando. Además, de acuerdo a la respuesta encontrada al usar las concentraciones de 500 nM y 1 μM, parece ser que el aumento en la concentración de agonista acerca a la terminal sináptica a un punto de saturación a partir del cual la liberación de GABA se mantiene en los mismos niveles.

En base a los datos obtenidos con este gradiente de concentraciones, decidimos que en los experimentos a realizar se emplearía una concentración de 250 nM del agonista 7,8-DHF, esto con el fin de ubicarnos dentro de la media en la curva de concentraciones y así, además de disminuir las alteraciones que una concentración demasiado baja o alta podría tener sobre los resultados, nos mantenemos dentro del rango de afinidad que presenta el agonista ≈ 320 nM por el receptor TrkB.

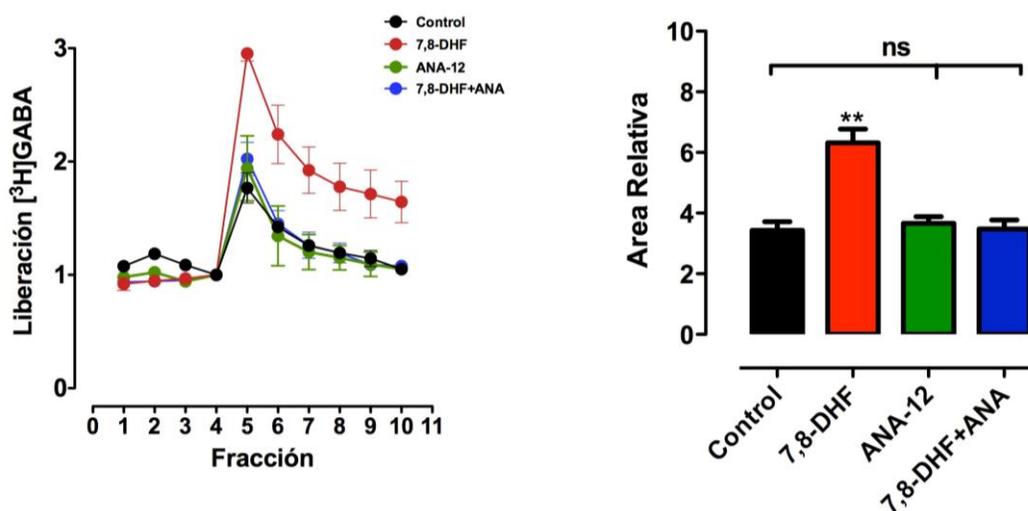


Figura 12. La inhibición de los receptores TrkB previene la potenciación de la liberación generada por los receptores TrkB. En esta serie de experimentos se dividieron los grupos en cuatro tratamientos de para estudiar el efecto de ANA-12 (100nM) sobre la liberación de $[^3\text{H}]\text{-GABA}$ en rebanadas de sustancia *nigra reticulata* de cerebro de rata. En la gráfica de la izquierda se observan los niveles de liberación a diferentes concentraciones de 7,8-DHF, además del control. En la gráfica de la izquierda se presenta el área bajo la curva en dónde se puede observar de manera más didáctica el efecto de los distintos tratamientos sobre la liberación de $[^3\text{H}]\text{-GABA}$. El análisis estadístico revela un valor de $**p < 0.01$ para el tratamiento 7,8-DHF con respecto al control.

Con el fin de estudiar si el aumento en la liberación de GABA era generado de manera concreta por la activación de los receptores TrkB, se realizó una serie de experimentos en los que se utilizó ANA-12 (100 nM) un antagonista específico para estos receptores (figura 12). Los gráficos generados a partir de los datos para las fracciones liberadas durante los experimentos, muestran una clara prevención del aumento en la liberación

generado por la 7,8-Dihydroxiflavona puesto que , a pesar de incubar el tejido con este agonista específico, al bloquear la activación de estos receptores mediante la acción de ANA-12 se pierde completamente el aumento en la liberación de [³H]-GABA. Es así que mediante esta serie de experimentos podemos proponer que el aumento generado en la liberación de neurotransmisor de las terminales estriado nigrales se debe a la activación de los receptores TrkB y no a algún otro tipo de receptor Trk que pudiera estar presente en la terminal.

13.3 La potenciación generada tras la activación de los receptores TrkB no depende de la actividad dopaminérgica en las terminales estriado nigrales

Tal y como se mencionó en la primera parte de este escrito, en distintos estudios se ha comprobado que BDNF y los receptores TrkB mantienen una estrecha relación con los receptores para dopamina; sin embargo, esta relación sólo se ha señalado en estudios dónde la activación de ambos receptores se genera de manera crónica. Por tal motivo, nos dimos a la tarea de investigar si la relación DA-BDNF, que se da a largo plazo, permanece presente en estas terminales al activar de manera aguda los receptores TrkB. Para ello se aplicó un tratamiento con reserpina a los grupos experimentales aproximadamente 16 horas previas al experimento, esto con el fin de eliminar la dopamina endógena del sistema de los roedores. Después de asegurarnos de haber disminuido los niveles de dopamina endógena por arriba del 90% del total presente en el sistema, nos dimos a la tarea de realizar una serie de experimentos para estudiar el papel que la dopamina endógena podría estar teniendo en el efecto que la activación de los receptores TrkB genera sobre la liberación de neurotransmisor.

Debido a que se sabe de la presencia de los receptores D1 en las terminales estriado nigrales (Obeso *et al.* 2002 ; Gerfen y Surmeier, 2011), decidimos utilizar SCH 23390 (100 nM), un antagonista de los receptores de tipo D1, en conjunto con 7,8-DHF para saber si el efecto de los receptores TrkB estaba relacionado de alguna manera con los receptores dopaminérgicos presentes en la terminal estriado nigral.

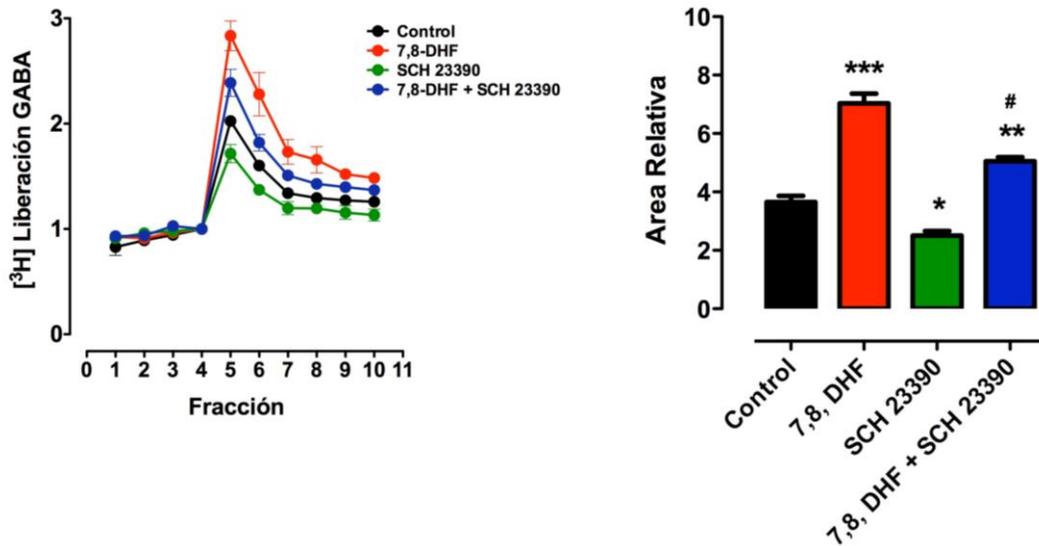


Figura 13. Efecto de la activación de receptores TrkB con 7,8-Dihydroxiflavona (7,8-DHF) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas de sustancia nigra reticulata de ratas reserpinizadas. En las gráficas a la izquierda se observan los niveles de liberación a diferentes concentraciones de 7,8-DHF, además del control. En la gráfica de la izquierda se presenta el área bajo la curva en dónde se puede observar más claramente el efecto de la activación de los receptores TrkB. El análisis estadístico revela un valor de *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ para los distintos tratamientos con respecto al control y una # $p < 0.05$ del tratamiento con 7,8-DHF+SCH 23390 con respecto a los datos de 7,8-DHF.

Sabemos que la dopamina juega un papel importante en la liberación de GABA a partir de las terminales estriado nigrales, por lo que al prevenir la actividad de los receptores D1 con SCH 23390, hay una ligera disminución en la tasa de liberación de GABA con respecto al control (figura 13); sin embargo, al emplear 7,8-DHF en presencia de SCH 23390 se mantiene el aumento en la liberación que la activación de los receptores TrkB muestra por si sola.

Para descartar la posible activación de los receptores D1 a partir de dopamina endógena, se realizó una serie experimental en la que se activaron los receptores TrkB a distintas concentraciones en rebanadas de SNr obtenidas del cerebro de ratas reserpinizadas, es decir, sin presencia de dopamina. Esto con el objetivo de determinar si la relación entre dopamina y TrkB, durante la activación a corto plazo, está presente o no en las terminales estriado nigrales.

De acuerdo a la figura 14, los resultados indican que el aumento en la liberación de [³H]-GABA generado por la activación de los receptores TrkB, con 7,8-Dihydroxiflavona, no depende de la acción que la señalización generada tras la activación de los receptores dopaminérgicos pudiera estar provocando sobre los receptores TrkB, aun cuando ambos están presentes en las terminales estriado nigrales. Es decir que al parecer tanto en condiciones con dopamina endógena presente o en ausencia de esta, los receptores TrkB siguen ejerciendo un aumento en la liberación de neurotransmisor bajo un tratamiento agudo.

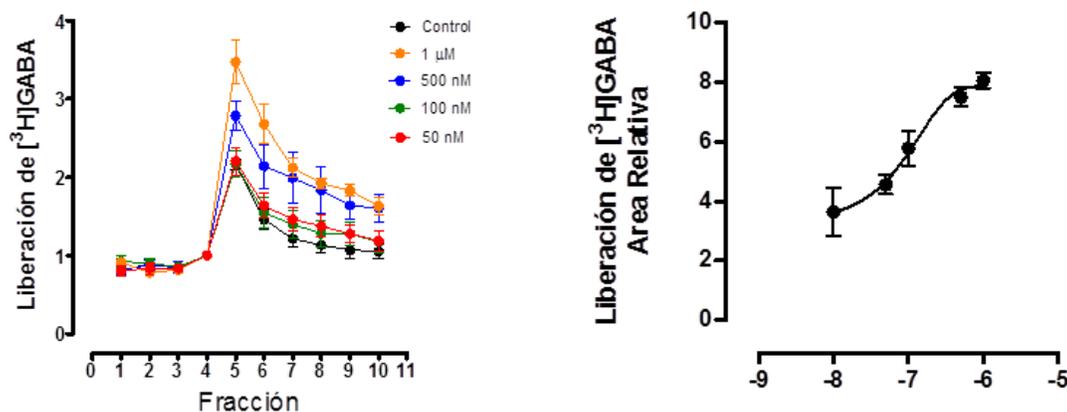


Figura 14. Efecto de la activación de receptores TrkB con 7,8-Dihydroxiflavona (7,8-DHF) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas de sustancia nigra reticulada de ratas reserpinizadas. En las gráficas a la izquierda se observan los niveles de liberación a diferentes concentraciones de 7,8-DHF, además del control. En la gráfica de la izquierda se presenta el área bajo la curva en donde se puede observar más claramente el efecto de la activación de los receptores TrkB. Los datos obtenidos sugieren una EC₅₀= 90nM.

13.4 La activación de los receptores TrkB sobre la liberación de [³H]-GABA implica la activación de la Fosfolipasa C.

Se sabe que la activación de los receptores TrkB desencadena 3 principales vías de señalización. Sin embargo, debido a que las vías MAPK y PI3-K están más relacionadas con los efectos de plasticidad y supervivencia celular, decidimos dirigir nuestro estudio hacia la vía de la fosfolipasa C, que es señalada como la implicada en los efectos agudos de la activación de estos receptores. Para ello en nuestra siguiente serie de experimentos, además de utilizar 7,8-DHF para activar a los receptores TrkB, en un medio libre de dopamina endógena, se aplicó U-73122 (10 μ M), el cual es un fármaco que se encarga de inhibir la unión del receptor con la PLC impidiendo que se desencadene la vía de señalización.

En la figura 15 se observa claramente que al inhibir la unión de los receptores TrkB con la PLC, utilizando U 73122 (10 μ M), se previene el aumento que se estaba generando con la aplicación de 7,8-DHF en la liberación de GABA generado por la activación de los receptores TrkB.

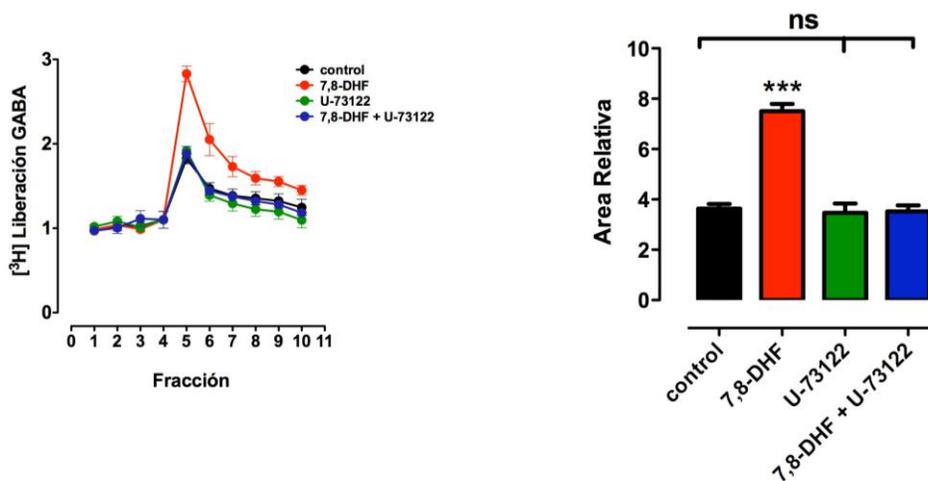


Figura 15. Efecto de la activación de receptores TrkB con 7,8-Dihydroxiflavona (7,8-DHF) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas de sustancia nigra reticulata de ratas reserpinizadas. En la primera gráfica se observa el curso temporal del experimento de liberación, la concentración de potasio se aumento de 3 mM a 15 mM a partir de la cuarta fracción colectada para estimular la despolarización de las terminales. En las barras a la izquierda se muestra el área relativa obtenida a partir de la cantidad de [³H]-GABA liberado con respecto a cada tratamiento. El análisis estadístico revela un valor de *** $p < 0.001$ para el tratamiento 7,8-DHF con respecto al control.

En base a lo encontrado con esta serie de experimentos, es probable que los efectos a corto plazo sobre la liberación de [³H]-GABA generados por la activación de los receptores TrkB dependan de parte de la vía de señalización desencadenada al acoplarse a la PLC.

13.5 La activación de los receptores TrkB depende del flujo de calcio en las terminales estriado nigrales

En el trabajo de Lang *et al.* (2007) se sugiere que la actividad de BDNF a través de los receptores TrkB tiene efectos diferenciados en base a la fuente de BDNF, endógeno o exógeno, y esto a su vez llevaba a la movilización de calcio ya sea de manera intracelular o extracelular. En base a esta información y debido a que la vía PLC-IP₃ lleva a la movilización de calcio de los almacenes intracelulares y por consiguiente a la apertura de canales de Ca²⁺, nos dimos a la tarea de estudiar si estos canales estaban involucrados en la potenciación de la liberación de GABA generada por los receptores TrkB y para esto utilizamos Nifedipino (10 μM) que funge como un bloqueador de los canales de calcio tipo L.

Los datos obtenidos sugieren que los canales de Ca²⁺ tipo L no alteran de manera significativa la potenciación en la liberación generada por la activación de los receptores TrkB por lo que podemos sugerir que estos canales no están implicados de manera directa en el aumento de la liberación de GABA generados tras la activación de los receptores TrkB de manera aguda en las terminales estriado nigrales.

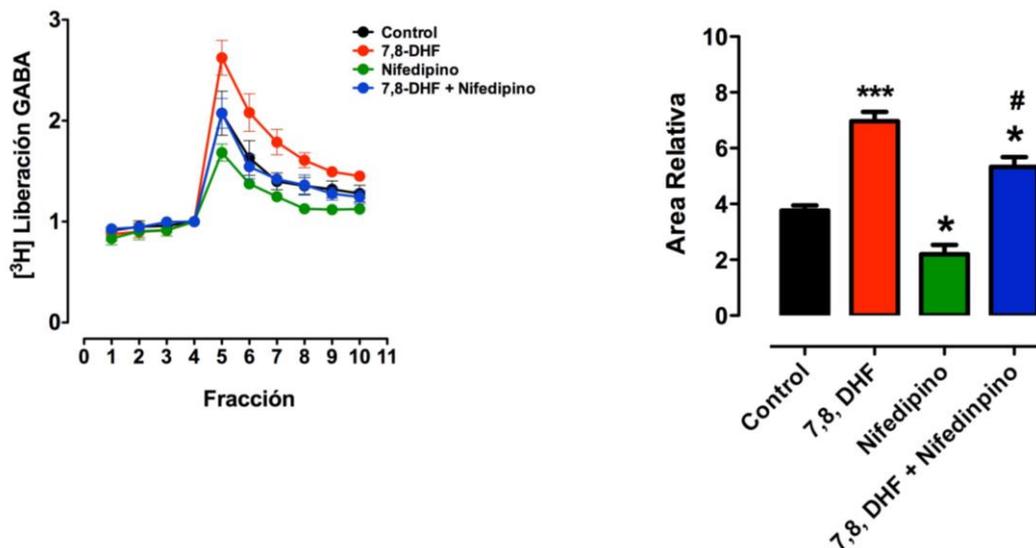


Figura 16. Efecto de la activación de receptores TrkB con 7,8-Dihidroxi flavona (250 nM) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas de sustancia nigra reticulada de ratas reserpinizadas. En la primera gráfica se observa el curso temporal del experimento a través del [³H]-GABA liberado por cada una de las fracciones colectadas. En la gráfica de la izquierda se presenta el área bajo la curva en donde se puede observar más claramente el efecto de la activación de los receptores TrkB así como el bloqueo de los canales de Ca²⁺ tipo L con Nifedipino (10 μM). El análisis estadístico revela un valor de ***p<0.001 y *p<0.05 para los distintos tratamientos con respecto al control y una #p<0.05 del tratamiento 7,8-DHF+SCH 23390 con respecto a los datos de 7,8-DHF.

En cuanto a lo que se ha reportado para la interacción de BDNF y los canales de Ca²⁺, se ha mencionado que en el caso de tratamientos a largo plazo con BDNF, el control que esta neurotrofina ejerce sobre la liberación de neurotransmisor depende en gran parte de la apertura de canales de Ca²⁺ tipo P/Q (Baldelli et al., 2002). Por tal motivo decidimos estudiar el papel de estos canales, también presentes en estas terminales, en la potenciación de la liberación de GABA tras la activación de los receptores TrkB.

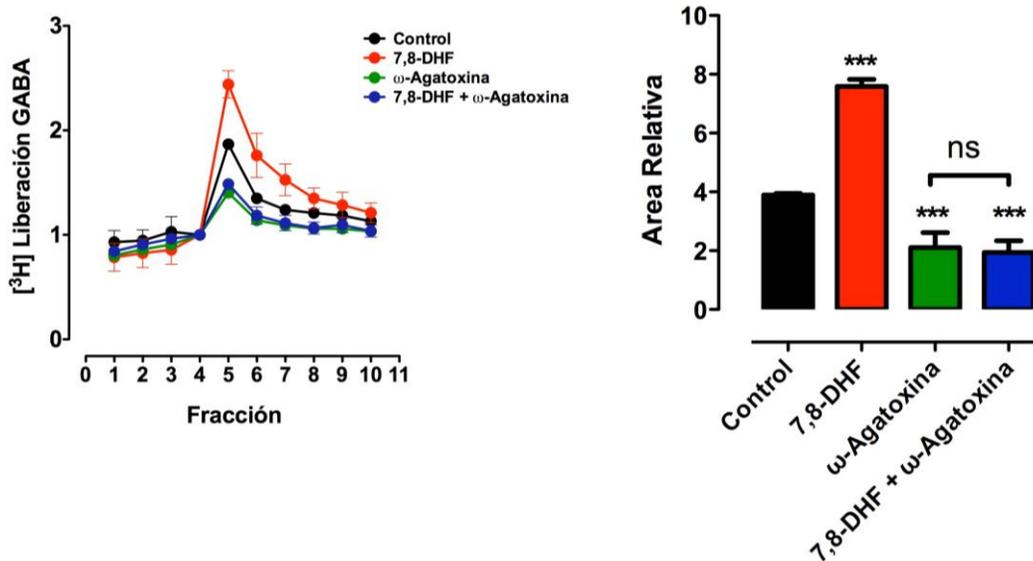


Figura 17. Efecto del bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo P/Q tras la activación de receptores TrkB con 7,8-Dihydroxiflavona (250 nM) sobre la liberación de $[^3\text{H}]$ -GABA en rebanadas de sustancia nigra reticulata de ratas reserpinizadas. En la primer gráfica se observa el curso temporal del experimento a través del $[^3\text{H}]$ -GABA liberado por cada una de las fracciones colectadas. En la gráfica de la izquierda se presenta el área bajo la curva en dónde se puede observar más claramente el efecto de la activación de los receptores TrkB tanto de manera aislada como en conjunto con el empleo de ω -Agatoxina-TK (1 μM). El análisis estadístico revela un valor de $***p < 0.001$ para los tratamientos con respecto al control

El diseño experimental para estudiar el participación de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q durante la activación de TrkB, consistió en incubar las rebanadas con $[^3\text{H}]$ -GABA y las rebanadas destinadas al tratamiento con BDNF se incubaron con marca radiactiva que contenía 1 μM de ω -Agatoxina 20 minutos antes del experimento, para bloquear el flujo de calcio a través de los canales de tipo P/Q. En la figura 17, podemos apreciar que al impedir la entrada de calcio a través del uso de ω -Agatoxina la potenciación en la liberación de $[^3\text{H}]$ -GABA que la 7,8-DHF estaba generando al activar los receptores TrkB ya no se produce.

En base a estas series de experimentos podemos sugerir que para generar una potenciación en la liberación de neurotransmisor en las terminales estriado nigrales, los receptores TrkB requieren de la actividad de la PLC así como la participación de los canales de Ca^{2+} de tipo P/Q.

14. Discusión

14.1 Presencia de receptores TrkB en las terminales estriado nigrales.

Sabemos que los receptores TrkB pueden ser activados tanto por BDNF como por NT-4 lo que lleva a promover la sobrevivencia, neurogénesis y sinaptogénesis en neuronas; sin embargo, la activación de estos receptores generada por BDNF controla muchas otras funciones entre las que se incluye la plasticidad sináptica dependiente de la actividad neuronal (Luberg *et al.*, 2010). En base a esto decidimos enfocar nuestro estudio hacia los efectos agudos que la activación de los receptores TrkB podría estar ocasionando sobre la liberación de neurotransmisor en las terminales estriado-nigrales, generado tras una rápida despolarización.

Para poder extrapolar los efectos observados por parte de los receptores TrkB en otros sistemas neuronales, lo primero que hicimos fue confirmar la presencia de estos receptores en las terminales estriado-nigrales. Si bien, la expresión de receptores TrkB había sido confirmada en el estriado en trabajos anteriores (Goggi *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2006; Iwakura *et al.*, 2008) mediante estudios de determinación de proteínas, era necesario demostrar la localización de estos receptores de manera específica en las terminales que llegan a la SNr a partir de las proyecciones del estriado, para así poder asegurar que el efecto sobre la liberación de neurotransmisor en las series de experimentos que nosotros destinamos a su estudio se estaban dando por la acción de los receptores TrkB al ser activados con 7,8-DHF.

Mediante los experimentos de western blot, logramos confirmar la presencia de estos receptores en las terminales estriado-nigrales (figuras 9 y 10). Cabe mencionar que en la figura 7, debajo de la banda de 90 kDa, correspondiente a los receptores TrkB, se obtuvo además una ligera banda de menor tamaño y densidad. Esto podría deberse a la presencia de una isoforma corta del receptor TrkB. De acuerdo a Gupta *et al.* (2013) se sabe que existen isoformas del receptor TrkB, que son más cortas que el receptor TrkB en su forma “completa”, dichas isoformas, T1 y T-Shc, que son entre 156 y 345

residuos más cortas; sin embargo, ambas isoformas se caracterizan principalmente por presentar actividad inhibitoria sobre la forforilación de receptores inducida por la dimerización cuando los receptores se unen al ligando. Con esto en mente y tomando en cuenta que si al usar un agonista de los receptores TrkB, como lo es la 7,8-DHF, se genera un aumento en la liberación de GABA podríamos asumir que estamos activando a los receptores TrkB completos, cuya señalización va destinada hacia la estimulación de la actividad sináptica, descartando la participación de las otras isoformas de este receptor.

En el trabajo de Greenberg *et al.*, (2009) se señala que la distribución de los compartimientos para el RNA mensajero destinado a BDNF se da de manera diferenciada a lo largo de una neurona, en el caso de neuronas corticales, la secuencia que da origen a la forma larga se da principalmente en las dendritas mientras que la secuencia corta se remite al soma. Es probable que al haber una distribución diferenciada de BDNF lo mismo ocurra con las distintas isoformas de los receptores TrkB, lo que explicaría los efectos que su activación produce tanto sobre la sobrevivencia y plasticidad como la señalización neuronal.

En cuanto a la determinación de la presencia de los receptores TrkB en las terminales estriado-nigrales que se realizó en este trabajo a través de una lesión con ácido kaínico, es necesario mencionar que se abre un nuevo horizonte para el estudio del papel de BDNF y la activación de estos receptores sobre la regulación del control motor puesto que, si bien, la importancia de esta interacción BDNF-TrkB había sido demostrada en distintas regiones y núcleos cerebrales, mediante estudios que le atribuían efectos importantes sobre la plasticidad (Hasbi *et al.* 2009; Fumagalli *et al.* 2006), conducta (Pillai y Mahadik, 2008) y regulación de la inhibición motora (Bessuso *et al.* 2012), es un hecho que al estar presentes en las terminales estriado- nigrales el papel de los receptores TrkB sobre el control de la regulación excitatoria en el circuito de los ganglios basales y ,por lo tanto, en el control motor nos indica que su función va más allá de lo que se tenía contemplado y nos obliga a seguir trabajando para llegar a un mejor entendimiento sobre la importancia de estos receptores dentro de este circuito.

14.1.1. La activación de receptores TrkB genera la potenciación de la liberación de [³H]-GABA en las terminales estriado nigrales.

Como se mencionó anteriormente, la actividad de BDNF sobre los receptores TrkB en distintas regiones cerebrales se ha relacionado con los niveles de liberación de GABA y, por lo tanto, con los sistemas neuronales que requieren de las funciones inhibitorias de este receptor. Además, se sabe que BDNF es capaz de modular la transmisión de señales en distintas fases, por ejemplo, aumenta la frecuencia más no la amplitud de corrientes miniatura postsinápticas en neuronas del hipocampo (Matsumoto *et al.*, 2006).

En las series de experimentos realizados durante este trabajo con el fin de examinar la relación entre los receptores TrkB y la liberación de GABA se demostró que, en efecto, estos receptores se encuentran regulando la función inhibitoria en las terminales estriado-nigrales mediante el aumento en la liberación de este neurotransmisor (figuras 11). Además, gracias al uso de un antagonista selectivo podemos agregar que este efecto es dado de manera específica por los receptores TrkB y no por algún otro receptor de tipo Trk o isoforma de TrkB que pudiera estar presente en dichas terminales.

El papel que tienen los receptores TrkB sobre la liberación de neurotransmisor ha sido sugerido con anterioridad de importancia tanto para la liberación de GABA como de DA (Goggi *et al.*, 2002). De manera interesante, se ha propuesto que dentro de los mecanismos utilizados por BDNF y los receptores TrkB para modular el rendimiento sináptico se incluyen el aumento a la alza de proteínas de reclutamiento y anclaje de las vesículas sinápticas, así como un incremento en el flujo de calcio en la terminal.

En cuanto a estos mecanismos, estudios en roedores han sugerido que el BDNF juega un rol importante en la regulación de la expresión de marcadores funcionales de GABA tales como el GAD67 en neuronas corticales durante el desarrollo. De hecho, se ha reportado que la disminución de los niveles de RNAm para BDNF así como del

receptor TrkB están asociados con la disminución del RNAm de GAD67 en la corteza prefrontal (Pillai y Mahadik, 2008). Aunque durante nuestro estudio no determinamos el posible papel de GAD67 en la potenciación de la liberación de GABA, es probable que su acción se presente de manera crónica, es decir, que requiera de un periodo de activación más extenso para poder generar el aumento en la síntesis de GABA que se ha mostrado en distintos estudios. Sin embargo, sería interesante analizar el papel de la GAD65 otra enzima encargada de la síntesis de GABA, pero que se encuentra relacionada con la liberación de este neurotransmisor debido a que se localiza principalmente en las terminales sinápticas. De acuerdo a lo anterior, debido a que se conoce que GAD65 se ancla la membrana de las vesículas sinápticas otorgándole un papel importante en el empaquetamiento de GABA al interior de las vesículas, por lo que el déficit de esta enzima genera alteraciones del monto de neurotransmisor liberado y es posible que el BDNF esté jugando un papel importante en el mantenimiento de este flujo de GABA generado a partir de GAD65 (Tian *et al.*, 1999).

14.1.2. La relación entre la actividad de BDNF y dopamina no participa en eventos a corto plazo de las terminales estriado nigrales

De acuerdo a Matsumoto y colaboradores (2006) los efectos agudos de BDNF se diferencian de los crónicos debido a que en los primeros no se requiere la síntesis de proteínas para llevar a cabo una función, puesto que se dan en cuestión de minutos, mientras que los efectos de la exposición a BDNF durante 12-72 h aumenta de manera significativa los niveles de expresión de proteínas presinápticas.

Mientras que la activación aguda de los receptores TrkB participa en la regulación ya sea a la alta o a la baja de las respuestas sinápticas que son inmediatas y que, por lo tanto, no necesitarían el soporte que los receptores dopaminérgicos pudieran estar brindando durante la activación crónica, sabemos que los receptores dopaminérgicos, vitales dentro del circuito de los ganglios basales, reciben un flujo constante de

dopamina proveniente de la sustancia *nigra pars compacta*. Si se ha demostrado que la activación crónica de los receptores dopaminérgicos genera un aumento en la expresión y síntesis de BDNF, mediante un proceso de interacción cruzada que se da a través de la activación de la CaMKII (Hasbi *et al.*, 2009), entonces podríamos sugerir que esto sería un mecanismo a largo plazo basado en la interacción dopamina-BDNF para generar la actividad suficiente de esta neurotrofina que permita mantener a la célula en condiciones de vida adecuadas; sin embargo, esto aún no ha sido estudiado en las terminales estriado nigrales.

Por otro lado, los efectos generados tras la activación aguda de los receptores TrkB sobre la sustancia *nigra reticulata* y su aporte en sistemas de vital importancia para el organismo, como el circuito de los ganglios basales, aún sigue muy lejos de ser dilucidados; sin embargo, en base a los resultados generados en este trabajo, podemos sugerir que la activación de receptores TrkB en la SNr tiene sin duda un papel relevante en cuanto a la regulación de la actividad generada en las terminales sinápticas tras la despolarización que incluso al no ser dependiente de la actividad dopaminérgica podría representar también un importante mecanismo de regulación de la actividad motora. De hecho, en el trabajo de (Besusso *et al.*, 2012), se muestra que al no contar con la presencia de receptores TrkB en las terminales estriado-palidales se genera un déficit en el control de la acción motora lo que conlleva a desarrollar un fenómeno de hiperlocomoción en ratas que se encuentran en desarrollo.

En este trabajo, observamos que el efecto agudo de la activación de receptores TrkB en las terminales estriado nigrales presenta un efecto potenciador sobre la liberación de GABA; sin embargo, al parecer la activación aguda de los receptores TrkB no es dependiente de la activación de receptores dopaminérgicos sino que podría estar más ligada a otros mecanismos de regulación de la actividad sináptica, tales como la apertura de canales de calcio (Goggi *et al.* 2002; Lang *et al.*, 2007).

Aunque en los experimentos realizados durante este proyecto el papel de los receptores para dopamina y los TrkB parecieron no mostrar una acción en conjunto para generar una potencialización en la liberación de GABA; es muy probable que la relación entre dopamina y BDNF, a través de la activación de sus respectivos receptores, esté presente durante la actividad a largo plazo de estas neuronas, es decir, que al activarse los receptores TrkB durante un periodo extenso, estos podrían necesitar de la acción de los receptores dopaminérgicos para mantener un efecto de larga duración en la célula y así dar pie a la regulación de fenómenos fisiológicos a largo plazo, tales como la sobrevivencia y la diferenciación celular, o bien, puede ser que los receptores dopaminérgicos sustenten la actividad de los receptores TrkB a través de la activación de la síntesis de BDNF en el núcleo celular (Hasbi *et al.* 2009; Iwakura *et al.* 2008); sin embargo, esto un proceso que aún debe ser estudiado en las terminales estriado-nigrales.

Si bien aún falta mucho por estudiar acerca de la interacción entre la actividad de dopamina y BDNF que da pie a la regulación de funciones neuronales relacionadas con la sobrevivencia y diferenciación celular, sigue siendo probable que esta relación se encuentra presente; al punto de que la ausencia de DA, de BDNF o de sus respectivos receptores genera una marcada muerte de neuronas dopaminérgicas, desencadenando la disfunción del circuito de los ganglios basales (Fumagalli *et al.*, 2006), lo que obliga a estudiar si la relación entre dopamina y BDNF se encuentra presente a largo plazo en las terminales estriado-nigrales o bien en otros componentes de este circuito.

14.2 La activación de la PLC y la movilización de calcio son procesos indispensables para el funcionamiento de los receptores TrkB en las terminales estriado-nigrales

Mientras las técnicas de análisis bioquímicos avanzan para permitirnos estudiar esta área a mayor profundidad, cada vez es más claro que aquellas vías de señalización que en un momento se consideraron lineales no son sino una red de interacciones mucho

más compleja y dinámica de lo que podemos imaginar. De ahí que el simple hecho de conocer los componentes de una vía de señalización no es suficiente para predecir los resultados que su activación tendrá sobre el sistema completo (Lemon y Schelessinger, 2010).

Un aspecto a tratar y que es crítico para las distintas funciones que ejercen las neurotrofinas son las vías de señalización que contribuyen a que cada uno de estos fenómenos ocurra. Por ejemplo, es posible que mientras una vía de señalización promueva la sobrevivencia celular otra este envuelta en cambios a corto plazo en función de la neurona blanco (Marsh y Palfrey, 1996). Debido a que el BDNF y la activación de los receptores TrkB se ha relacionado con distintos procesos a lo largo del desarrollo neuronal así como de su función sináptica, decidimos estudiar la posible vía de señalización que se encuentra implicada en el aumento de la liberación de GABA generado por estos receptores en las terminales estriado nigrales

14.2.1 La potenciación en la liberación de GABA se da por medio de la activación de la vía PLC a través de los receptores TrkB

Se ha mostrado que los efectos de BDNF son atenuados al activarse dentro de un medio libre de calcio, sugiriendo que esta neurotrofina incrementa ya sea el influjo de calcio a través de la membrana plasmática así como su liberación desde los almacenes intracelulares; así mismo, se ha indicado que uno de los mecanismos de diversificación de la señalización de receptores TK es la unión de moléculas a los residuos de autofosforilación presentes en estos receptores. La PLC- γ se encuentra dentro de estas moléculas y está ligada a los receptores de tipo Trk (Marsh y Palfrey, 1996).

Debido a que en algunos tipos celulares, como neuronas hipocampales, se ha encontrado que tanto las vías PLC como la Ras-MAP están involucradas en procesos de señalización neuronal (Goggi *et al.*, 2002). Con el fin de generar un mayor entendimiento del funcionamiento de los receptores TrkB y por lo tanto el papel de

BDNF en las terminales estriado-nigrales, era importante determinar cuál de estas dos vías era la responsable del incremento en la liberación de GABA que encontramos en los experimentos anteriores.

En nuestro estudio logramos demostrar que la actividad de la PLC es necesaria para que el efecto potenciador de los receptores TrkB sobre la liberación de GABA a partir de las terminales estriado-nigrales se lleve a cabo (figura 15). Sin embargo, sabemos que la activación de la PLC conduce a la producción de DAG e IP₃, que a su vez generan dos vías de señalización. En el caso del DAG se activa a la PKC, mientras que el IP₃ actúa como segundo mensajero para liberar calcio de los almacenes intracelulares (Marsh y Palfrey (1996); Pillai y Mahadik (2008)). Debido a lo anterior sería interesante estudiar de manera más detallada cuál de estas dos vías de señalización es la principal responsable del efecto sobre la liberación obtenido con la activación de los receptores TrkB en las terminales estriado-nigrales.

14.2.2 Influjos de Ca²⁺ a la terminal tras la apertura de canales dependientes de voltaje.

Dentro de los papeles que juega el BDNF en la modulación de la plasticidad sináptica mediante la activación de los receptores TrkB, se ha sugerido que esta neurotrofina, encargada de la estimulación de la liberación de neurotransmisores, potencia la liberación del calcio de los almacenes intracelulares, generando un mayor flujo de este ión y, por lo tanto, aumentando las probabilidades de la unión de vesículas a la membrana, así como el reclutamiento de las mismas (Goggi *et al.*, 2002). De hecho, de acuerdo con Amaral y colaboradores (2012) la movilización de calcio es un evento que se mantiene constante entre los distintos mecanismos por los cuáles el BDNF induce la potenciación en la liberación de neurotransmisor, ya sea por la fosforilación de la sinapsina-I o la movilización de calcio desde los almacenes intracelulares a partir de la activación de la PLC iniciada por la activación de los receptores TrkB.

En el trabajo realizado por Baldelli *et al.* (2002) se demostró, mediante el registro de potenciales postsinápticos inhibitorios evocados (eIPSC), que luego de un tratamiento crónico de 4 días con BDNF, sobre cultivos de neuronas hipocampales en desarrollo, que el número de eventos cuánticos aumentaba con respecto al control. A partir de esto, se prepuso que este efecto se da debido a una acción diferenciada de BDNF sobre el control de cuantos y la liberación de neurotransmisor que es estimulada por la despolarización. Además, usando bloqueadores para los canales de Ca^{2+} tipo L y tipo no-L (P/Q y N) demostraron que los canales de Ca^{2+} N y P/Q eran los responsables de este incremento en las eIPSC lo que podría indicar que BDNF provoca un cambio en la sensibilidad a Ca^{2+} en las sinapsis GABAérgicas. Es importante aclarar que a diferencia de los potenciales miniatura sinápticos inhibitorios (mIPSC), los potenciales evocados se dan mediante el influjo de calcio a través de los canales iónicos.

De acuerdo a la figura 17, en las terminales estriado nigrales, el incremento en la liberación de GABA se da a partir del influjo de calcio que se da mediante la apertura de canales de calcio de tipo P/Q. Esto es interesante debido a que las vías que se desencadenan a partir de la activación de la PLC, se encuentran más ligadas hacia la remoción de calcio a partir de los almacenes intracelulares; sin embargo, en el trabajo de Delmas *et al.* (2004) se sugiere que la actividad de la PLC podría ser un mecanismo que liga a los receptores con los canales iónicos que se localizan en las membranas celulares.

En relación a canales iónicos, de acuerdo a Recillas-Morales y colaboradores, en 2014, al bloquear de manera selectiva los canales de calcio tipo P/Q, la liberación de GABA disminuye de manera considerable. Es así que se ha sugerido que la activación de los canales de calcio en estas terminales es la encargada de regular en gran parte la liberación de GABA. De acuerdo a lo observado durante este proyecto (figura 17) podemos sugerir que parte de la regulación ejercida por estos canales de calcio sobre la liberación de GABA puede ser atribuida a la participación de BDNF y la activación rápida de receptores TrkB. Esto plantearía la posibilidad de que, durante la activación aguda, el papel que ejerce el calcio en la vía de señalización de los receptores TrkB

podría ser diferente al observado en la activación crónica, es decir, que mientras los efectos a largo plazo depende de la interacción cruzada de receptores a dopamina y BDNF para generar la movilización de calcio de los almacenes intracelulares, durante la activación aguda se requiere de un mecanismo que genere un efecto más rápido e incluso más marcado sobre la liberación de neurotransmisor y para ello recurra a canales de calcio; sin embargo, todavía es necesario descartar la participación del calcio intracelular en este proceso.

Como un posible mecanismo de unión entre la activación de los receptores TrkB y la apertura de canales de calcio de tipo P/Q, se sabe que la CaMKII puede unirse a este tipo de canales de calcio y esta unión puede darse en ausencia de calcio siempre y cuando la CaMKII se encuentre activa (Jiang *et al.*, 2008). Esto es importante debido a que en este trabajo encontramos que el aumento en la liberación de GABA se da a través de la activación de la vía PLC y se sabe que esta vía puede generar, a través de la acumulación de Ca^{2+} , la activación de la calmodulina quién se encarga de remover la autoinhibición de la CaMKII, permitiéndole ejercer su función integrando señales así como la fosforilación de distintos sustratos que incluyen canales iónicos. Por tal motivo sería interesante estudiar el papel que esta enzima esta juega en el aumento de la liberación de GABA de las terminales estriado nigrales a través de la actividad de los receptores TrkB.

De acuerdo con Schlessinger (2000) se sabe que, en el caso de los receptores de tipo TK, una vez que la PLC se une al dominio SH2 del receptor esta fosfolipasa hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), generando IP_3 y DAG dando inicio a dos vías de señalización. En el caso del IP_3 , este llega a receptores específicos intracelulares que facilitan la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares. El calcio que es liberado se une a la CaM quien se encarga de facilitar la actividad de la CAMKII. Por otro lado, el DAG junto con el Ca^{2+} se encarga de activar a miembros de la familia PKC (figura 18).

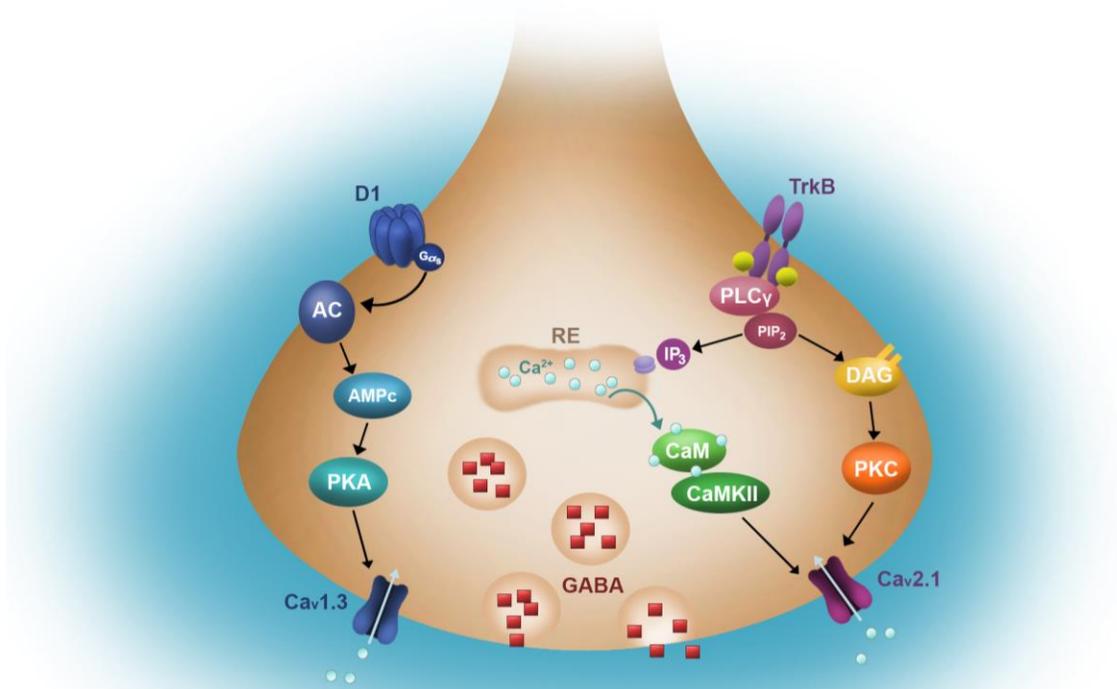


Figura 18. Posibles vías de señalización que regulan la liberación de GABA tras la activación de los receptores TrkB y los receptores D1 presentes en las terminales estriado nigrales.

Recientemente, se ha sugerido que tanto la CaMKII como la PKC podrían estar modulando la apertura y/o cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo P/Q ($\text{Ca}_v2.1$). En el caso de la CaMKII se sugiere que en neuronas del hipocampo, al interactuar con la subunidad $\alpha_{12.1}$ de los canales $\text{Ca}_v2.1$ logra retardar la inactivación de dichos canales generando un mayor efecto sobre la movilización de calcio al interior de la célula (Jiang *et al.*, 2008). Resulta interesante el hecho de que la CaMKII sólo ejerce esta función reguladora sobre los canales que se encuentran activos, por lo que podemos asumir que es necesaria la participación previa de receptores en la membrana, como podría ser el caso de los receptores TrkB o D1 en las terminales estriado nigrales.

De manera interesante, se sabe que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje poseen en la subunidad $\alpha 1$ un segmento que reconoce a la PKC y, de acuerdo a Zirrgiebel *et al.*, 1995 en neuronas granulares cuando se inhibe específicamente a la PKC los niveles de sobrevivencia controlados por BDNF disminuyen, sugiriendo que existe una estrecha relación entre la función de BDNF y la activación de la PKC.

Aunado a esto es importante seguir investigando la interacción entre los receptores D1 y los TrkB presentes en las terminales estriado nigrales, debido a que se sabe que la activación de ambos receptores, no necesariamente en conjunto, se encargan de promover la liberación de neurotransmisor de las terminales nerviosas. Si bien en este trabajo no encontramos una dependencia de los receptores TrkB hacia los receptores D1 para poder generar un aumento en los niveles de GABA liberado, aún queda la posibilidad de que el efecto sea sinérgico.

En base a los datos obtenidos a partir del trabajo realizado durante este proyecto podemos sugerir que tras activar a los receptores TrkB presentes en las terminales estriado nigrales, estos generan un aumento en la liberación de GABA a través de la activación de la PLC y la movilización de calcio en la terminal mediada principalmente por la apertura de canales de Ca^{2+} tipo P/Q; sin embargo, aún queda mucho por investigar con respecto a la señalización río abajo que la activación de los receptores TrkB conlleva.

14.3 BDNF y receptores TrkB como una alternativa terapéutica para el tratamiento en desordenes motores.

El mal funcionamiento en el sistema de los ganglios basales genera una gran variedad de desórdenes motores, a partir de los cuales puede presentarse dificultad para generar el movimiento o hipocinesia, como en el caso de la enfermedad de Parkinson, o bien un exceso de movimiento sin control, hipercinesia, como se da en la corea (Gerfen y

Surmeier, 2011). En el caso del BDNF se sabe que esta neurotrofina es necesaria para establecer un número apropiado de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, apoyando la hipótesis de que la degeneración de neuronas dopaminérgicas durante la enfermedad de Parkinson puede estar relacionada con la reducción en la síntesis de BDNF (Fumagalli *et al.*, 2006). Aunado a esto, en el trabajo de Luberg *et al.* (2010), se mencionó que los cambios en la señalización de TrkB pueden generar varios desordenes del sistema nervioso, incluyendo los del tipo neurodegenerativo, por lo que este tipo de receptores se han vuelto un blanco importante en el desarrollo de tratamientos a base de fármacos que regulen la actividad de receptores TrkB.

En base a esta información se sugiere un papel fundamental de los receptores TrkB para el buen funcionamiento de los ganglios basales. En 2013, Bessuso y colaboradores demostraron que en las proyecciones neuronales que van del núcleo estriado hacia el globo pálido externo eran de vital importancia para la inhibición del movimiento que esta conexión neuronal ejerce sobre el organismo a través del sistema de los ganglios basales. Por otro lado, en este trabajo comprobamos que los receptores TrkB también se encuentran presentes en las proyecciones del estriado que van hacia la SNr y que al igual que en la vía indirecta, la activación de estos receptores genera un aumento importante en la liberación de GABA, un neurotransmisor indispensable para que el estriado y la SNr mantengan la comunicación necesaria para estimular el movimiento. Por lo que podríamos sugerir que los niveles de activación de estos receptores en la vía estriado-nigral también son de vital importancia en la regulación de la conducta motora.

En algunos estudios clínicos se ha reportado que las neuronas dopaminérgicas estriado-palidales de pacientes con enfermedad de Parkinson presentan una disminución importante en los niveles de BDNF, confirmando que la reducción en los niveles de esta neurotrofina de alguna manera está envuelta en la etiología y patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Fumagalli *et al.*, 2006). Si bien esta relación podría dar pie a la posibilidad de administrar BDNF en el sistema para así poder preservar las neuronas dopaminérgicas y prevenir los síntomas de las enfermedades relacionadas con el control motor, es un hecho que aún falta mucho por conocer acerca de los mecanismos

intracelulares a largo y corto plazo que permiten a esta neurotrofina mantener las condiciones óptimas para la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas.

Así mismo, aunque los estudios sobre las neurotrofinas como una alternativa terapéutica se han concentrado en analizar los mecanismos farmacocinéticos y de cuestiones implicadas con la acción de los ligandos sobre cada receptor específico, es posible que también el estudio y comprensión de mecanismos de regulación para el destino de los receptores una vez que estos se separan de su ligando pudiera ser importante para las estrategias a emplear en un tratamiento clínico (Chen *et al*, 2005). Sin embargo, la mayoría de los estudios que se han realizado sobre este sistema a nivel molecular se enfocan hacia efectos crónicos de BDNF y los receptores TrkB sobre el funcionamiento de los ganglios basales, siendo que la información sobre los efectos agudos que esta neurotrofina tiene sobre los procesos de señalización son la piedra angular de todas las consecuencias que la activación de los receptores TrkB, a partir de BDNF, generan en la fisiología celular del sistema.

De acuerdo a Lang *et al.* (2007) se ha planteado la posibilidad de que el BDNF endógeno y exógeno generan distintos efectos sobre la actividad de las neuronas del hipocampo. En el caso del BDNF endógeno los efectos tienden a darse a largo plazo y estos generan un aumento en la señalización intracelular de calcio que a su vez incrementa la liberación de neurotransmisor, casi siempre acompañados de la actividad de receptores dopaminérgicos. Bajo el supuesto de que este mecanismo también sea generado en las neuronas estriado nigrales, podría ser que el mantenimiento de estas neuronas generado por la acción neurotrófica de BDNF y los receptores TrkB no sea competencia para el proceso de neurodegeneración que tiende a afectar a este tipo neuronal. Sin embargo, recordemos que de acuerdo a este mismo trabajo, la aplicación de BDNF exógeno presenta efectos sobre los niveles de calcio, ya sea a largo o a corto plazo a través de los canales específicos.

En base a los resultados obtenidos con nuestro trabajo, la potenciación en la liberación de GABA en las terminales estriado nigrales generada por la activación de receptores

TrkB con 7,8-DHF, depende de manera importante de los niveles de calcio. Por lo que podríamos sugerir que al aumentar la actividad aguda de los receptores TrkB con BDNF exógeno, o en este caso 7,8-DHF, se podría generar un soporte hacia la acción de esta neurotrofina sobre la sobrevivencia neuronal y así aumentar la resistencia de las células contra el proceso neurodegenerativo. De hecho, a pesar de la alta afinidad que BDNF presenta por los receptores TrkB ($K_d = 9.9 \times 10^{-10}$ M), esta neurotrofina tiene un efecto terapéutico muy leve, en cambio la 7,8-dihidroxiavona, además de tener una afinidad alta por este mismo receptor, se sabe que tiene mejores propiedades farmacocinéticas que BDNF, convirtiéndolo en una mejor alternativa terapéutica (Jang *et al.*, 2010).

Lo único que es seguro, en cuanto al papel que BDNF y la activación de los receptores TrkB, es que la información que se tiene sobre los efectos agudos, es decir, inmediatos de la activación de estos elementos aún están muy lejos de ser dilucidada, por lo que antes de proponer tratamientos como la inserción de BDNF recombinante, el trasplante de células que segreguen BDNF al sistema o la transfección de virus que puedan llevar la neurotrofina hasta el estriado o la sustancia negra, entre otras alternativas terapéuticas (Fumagalli *et al.*, 2006) es necesario estudiar a fondo los mecanismos que permiten a BDNF y TrkB actuar sobre sistemas tan importantes para la vida, como es el caso del circuito de los ganglios basales, pues esto nos ayudaría a mejorar los tratamientos médicos que ataquen las alteraciones causadas por la enfermedad desde la raíz y no sólo disminuir la sintomatología.

15. Conclusiones

- Los receptores TrkB están presentes en las terminales estriado-nigrales y al ser activados aumentan la cantidad de GABA liberado a partir de estas terminales.
- Los receptores D1 y la dopamina endógena no participan en el aumento de la liberación de GABA generado tras activar a los receptores TrkB.
- El aumento en la liberación de GABA generado por la activación de receptores TrkB involucra la activación de la PLC γ y la apertura de los canales de Ca²⁺ tipo P/Q.

15. Bibliografía

- Amaral, M. D. y Pozzo-Miller, L. (2012) Intracellular Ca^{2+} stores and Ca^{2+} influx are both required for BDNF to rapidly increase quantal vesicular transmitter release. *Neural Plasticity* 31: 70- 84.
- Balaratnasingam S y Janca A (2012) Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics* 134: 116- 124.
- Baldelli P, Novara M, Carabelli V, Hernández-Guijo J M, Carbone E (2002) BDNF up-regulates evoked GABAergic transmission in developing hippocampus by potentiating presynaptic N- and P/Q-type Ca^{2+} channels signalling. *European Journal of Neuroscience* 16: 2297-2310.
- Barbacid M. (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 148- 155.
- Besusso D., Geibel M., Kramer D., Schneider T., Pendolino V., Picconi B., Calabresi P., Bannerman D. M. y Minichello L. (2012) BDNF-TrkB signalink in striatopallidal neurons control inhibition of locomotor behavior. *Nature Communications*: 1- 12.
- Björklund, A. and Hökfelt, T. (2005) Handbook of Chemical Neuroanatomy. First Edition. Vol. 21. Elsevier B. V. 573.
- Cadena D. L. y Gill G. N. (1992) Receptor tyrosine kinases. *The FASEB Journal* 6: 2332- 2337.

- Chao, M. V. y Hempstead B. L. (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends in Neuroscience* 18: 321- 326.
- Chen Z-Y, Ieraci A., Tanowitz M. y Lee F. S. (2005) A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Molecular Biology of the Cell* 16: 5761- 5772.
- Delmas P., Crest M. y Brown D A. (2004) Functional organization of PLC signaling microdomains neurons. *Trends in neurosciences* 27(1): 41- 47.
- Fumagalli F., Racagni G. y Riva M. A.(2006) Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson's disease. *The Pharmacogenomics Journal* 6: 95- 104.
- Gainetdinov R. R., Premont R. T., Bohn L. M., Lefkowitz R. J. y Caron M. G. (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual Review of Neuroscience* 27: 107- 144.
- Gavi S., Shumay E., Wang H. Y Malbon C. C. (2006) G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signalling and regulation. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 17(2): 46- 52.
- García M., Florán B., Arias-Montaña J. A., Young J. M. y Aceves J. (1997) Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent [3H]GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 80(1): 241-249.
- Gerfen C. R. y Surmeier J. (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *The Annual Review of Neuroscience* 34: 441- 466.

- 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: 34- 42.
- Gorwood P. y Hammon M. (2006) *Psychopharmacogenetics*. Capítulo 12. Transduction Mechanism G proteins. Springer Science + Business Media, New York, USA.
- Greenberg M E., Xu B. y Hempstead B L. (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: Implications in CNS function. *The Journal of Neuroscience* 29(41): 12764- 12767.
- Gupta V. K., You Y., Gupta V. B., Klistoner A. y Graham S. L. (2013) TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 10122- 10142.
- Hasbi A., Fan T., Alijaniam M., Nguyen T., Perreault M. L., O'Dowd B. F. y George S. R. (2009) Calcium signaling cascade links dopamine D1- D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *PNAS* 106: 21377- 21382.
- He J., Gong H. y Luo Q. (2005) BDNF Acutely modulates synaptic transmission and calcium signalling in developing cortical neurons. *Cellular Physiology and Biochemistry* 16: 69- 76.
- Iwakura Y., Nawa H., Sora I. y Chao M. V. (2008) Dopamine D1 receptor-induced signaling through TrkB receptors in striatal neurons. *The Journal of Biological Chemistry* 283(23): 15799- 15806.
- Jang S-W., Liu X., Yepes M., Shepherd K. R., Miller G. W., Liu Y., Wilson W. D., Xiao G., Blanchi B., Sun Y. E. y Ye K. (2010) A selective TrkB agonist with

- potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *PNAS* 107(6): 2687-2692.
- Jiang X., Lautermilch N J., Watari H., Westernboek R E., Scheuer T. y Catterall W A. (2008) Modulation of $Ca_v2.1$ channels by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *PNAS* 105(1): 341- 346.
- Lang S. B., Stein V., Bonhoeffer T. y Lohmann C. (2007) Endogenous brain-derived neurotrophic factor triggers fast calcium transients at synapses in developing dendrites. *The Journal of Neuroscience* 27(5): 1097- 1105.
- Lemmon M. A. y Schelessinger J. (2010) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141: 1117- 1134.
- Li E. y Histrova K. (2010) Receptor tyrosine kinase transmembrane domains. Functions, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adhesion & Migration* 4(2): 249- 254.
- Luberg K., Wong J., Weickert C S. y Timmusk T. (2010) Human Trkb gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *Journal of Neurochemistry* 113: 952- 964.
- Marsh H N. y Palfrey H C. (1996) Neurotrophin-3 and Brain-Derived Neurotrophic Factor activate multiple signal transduction event but are not survival factors for hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neurochemistry* 67: 952-963.
- Mannhold R., Kubinyi H. y Folkers G. (2006) *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*. Capítulo 2. Multivalency in Ligand Design. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.
- Matsumoto T., Numakawa T., Yokomaku D., Adachi N., Yamagishi S., Numakawa Y., Kunugi H. y Taguchi T. (2006) Brain-derived neurotrophic factor-induced

- potentiation of glutamate and GABA release: Different dependency on signaling pathways and neuronal activity. *Molecular and Cellular Neuroscience* 31: 70-84.
- Missale C., Nash S., Robinson S. W., Jaber M. y Caron M. G (1998) Dopamine Receptors: From structure to function. *Physiological Reviews* 78(1): 189 – 225.
- Neve K. A., Seamans J. K. y Trantham-Davidson H. (2004) Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptors And Signal Transduction* 24(3): 165- 205.
- Obeso, J A., Rodríguez-Oroz, M C., Rodríguez, M., Lanciego, J L., Artieda, J., Gonzalo, N., and Olanow, C W. (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *TRENDS in Neuroscience* 23: 8- 19.
- Pillai A. y Mahadik S P. (2008) Increased truncated TrkB receptor expression and decreased BDNF/TrkB signaling in the frontal cortex of reeler mouse model of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 100: 325- 333.
- Premont, R T., and Gainetdinov, R R. (2007). Physiological Roles of G Protein–Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Annual Review of Physiology* 69: 511-534.
- Recillas-Morales S., Sánchez-Vega L, Ochoa-Sánchez, N, Caballero-Florán, I, Paz-Bermúdez, F, Silva, I, Aceves, J, Erlij, D. y Florán, B (2014) L-type Ca²⁺ channel activity determines modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra reticulata and the globus pallidus of the rat. *Neuroscience* 256: 292-301.
- Roux P. P. y Baker P. A. (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* 67: 203- 233.
- Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211- 225.

- Segal R. A. y Greenberg M. E. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annual Review of Neuroscience* 19: 463- 489.
- Simon M. I., Strathmann M. P. y Gautam N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802- 808.
- Skaper S. D. (2012) *Neurotrophic Factors, Methods and protocols*. Capítulo 1. The Neurotrophic Family of Neurotrophic Factors: An Overview. Springer Protocols. Human Protocols.
- Sofroniew M. V., Howe C. L. y Mobley W. C. (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annual Review of Neuroscience* 24: 1217-1281.
- Tian N., Petersen C., Kash S., Baekkeskov S., Copenhagen D. y Nicoll R. (1999) The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal γ -aminobutyric acid release. *PNAS* 96(22): 12911- 12916.
- Zhang F, Zhou X, Moon C, Wang H (2012) Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor expression in neurons. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 4(4): 188- 200.
- Zirrgiebel U., Ohga Y., Carter B., Berninger B., Inagaki N., Thoenen H. y Lindholm D. (1995) Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: Involvement of protein kinase C in neuronal survival. *Journal of Neurochemistry* 65(5): 2241- 2250.

Anexo 1

Soluciones

- **Krebs-Henseleit Normal:**

Stock K^+ (3 mM), $CaCl_2$ (2 nM), $NaHCO_3$ (25 mM), AAOA (10 μ M), agua destilada con burbujeo constante CO_2+O_2 .

- **Krebs-Henseleit alto potasio:**

Stock K^+ (15 mM), $CaCl_2$ (2 nM), $NaHCO_3$ (25 mM), AAOA (10 μ M), KCl (0.5 M).

- **Buffer de muestra:**

Tris-Base 0.3125 M, SDS 10%, Glicerol 50%, β -Mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0.5%, pH 6.8.