



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

**Estudio de la cinética de la corriente de GABA en
neuronas del núcleo estriado en el ratón C57BL/6
tratado con el ácido 3-nitropropiónico como modelo de
la enfermedad de Huntington.**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

Licenciada en Biomedicina

JEANETTE ANGÉLICA GARZÓN VÁZQUEZ

Directores de Tesis:

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echegaray



FEBRERO DEL 2016

ÍNDICE

1. LISTA DE ABREVIATURAS	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	5
2.1.1 ETIOLOGÍA.....	5
2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	7
2.3 NEUROPATOLOGÍA DE LOS GANGLIOS BASALES EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	10
2.3.1 GANGLIOS BASALES	14
2.4 NÚCLEO ESTRIADO.....	15
2.4.1 RECEPTORES DE GABA.....	18
2.4.2 RECEPTORES IONOTRÓPICOS	18
2.5 MODELO ANIMAL DE ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO (3-NP) COMO MODELO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	21
2.5.1 ALTERACIONES GENERADAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE 3-NP	23
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
6. METODOLOGÍA.....	30
6.1 PROTOCOLO DE DISOCIACIÓN.	30
6.2 TÉCNICA DE PATCH-CLAMP EN MODALIDAD DE CÉLULA COMPLETA.....	31
6.3 APLICACIÓN DE FÁRMACOS	32
6.4 PROTOCOLOS ELECTROFISIOLÓGICOS.	33
6.5 ESQUEMA DE TRABAJO	36
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
7. RESULTADOS	38
7.1 ESTADO ESTACIONARIO (EE) / PICO DE CORRIENTE	41
7.2 TIEMPO AL PICO	42
7.3 CONSTANTE DE TIEMPO DE DESENSIBILIZACIÓN (TAU).....	43
7.4 REGISTRO DE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR GABA (I_{GABA}).....	45
7.5 RECUPERACIÓN DE LA I_{GABA}	49
7.6 POTENCIAL DE EQUILIBRIO DE LA I_{GABA}	51
7.7 CINÉTICA DE LA CORRIENTE GENERADA POR GABA AL COAPLICAR ANTAGONISTAS ESPECÍFICOS A LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR.....	52

8.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
9.	CONCLUSIONES	69
10.	REFERENCIAS.....	70

1. LISTA DE ABREVIATURAS

3-NP	Ácido 3 nitropopiónico	mRNAs	micro Ácido Ribonucleico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	MSN	Neurona Espinosa Mediana
Ca²⁺	Ión Calcio	mV	milivoltio
Cl⁻	Ión Cloro	MΩ	megaohmio
D₁	Receptor a Dopamina tipo 1	NMDA	N-metil-D-aspartato
Drp1	Proteína relacionada con la dinamina-1	nNOS-IN	Óxido nítrico sintasa-positivo-neuronal
EBSS	Solución salina balanceada de Earle	NR1	Subunidad 1 del receptor NMDA
EGTA	Ácido etilglicol tetracético	NR2	Subunidad 2 del receptor NMDA
EH	Enfermedad de Huntington	NST	Núcleo subtalámico
EST	Núcleo Estriado	pA	Picoamperio
GABA	Ácido gamma amino butírico	pF	Picofaradio
GPe	Globo Pálido segmento externo	poliQ	Poliglutaminas
GPI	Globo Pálido segmento interno	PSD-95	Proteína postsináptica densidad 95
HAP1	Proteína huntingtina asociada a 1	SNC	Sistema nervioso central
HBSS	Solución salina balanceada de Hank	SNC	Sustancia Negra parte compacta
htt	Huntingtina	SNr	Sustancia Negra parte reticulata
K⁺	Ión Potasio	SDH	Succinato Deshidrogenasa
mHtt	Huntingtina poliglutaminada		

2. INTRODUCCIÓN

2.1 LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

2.1.1 ETIOLOGÍA

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante (Wexler y col., 1987), producido por una mutación localizada en el gen que codifica la proteína llamada huntingtina (htt) (HDRG, 1993). El médico George Huntington (1850-1916), realizó las primeras observaciones sobre la sintomatología y el carácter hereditario de la enfermedad, la cual puede presentarse hacia la cuarta década de la vida, y la expectativa de vida oscila entre 15-20 años desde la aparición de la enfermedad (Ambrose, 1994), no obstante existen formas juveniles de la enfermedad cuyo pronóstico es peor y la esperanza de vida menor.

La incidencia es de 5 a 7 casos por cada 100.000 habitantes en países occidentales. En general, la sintomatología de la enfermedad de Huntington consta de alteraciones motoras, cognitivas y trastornos psiquiátricos asociados (Walker, 2007). Los síntomas motores suelen presentarse en dos fases: Una primera fase hiperkinética caracterizada por la corea, y una segunda fase hipocinética caracterizada por la rigidez y la distonía (Berardelli y cols., 1999). La corea corresponde a movimientos involuntarios bruscos y no estereotipados que se presentan de forma continua durante horas, no pueden ser suprimidos voluntariamente y empeoran con el estrés. Los movimientos involuntarios suelen presentarse en las extremidades, pero también se presentan en el tronco y en el cuello, conjuntamente con trastornos oculomotores (Van Vugt y cols., 2001). La corea está presente durante un corto periodo de tiempo en la mayoría de los casos y luego es sustituida por rigidez muscular. Los trastornos cognitivos y psiquiátricos son tan dramáticos como las alteraciones motoras y generalmente consisten en una demencia subcortical que incluye cambios afectivos, del humor y de la personalidad, así como problemas para integrar nuevos conocimientos (Naarding y cols., 2001). Se presentan también trastornos del humor, los cuales van desde la ansiedad e

irritabilidad, hasta periodos de depresión muy acentuados (Lovestone y cols., 1996). Por otra parte, los pacientes pueden sufrir procesos maníacos y alucinaciones (Haddad y Cununings, 1997; Rosenblatt y Leroi, 2000).

La mutación responsable de la EH consiste en una expansión en el extremo 5' del gen IT15 que codifica la proteína huntingtina (htt), dicha mutación se halla en el exón-1 y se caracteriza por una elongación aberrante de tripletes de nucleótidos CAG que codifica para glutamina, induciendo así una cola de poliglutaminas (poliQ) (HDRG, 1993; Gusella y cols., 1993).

En individuos normales, los tripletes CAG no superan los 35, en cambio, cuando se repiten 40 veces o más, se produce la enfermedad. La severidad de la sintomatología se asocia directamente con el número de repeticiones que existan (Snell y cols., 1993).

La htt es una proteína de expresión ubicua, se expresa principalmente en los testículos y en el sistema nervioso central (SNC). Dentro del cerebro, se expresa mayoritariamente en la corteza cerebral, hipocampo y el núcleo estriado (DiFiglia y cols., 1995, 1997; Li y cols., 1993), localizándose tanto en neuronas como en neuroglía (Shin y cols., 2005).

La htt se encuentra principalmente en el citoplasma pero también se puede ubicar en el núcleo (Hoogeveen y cols., 1993; Kegel y cols., 2005). Se ha encontrado asociada con mitocondrias, membrana citoplasmática y endosomas (DiFiglia y cols., 1995; Trottier y cols., 1995), así como al citoesqueleto del soma, dendritas y axones (DiFiglia y cols., 1995; Sapp y cols., 1997; Sharp y cols., 1995). Su amplia distribución e interacciones sugieren que está involucrada en diversas funciones como en la transcripción génica (Cha y cols., 2000), en el desarrollo normal del cerebro (Auerbach y cols., 2001), funciones mitocondriales (Browne y cols., 1997), en el tráfico intracelular (Gauthier y cols., 2004), en la modulación de la

excitotoxicidad (Fan y Raymond, 2007) y en la regulación de la función trófica (Alberch y cols., 2004) entre otras. Por otra parte, se ha demostrado que la htt ejerce una función antiapoptótica en células estriatales sometidas al ácido 3-nitropropiónico (Rigamonti y cols., 2001) y su sobreexpresión protege las neuronas estriatales contra la lesión inducida por aminoácidos excitadores (Leavitt y cols., 2006).

2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Se han identificado numerosos mecanismos potencialmente implicados en la fisiopatología, como: la excitotoxicidad, la falta del soporte neurotrófico, la alteración del metabolismo energético y las alteraciones transcripcionales. Estos mecanismos, lejos de ser mutuamente excluyentes, se postula que pueden interactuar conjuntamente, permitiendo explicar parcialmente la selectiva degeneración de las neuronas estriatales GABAérgicas que se observa en la EH. De esta manera, los modelos murinos han constituido un excelente escenario para la investigación de los mecanismos fisiopatológicos asociados al desarrollo y la selectividad de la patología de la EH (Walker, 2007).

Las neuronas de proyección espinosas medianas (MSN) se degeneran selectivamente mientras que las interneuronas de óxido nítrico sintasa-positivo-neuronal (nNOS-IN) sobreviven. En neuronas de ratones R6 / 2, tanto para MSN y nNOS-IN, se observó un aumento de varios mRNAs en la población nNOS-IN, incluida la subunidad del receptor NMDA NR2D, la proteína postsináptica densidad 95 (PSD-95) y la proteína huntingtina asociada a 1 (HAP1), así como óxido nítrico-sintasa (nNOS). Los niveles altos de expresión de estas moléculas en nNOS-IN cuando se comparan con MSN sugieren que estas proteínas pueden estar implicadas en las vías de protección que contribuyen a la resistencia de la población de interneuronas en la neurodegeneración de la EH (Zucker y cols., 2004). También

se ha observado en ratones transgénicos, que las interneuronas grandes estriatales no espinosas (LAN) sobreviven. Se ha observado la pérdida de subunidades del canal de K^+ por lo que se despolarizan las neuronas y otros canales dependientes de voltaje se ven afectados. La fosforilación por AMP cíclico de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) se ha propuesto como un mecanismo que contribuye a la vulnerabilidad excitotóxica en las neuronas de proyección estriatales al perder la regulación del potencial después de la disminución de canales de K^+ . Subunidades NR1 mostraron un aumento significativo en las MSN pero se expresaron en niveles muy bajos en LAN. La fosforilación de la subunidad NR1 por AMP cíclico también aumento en las neuronas de proyección del cuerpo estriado, pero no en LAN. La fosforilación de los receptores NMDA aumenta el tiempo de canal abierto y eleva la capacidad de respuesta de glutamato neuronal, que puede conducir a la excitotoxicidad. Por lo que se sugiere que los cambios en estas proteínas y su modificación pueden predisponer a las neuronas de proyección del cuerpo estriado a una disfunción y a la degeneración en la EH y proporcionar un mecanismo para la resistencia de LAN en la enfermedad (Ariano y cols. 2005)

Se ha sugerido que la neurodegeneración selectiva de la EH sea producto de la pérdida de todas o algunas de las funciones de la htt, pero también se ha visto que en la htt poliglutaminada, la longitud de la expansión de glutamina se correlaciona con la gravedad de la sintomatología debido a que el número de tripletes CAG es inversamente proporcional a la edad de inicio de los síntomas (Walker, 2007), lo que hace pensar que dicha enfermedad se debe a una ganancia de función con un efecto tóxico que aumenta con el número de glutaminas que lleva la proteína. Dada esta amplia variedad de funciones en que la htt está implicada, el estudio de la neuropatología de la EH es altamente complejo. Esto supone que la identificación de los procesos alterados por la huntingtina poliglutaminada en las primeras etapas de la enfermedad es de interés primordial para la subsiguiente propuesta de estrategias terapéuticas. Un déficit bioenergético se presenta antes del inicio de los síntomas, lo que indica que una disfunción mitocondrial puede ser un iniciador

importante de la patogénesis. El deterioro de la bioenergética mitocondrial puede ser debido a la función de la huntingtina poliglutaminada en la regulación de factores de transcripción que son requeridos para la transcripción de genes mitocondriales. Por ejemplo, se ha demostrado que la mhtt reprime la expresión de PGC-1 α , un co-activador transcripcional de genes implicados en la biogénesis mitocondrial, el metabolismo, y la estructura de la membrana (Lane y cols., 2015).

La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son factores críticos en el desarrollo y la progresión de EH. Se ha observado que los agregados de mhtt parecen interactuar con Drp1 (Proteína relacionada con la dinamina-1), para aumentar la actividad enzimática GTPasa Drp1, que incrementa la fragmentación mitocondrial, lo que conduce a una distribución anormal mitocondrial, provocando un daño neuronal. Lo que sugieren que la dinámica mitocondrial anormal y transporte axonal defectuoso de mitocondrias también son mecanismos en la patogénesis de EH (Reddy y Shirendeb, 2012).

Los factores relacionados con el funcionamiento mitocondrial parecen la base de la vulnerabilidad selectiva de las células del cuerpo estriado (Saft y cols., 2005; Seong y cols., 2005); por ejemplo, las alteraciones en la fosforilación oxidativa (Pickrell y cols., 2011). Estudios post mortem en tejido cerebral de pacientes con EH, mostraron disminución de la actividad en los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Gu y cols., 1996). Además, los modelos animales de la EH muestran disfunción mitocondrial (Browne y cols., 1997); por ejemplo; la administración sistémica de toxinas o inhibidores mitocondriales genera patología y trastornos del movimiento del cuerpo estriado tales como corea y distonía, que se asemeja a la EH (Ludolph y cols., 1991; Browne, 2008). La ingestión accidental del inhibidor mitocondrial irreversible, ácido 3-nitropropiónico (3-NP) causa la degeneración estriatal y el fenotipo de la EH. Por otra parte, la administración sistémica de 3-NP causa pérdida de células del cuerpo estriado y alteraciones del movimiento en ratas (Beal y cols., 1993) y primates (Palfi y cols., 1996; Dautry y

cols., 2000). La mhtt genera disfunción mitocondrial en EH (Grunewald y Beal 1999) y se reduce la generación de ATP (Seong y cols., 2005) que también altera los niveles de Ca^{2+} (Reddy y cols., 2009) y el tráfico mitocondrial (Li y cols., 2010). Por lo tanto, independientemente de si los impactos de la mhtt en la mitocondrias sean directos o secundarios, las repercusiones de la disfunción mitocondrial afectan a las células y puede ser la base de las afectaciones en numerosos procesos celulares, resultando en la patogénesis de la EH. Por lo tanto, la identificación de los cambios en el complejo II de la cadena respiratoria en cerebros post mortem de la EH llevó al uso de inhibidores del complejo mitocondrial II para generar modelos de toxicidad que reproducen aspectos de la patología estriatal de la EH *in vivo*. Por lo tanto, los estudios sobre toxinas mitocondriales son relevantes e importantes para la comprensión de los defectos en el metabolismo celular y el déficit bioenergético de la EH.

Como se ha comentado anteriormente, la EH se caracteriza, a nivel histopatológico, por una neurodegeneración severa del núcleo estriado, debido a la muerte selectiva de las neuronas de proyección GABAérgicas principales llamadas MSNs (del inglés Medium Spiny Neurons) (DiFiglia y cols., 1997; Vonsattel y cols., 1995). Sin embargo, las diversas interneuronas existentes en el núcleo estriado resultan mucho menos afectadas (Graveland y cols., 1985; Beal y cols., 1990; Ferrante y cols., 1987).

2.3 NEUROPATOLOGÍA DE LOS GANGLIOS BASALES EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La neuropatología al ser selectiva, durante el transcurso de la enfermedad se dañan principalmente estructuras subcorticales como los ganglios basales, de los cuales los más afectados son los núcleos caudado y putamen que pertenecen al núcleo estriado (Fig.1), dando como resultado un aumento relativo del volumen de los ventrículos cerebrales (Vonsattel y cols., 1995).

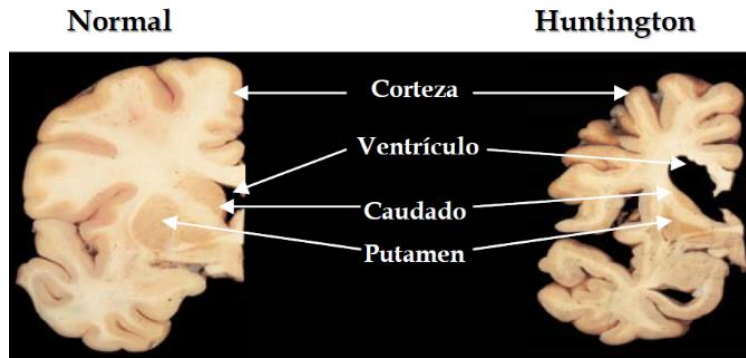


Figura 1. Neuropatología de la enfermedad de Huntington. Secciones coronales de los cerebros de una persona sana (izquierda) y de un paciente con enfermedad de Huntington (derecha). Se observa la atrofia del núcleo caudado y putamen. También se puede apreciar el aumento de volumen de los ventrículos cerebrales y la atrofia de la corteza cerebral.

En pacientes que padecen la EH, los hallazgos histopatológicos más representativos en el núcleo son tres: 1) Pérdida neuronal selectiva, 2) gliosis y 3) agregados intracelulares (DiFiglia y cols., 1997; Vonsattel y cols., 1995).

Nos centraremos en la patología de los ganglios basales debido a que son las regiones cerebrales más afectadas, por lo que es imperativo conocer sus funciones, y definir la circuitería de los ganglios basales para una mayor comprensión de las alteraciones descritas.

El origen del movimiento parte de la corteza, la cual tiene conexiones glutamatérgicas con el núcleo estriado; en la vía directa formada por neuronas espinosas medianas (MSN) de naturaleza GABAérgica y que al establecer sinapsis con el globo pálido interno y la sustancia nigra reticulada los inhiben, estas estructuras de proyección también GABAérgica inhiben a su vez a los núcleos talámicos, pero al estar inhibidas por las MSNs, los núcleos talámicos activan a la corteza motora suplementaria, la cual remite la orden del movimiento a la corteza motora primaria, finalmente de la corteza se envía la orden a las motoneuronas de la médula espinal para que se ejecute el movimiento (Figura 2,A).

La vía indirecta produce el efecto contrario, es decir, tiende a inhibir los movimientos. Las MSN de la vía indirecta del núcleo estriado establecen conexiones inhibitorias con el GPe cuyas neuronas también son inhibitorias (cuya acción es tónica) disminuyendo la inhibición hacia el núcleo subtalámico (Glutamatergico) el cual, a su vez excita al GPi y SNr (GABAérgicas) quienes inhiben al tálamo y no estimula a la corteza produciendo así la inhibición motora (revisado en Purves, 2007), (Figura 2, B).

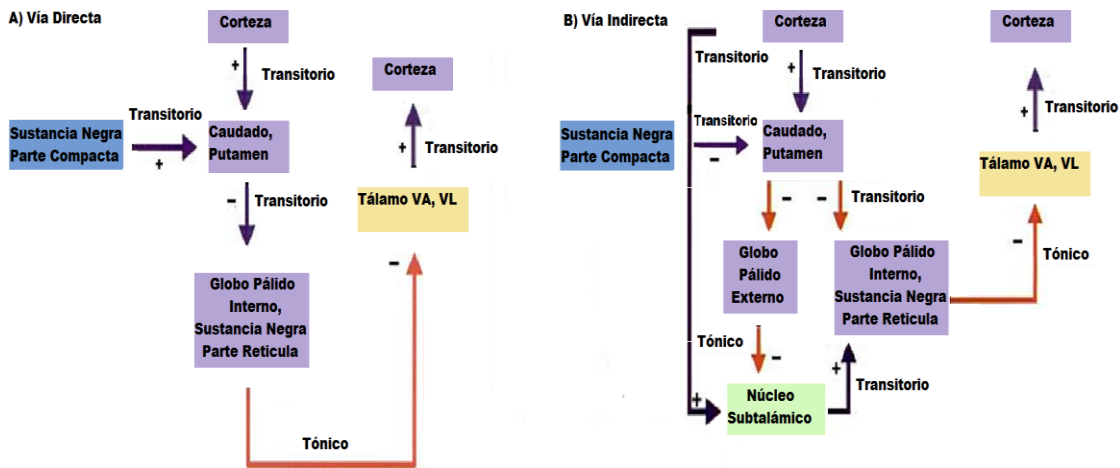


Figura 2. Conectividad funcional de los ganglios basales para el control motor. A) Vía directa. B) Vía indirecta. (Modificado de Cardinalli, 2007)

A nivel del control motor, las lesiones en los ganglios basales pueden producir síntomas tanto hiperkinéticos como hipocinéticos (Galvan y Wichmann, 2007). Esta aparente contradicción funcional sugiere que los ganglios basales constan de dos vías distintas; la directa (excitadora) y la indirecta (inhibidora), como se mencionó anteriormente (Alexander y Crutcher, 1990).

Los síntomas motores suelen presentarse en dos etapas: la etapa temprana de la EH es hiperkinética caracterizada por la corea, la cual corresponde a movimientos bruscos y descontrolados no estereotipados, principalmente en extremidades (Van Vugt y cols., 2001). La etapa tardía de la enfermedad es hipocinética, caracterizada por la pérdida de la capacidad para generar movimiento, rigidez y distonía

(Berardelli, 1999). Esto permitió postular que la vía principalmente afectada es la indirecta ya que existe pérdida de inhibición del movimiento, a la que más tarde se añadiría la degeneración de la vía directa que provoca la pérdida de excitación o producción del movimiento (Figura 3).

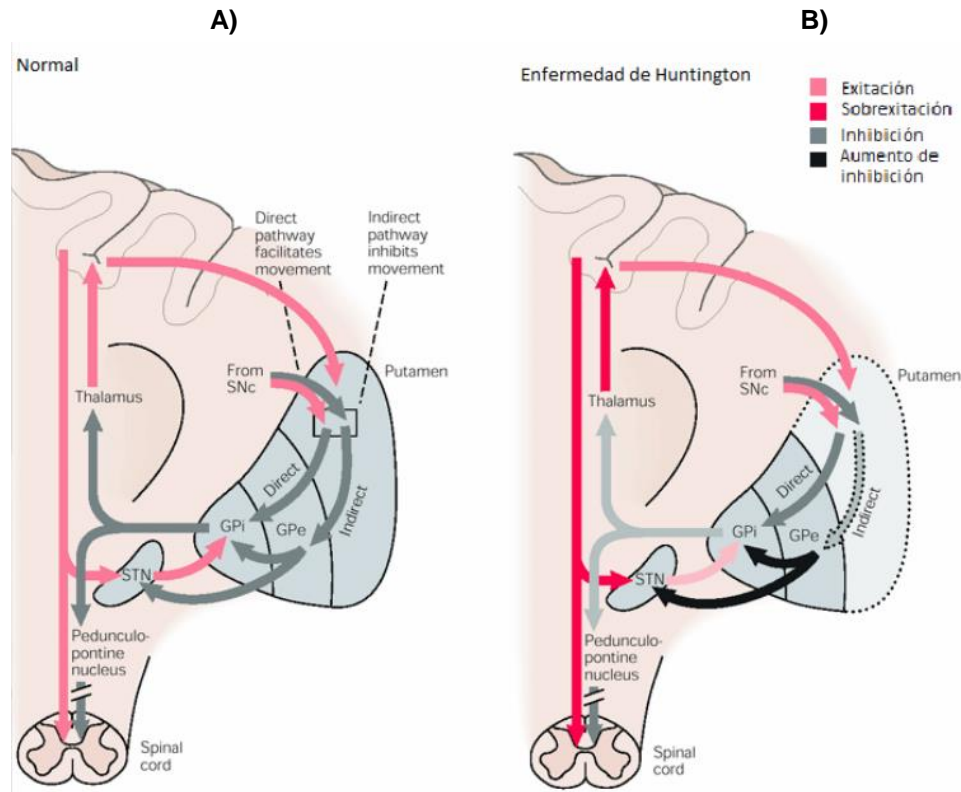


Figura 3. Circuitería de los ganglios basales. A) Circuito normal B). Circuito anormal de los ganglios basales, se presenta una degeneración principalmente en el caudado y putamen (blanco) (Modificada de Kandel y cols., 2000).

2.3.1 GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales son una red interconectada de núcleos subcorticales importantes para la selección de una acción, aprendizaje motor y cognición (Lerner y Kreitzer, 2011; Bar-Gad y Hagai, 2001). Tienen diversas funciones que van desde el control del movimiento, procesos de atención, percepción visual y aprendizaje (Browne y cols., 1997; Walker y cols., 2007). Los cuatro núcleos principales de los ganglios basales son: 1) el núcleo estriado, 2) el globo pálido con sus segmentos interno (GPi) y externo (GPe), 3) el núcleo subtalámico (NST) y 4) la sustancia negra dividida en parte reticulada (SNr) y compacta (SNc) (Figura 4) (Ramalingam, 2010). De éstos, el núcleo estriado es el de mayor tamaño y constituye la vía de entrada al circuito de los ganglios basales, mientras que el GPi y la SNr son los núcleos de salida (Miller, 2007). Estas estructuras y sus conexiones están asociadas, fundamentalmente, con los movimientos, facilitándolos o inhibiéndolos mediante dos vías (Albin y cols., 1989).

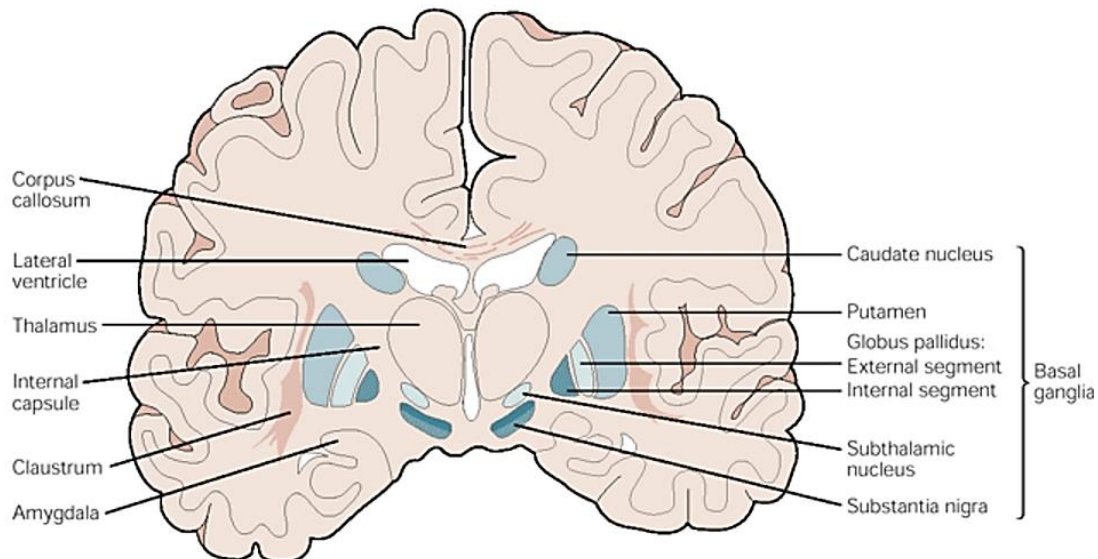


Figura4. Localización anatómica de los ganglios basales (Modificada de Kandel, 2000).

2.4 NÚCLEO ESTRIADO

El núcleo estriado por su heterogeneidad se puede clasificar de diferentes maneras para facilitar su estudio (Nakano y cols., 2000). Anatómicamente (en mamíferos inferiores) puede ser dividido en EST ventral; el cual participa primordialmente en funciones límbicas, y EST dorsal, cuya función está involucrada con funciones motoras. También es una estructura heterogénea en cuanto a los tipos neuronales que lo conforman (Tabla 1). El tipo celular más abundante, es la neurona de proyección espinosa mediana (MSN) representan aproximadamente del 90-98% del total de neuronas estriatales (Graveland y cols., 1985). Utilizan GABA como neurotransmisor e inervan gran cantidad de aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral (vía cortico-estriatal). Por lo que las neuronas de proyección de este núcleo son GABAérgicas y después de su activación, ejercen un efecto principalmente inhibitorio por medio de sus receptores (Nakano y cols., 2000).

Células en el núcleo estriado

Tipo de célula	Porcentaje de Población	Conexiones	Receptores metabotópicos	Referencias
Neurona MSN estriatonigral	49%	GPI, SNr	D1, M1, M4, mGluR 1, mGluR 5	Kreitzer y Malenka, 2007
Neurona MSN estriatopalidal	49%	GPe	D2, A2A, M1, mGluR 1, mGluR 5	Kreitzer y Malenka, 2007
Interneurona de rápido disparo	0.5%	MSN	D5	Kawaguchi, 1990
Interneurona de disparo subumbral	1.0%	MSN	D1	Kawaguchi, 1990
Interneurona colinérgica	1.0%	MSN, interneurona de rápido disparo	D2, D5, M2, M4	Kawaguchi, 1990 Wilson y cols., 1990

Los porcentajes mostrados son datos experimentales en rata. **MSN**: Neurona espinosa mediana, **GPI**: Globo pálido interno, **GPe**: Globo pálido externo, **SNr**: Sustancia negra parte reticulada, **D1**: receptor a dopamina tipo 1, **D2**: receptor a dopamina tipo 2, **D5**: receptor a Dopamina tipo 5, **M1**: receptor muscarínico tipo 1, **M2**: receptor muscarínico tipo 2, **M4**: receptor muscarínico tipo 4, **mGluR 1** receptor metabotópico de Glutamato tipo 1, **mGluR 5** receptor metabotópico de Glutamato tipo 5.

Tabla 1. Tipos neuronales y su densidad poblacional en el núcleo estriado. (Modificado de Kreitzer, 2008)

Dentro de las características de la neurona MSN (Figura. 5), se distinguen:

- El tamaño de su soma es de 10–20 μm .
- Del soma surgen troncos dendríticos de 2–3 μm de diámetro.
- El soma y las dendritas primarias están usualmente libres de espinas dendríticas.
- Poseen una gran cantidad de espinas dendríticas que cubren sus dendritas.
- El cuerpo celular presenta forma triangular.
- La capacitancia que presentan estas neuronas es entre 2 y 8 pF en célula disociada.

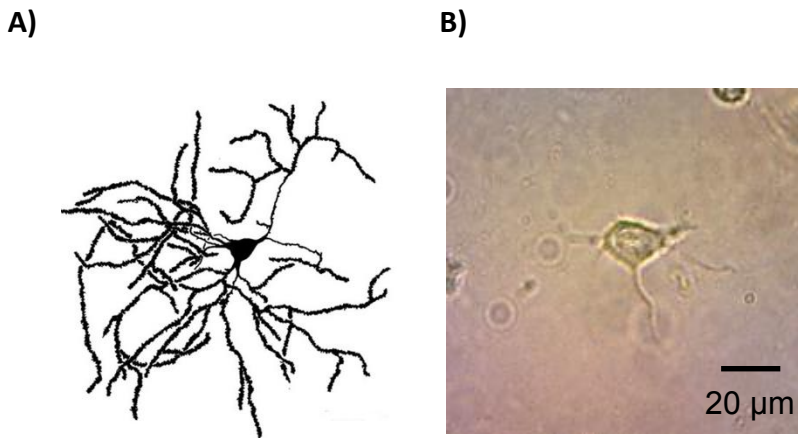


Figura 5. A) Morfología de una neurona espinosa mediana con tinción de Golgi de un ratón R6/2 (Klapstein y cols., 2001). **B)** Fotografía tomada de la parte experimental de una neurona espinosa mediana disociada del cuerpo estriado de ratón C57BL/6.

También contiene una pequeña población de interneuronas clasificadas en gigantes colinérgicas y células de tamaño mediano (Kawaguchi y cols., 1990). Algunas de las características que definen a las neuronas gigantes colinérgicas son:

- El cuerpo celular es alargado, de aproximadamente 50–60 μm de largo y entre 15–25 μm de diámetro.
- Representan menos del 2% de la población de neuronas en el estriado.
- No presentan espinas en las dendritas proximales.
- En sus terminales axónicas contienen acetilcolina.
- La capacitancia es mayor de 10pF en neuronas disociadas.

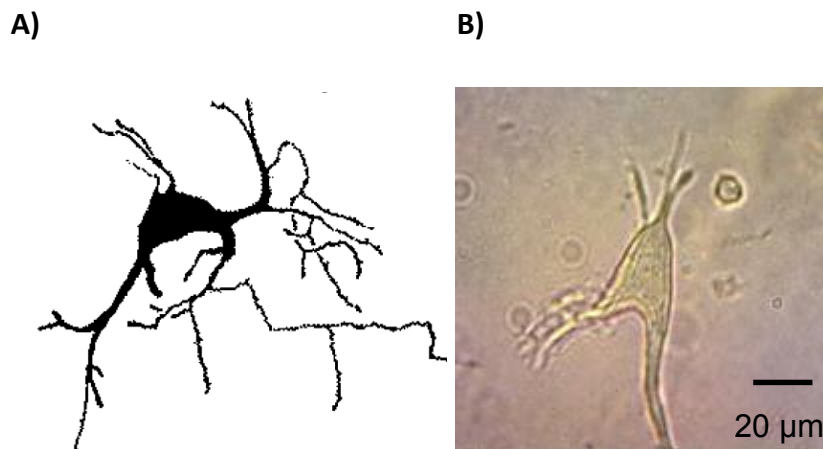


Figura 5. **A)** Morfología de una neurona gigante con tinción de Golgi de un ratón R6/2 (Klapstein y cols., 2001). **B)** Fotografía tomadas de la parte experimental de una neurona espinosa mediana disociada del cuerpo estriado de ratón C57BL/6.

Mientras que las interneuronas de tamaño mediano presentan las características siguientes:

- Se consideran lisas, ya que no presentan espinas en sus dendritas.
- Algunas pueden presentar varicosidades.
- Arborizaciones a nivel axonal.
- El cuerpo celular puede encontrarse ya sea de forma circular o bien un poco alargado, el tamaño de su soma varía aproximadamente entre 10–20 μm .

- La capacitancia se encuentra entre un rango de 4 y 8pF en neurona disociada.

Puesto que la neurona de nuestro interés es de proyección GABAérgica, a continuación se describen las características del receptor gabaérgico.

2.4.1 RECEPTORES DE GABA

El GABA ejerce su acción sobre 3 diferentes receptores para provocar la inhibición sináptica. Estos receptores pueden ser divididos en 2 familias: los receptores metabotrópicos GABA_B que actúan vía segundos mensajeros y los de tipo ionotrópico que corresponden a GABA_A.

Los receptores metabotrópicos GABA_B constan de 2 subunidades de siete segmentos transmembranales que activan sistemas de señalización a través de segundos mensajeros vía proteínas G (i/o), tales como la inhibición de la adenilato ciclasa, la inhibición de canales de Ca²⁺ al parecer actuando sobre las corrientes tipo P/Q y tipo N presinápticos (Bowery *et al.*, 2002) y activación de los canales de K⁺ postsinápticos dependientes de voltaje y rectificadores de entrada, por lo que se dice que producen una respuesta más lenta comparada con la de los receptores ionotrópicos (Enna, 2007). Nuestro trabajo se centra en los receptores de tipo ionotrópico por lo que es importante conocer su función y conformación.

2.4.2 RECEPTORES IONOTRÓPICOS

Los receptores ionotrópicos, GABA_A, son canales iónicos permeables a Cl⁻ por lo que se dice que regulan la transmisión fásica (Enz y cols., 1995). Pertenecen a la familia de canales iónicos activados por ligando (LGIC, del inglés Ligand-Gated Ion Channels). Existen 19 subunidades conocidas que componen el canal GABA: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , y ρ 1-3, que se pueden combinar para formar receptores GABA_A

y 3 subunidades ρ que contribuyen a formar los receptores GABA- ρ (antes GABA ρ) (Olsen R y cols., 2008). Estas subunidades poseen la misma estructura: un largo amino terminal extracelular que sirve como sitio de unión de agonistas y antagonistas; cuatro dominios transmembranales (M1-M4), y un corto carboxilo terminal extracelular (Johnston, 2005) (Fig. 3). El dominio M2 forma las paredes del canal y la carga eléctrica del dominio determina si el canal es permeable a aniones o cationes. La región entre las subunidades M3 y M4 contiene una larga asa intracelular que participa en mecanismos reguladores como fosforilación e interacción con otros constituyentes celulares (Siegel y cols., 2006).

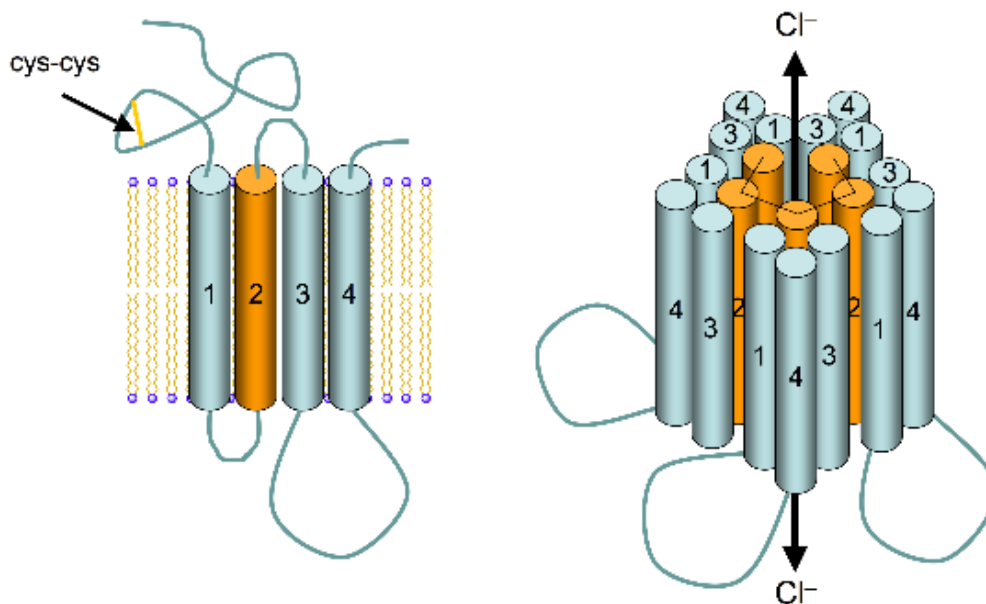


Figura 3. Estructura esquemática del receptor ionotrópico de GABA. Izquierda: Subunidad monomérica cuyos segmentos transmembrana están representados por cilindros. Derecha: arreglo simétrico de las 5 subunidades permitiendo la formación del poro del canal. (Modificado de Ernst y cols., 2005)

El receptor GABA $_A$ generalmente consta de 2 subunidades α , dos subunidades β , y una subunidad γ (Chang y cols., 1996) y la estequiometría más abundante en el SNC es la combinación $\alpha 1\beta 2\gamma 2$.

Los receptores GABA_A poseen distintos ligandos con propiedades farmacológicas distintas (Tabla 1).

	Subunidades	Agonistas	Antagonistas	Moduladores	Bloqueadores
<i>Receptor GABA_A</i>	α1-6	Isoguvacina		Barbitúricos	Picrotoxina
	β1-3	Muscimol	Bicuculina	Benzodiazepinas	Zn ²⁺
	γ1-3		THIP	Esteroides	TBPS
	δ, ε, θ, π	TACA		Etanol	

Tabla 1. Ligandos del receptor GABA_A (Modificado de Celso y cols., 2011).

El receptor GABA-ρ es una subclase de los receptores GABA_A compuesto por la subunidad ρ (rho), se expresa en distintas áreas del cerebro, como hipocampo, cerebelo y amígdala lateral (Rozzo y cols., 2002; Alakuijala y cols., 2005; Cunha y cols., 2010), en contraste con otros receptores GABA_A, el receptor de GABA_A-ρ tiene principalmente alta expresión en la retina (Olsen y cols., 2008). Existe evidencia experimental que sugiere que los receptores GABA_A-ρ son blancos terapéuticos potenciales para el tratamiento de miopía (Stone y cols., 2003), ansiedad (Cunha y cols., 2010), memoria (Chebib y cols., 2009) y trastornos del sueño (Arnaud y cols., 2001). Hay tres características funcionales distintivas que son únicas para el receptor GABA_A-ρ: tiempo prolongado de apertura del canal, baja conductividad y baja tasa de desensibilización. El tiempo medio del canal abierto oscila entre 150 y 200 ms, que es más de cinco veces que de las otras subunidades del receptor GABA_A (Chebib M, 2004). Subunidades ρ han sido caracterizadas en el cuerpo estriado, donde se encuentran en neuronas espinosas, no espinosas y astrocitos. Puede contribuir a la respuesta sináptica y extrasináptica de GABA. Su sensibilidad es a baja concentraciones de GABA (baja micromolar- alta nanomolar) y su conductancia prolongada debido a poco o nada de desensibilización es especialmente adecuada para la inhibición extrasináptica (Martinez-Delgado y cols., 2010; Rosas-Arellano y cols., 2012).

Aún no está claro cómo las MSN del cuerpo estriado, las neuronas más vulnerables en la EH, mantienen su función durante décadas a pesar de la expresión crónica de la huntingtina mutante (mhtt), para estudiar las afectaciones o cambios que pueden tener dichas células en los receptores de GABA, utilizamos un modelo murino que imita los daños a nivel mitocondrial provocando un déficit bioenergético en las MSN del neostriado.

2.5 MODELO ANIMAL DE ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO (3-NP) COMO MODELO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

El mecanismo primario que subyace la toxicidad estriatal con 3-NP es la inhibición selectiva de la actividad de complejo II de la cadena respiratoria, es decir, de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que se encuentra constantemente reducida en el núcleo estriado de pacientes con EH (Beal y cols., 1993). El 3-NP es una toxina natural, sintetizada por hongos (*Aspergillus flavus*; *Astragalus*, *Arthrinium*) y plantas (*Indigofera endecapylla*); cruza la barrera hematoencefálica y por lo tanto, se puede administrar sistémicamente. A pesar de que el 3-NP, un metabolito del 3-nitropropanol, fue descrito por primera vez en los niños chinos que habían comido azúcar contaminada, fue identificado por primera vez un par de años antes, después del masivo envenenamiento de ganado en los Estados Unidos, estos animales, después de haber sido envenenados con cultivos de leguminosas infectados, mostraron diferentes alteraciones motoras que evolucionaron hacia la descoordinación y la parálisis. Como se mencionó anteriormente, 3-NP es una toxina que inhibe irreversiblemente la enzima SDH, que a su vez está presente en la cara interna de la membrana mitocondrial y es responsable de la oxidación de succinato a fumarato. La inhibición de esta enzima conduce invariablemente a la muerte neuronal en los núcleos caudado y el putamen, lo que provocó distonía grave en los niños (Ludolph y cols., 1991). Por lo tanto, la administración sistémica del 3-NP puede ser considerada como una vía química y farmacológica en la que trastornos mitocondriales y degenerativos están implicados en el deterioro del

metabolismo energético. A pesar de que la EH no puede ser considerada como un trastorno mitocondrial como tal, el fenotipo neurodegenerativo de EH, es decir, la degeneración del caudado-putamen con déficit motor y cognitivo, pueden ser, en cierta medida, mimetizado utilizando la administración crónica de 3-NP. Es importante destacar que, el 3-NP produce la disfunción mitocondrial, que se sospecha ocurre en el curso temprano de la EH y ha sido observado en modelos transgénicos de la enfermedad (Koroshetz y cols., 1997; Jenkins y cols., 1998; Sawa y cols., 1999; Panov y cols., 2002).

La muerte celular provocada por el tratamiento 3-NP depende de cómo se administra la toxina: aplicaciones intraparenquimatosas inducen características similares a las lesiones isquémicas mientras que el tratamiento intraperitoneal induce la degeneración estriatal, que se asemeja más al fenotipo de la EH (Borlongan y cols., 1997a). La duración del tratamiento y la dosis del 3-NP también influye en el efecto fisiológico; el tratamiento agudo de una sola dosis vía i.p. induce la degeneración estriatal dentro de 6-12 horas después de la inyección (Alexi y cols., 1998; Brouillet y cols., 1999). El tratamiento sub-crónico consiste en inyecciones repetidas intraperitonealmente que llevan a la degeneración estriatal en pocos días (Beal y cols., 1993; Schulz y cols., 1996; Guyot y cols., 1997). Tratamientos crónicos (de más de 5 días hasta 4 semanas) con la administración sistémica continua de 3-NP también produjeron degeneración estriatal. Se ha diseñado un plan de administración de dosis bajas de concentración subcrónica de 3-NP (15 mg / kg, ip) durante un período (5 días) en ratones C57BL / 6, que se sabe que son más resistentes a la toxicidad del 3-NP; esta ventaja permitió observar cambios histopatológicos que imitan a los encontrados en los proceso inicial de la enfermedad (Rodríguez y cols., 2010), además de alteraciones motoras como discinesias orofaciales y el comportamiento de abrazadera (Hernández-Echeagaray, 2011). Los ratones tratados a baja concentración de dosis del 3-NP muestran hiperactividad motora, evaluada en pruebas de campo abierto, por lo que síntomas hipercinéticos se exhiben en la etapa inicial del daño estriatal en los

animales tratados con 3-NP, mientras que el fenotipo hipocinético se desarrolla más tarde durante el deterioro estriatal (Borlongan y cols., 1997b). El comportamiento y similitudes anatómicas encontradas entre EH y modelos que utilizan el 3-NP en ratas y primates concuerdan con los síntomas observados en las distintas etapas de la enfermedad. Por lo que se han identificado dos tipos de factores importantes que inducen la neurodegeneración en las MSNs. Los primeros son factores internos los cuales tienen papeles directos en la muerte celular, tales como quinasas c-Jun N-terminal y calpaínas activadas por calcio. Los segundos son factores externos, tales como glutamato, dopamina y adenosina, que modulan la degeneración estriatal inducida por 3-NP. Por lo que dichos factores apoyan la hipótesis de que el 3-NP y la htt poliglutaminada tienen ciertos mecanismos de toxicidad en común, lo que sugiere que el uso de 3-NP podría dar nuevos conocimientos sobre la patogénesis de la EH. La investigación sobre el 3-NP proporciona una prueba más de que el entorno neuroquímico de una neurona dada puede determinar su vulnerabilidad preferencial en las enfermedades neurodegenerativas (Brouillet y cols., 2005).

La inhibición de SDH por el 3-NP produce una reducción del ATP necesario para el mantenimiento de los canales iónicos y deteriora la capacidad de las neuronas para mantener un potencial de membrana en reposo fisiológicamente relevante. La pérdida del potencial de membrana provoca la liberación de magnesio que bloquea los receptores de NMDA y facilita la activación del receptor NMDA por medio de glutamato, lo que lleva a afluencia masiva de Ca^{2+} extracelular en el citosol, desencadenando diversos mecanismos que provocan la muerte neuronal (Novelli y cols., 1988; Nowak y cols., 1984).

2.5.1 ALTERACIONES GENERADAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE 3-NP

En ratas Wistar se utilizó una dosis de 4 $\mu\text{mol}/1 \mu\text{L}$ y de 2 $\mu\text{mol}/1\mu\text{L}$ del 3-NP, la cual se inyectó en la región ipsilateral caudado putamen (CPu), produciendo ruptura en las crestas mitocondriales, degeneración axonal, aumento excitatorio de vesículas

sinápticas y necrosis. Las concentraciones extracelulares de los aminoácidos excitadores aumentaron, mientras que de aminoácidos inhibitorios disminuyeron. Además, este estudio demostró que la administración de 3- NP resulta en daño de la CPu, con un desequilibrio del neurotransmisor en los ganglios basales, lo que produce cambios neuroconductuales específicos en ratas en la extremidad derecha (lado contralateral de la lesión CPu) y postura distónica del tronco, la longitud de la zancada disminuida y posturas distónicas se observaron en estas ratas (Liu H-G y cols, 2013).

En un estudio realizado en ratas se desarrolló la enfermedad de Huntington mediante la administración de dosis sub-crónicas de 3-NP, por vía intraperitoneal, dos veces al día durante 17 días. Los animales tratados con el 3-NP mostraron deterioro en la coordinación motora, tales como la disminución de la longitud de la zancada y el aumento del ángulo de la marcha. Y por otro lado, la prueba de laberinto-T reveló déficits de la cognición en animales tratados (Mehrotra y Sandhir, 2014)

Otro trabajo realizado en ratas reveló que la administración sistémica del 3-NP (10 mg / kg por vía Intraperitoneal) durante 14 días redujo significativamente el peso corporal, la actividad locomotora y la actividad de la enzima SDH mitocondrial también fue significativamente afectada en la región de cuerpo estriado en los animales tratados con 3-NP (Sumathi T y cols., 2013).

Resultados similares se observaron al administrar sistémicamente el 3 -NP (25 mg/kg por vía Intraperitoneal durante 4 días consecutivos) lo que causó la pérdida de peso corporal y los déficits neuroconductuales por el deterioro de las extremidades posteriores, la coordinación motora y disfunción de la memoria. También se encontró que la actividad de los complejos mitocondriales I, II, IV, (ensayo MTT) disminuyo de manera significativa (Binawade y Jagtap, 2013).

Comparación de las alteraciones a nivel celular y motor del modelo de 3-NP con la EH

	<i>Enfermedad de Huntington</i>	<i>3-NP</i>
<i>Síntomas motores</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ La etapa temprana es hipercinética caracterizada por la corea (Van Vugt y cols., 2001). La etapa tardía de la enfermedad es hipocinética, caracterizada por la pérdida de la capacidad para generar movimiento (Berardelli, 1999). 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Los síntomas de hipercinesia e hipocinesia acontecidos en las diferentes etapas de la EH, depende del tiempo y la dosis de administración (Borlongan y cols. 1997)
<i>Daño celular</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Se afecta preferentemente las MSNs, que se lleva a cabo en la zona dorso-lateral del putamen en los pacientes en HD. Mientras que las interneuronas se conservan en el cuerpo estriado. (Myers y cols., 1988; Beal y cols., 1993; Brouillet y cols., 1993) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Cuando se administra sistémicamente en condiciones crónicas la degeneración neuronal, se limita a la zona dorso-lateral de los caudado-putamen. En contraste, la administración aguda de 3-NP produce lesiones con pérdida celular más difusa (Blum y cols., 2001; Pang y cols., 1997). Conservándose las interneuronas (Beal y cols., 1993; Brouillet y cols., 1999).
<i>Alteraciones mitocondriales</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Los estudios post-mortem sobre el tejido cerebral, muestran disminución de la actividad en los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Gu y cols., 1996). 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 3-NP inhibe de forma irreversible la succinato deshidrogenasa (SDH; complejo II) de cadena de transporte de electrones (Alston y cols., 1977).
<i>Alteraciones moleculares</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Producción anormal de radicales libres (Tabrizi y cols., 1999). ▶ Activación de calpaína (Gafni y Ellerby 2002). ▶ Cambios en el citocromo c y caspasa-9 (Kiechle y cols., 2002). ▶ La modificación de la señalización de JNK inducida por m-HTT (Liu 1998; García y cols., 2004). 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Activación de caspasas ▶ Aumento de Calcio citosólico. ▶ Activa la proteasa, calpaína. ▶ Producción masiva de ROS ▶ Activación de JNK, debido a la producción de ROS. (Bizat y cols., 2003b).
<i>Expresión de Neurotrofinas</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Descenso en los niveles de BDNF en el núcleo estriado de pacientes con EH respecto a sujetos sanos (Kovalchuk y cols., 2002). 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Después de 48 hrs de tratamiento con 3-NP el BDNF disminuye significativamente (Hernández-Echeagaray y cols., 2012).

En un estudio realizado en ratones transgénicos de la EH, se observó que las MSNs de los ratones que no tienen la subunidad δ del receptor de GABA_A TTG (ratón

Gabrd-/-), la corriente tónica inducida por la administración de GABA, estaba reducida, así como una disminución en la supervivencia después de la inducción de excitotoxicidad in vitro con ácido quinolínico. Además, al inducir la corriente tónica de GABA con muscimol, se redujo la hinchazón aguda de las neuronas del cuerpo estriado después de la exposición a NMDA en ratones sin la mutación, pero no en los ratones *Gabrd-/-*. Estos datos confieren un papel importante en la inhibición tónica mediada por la subunidad δ del receptor GABA_A en la neuroprotección contra la excitotoxicidad en las MSNs del estriado. Por lo que sugieren que una mejora selectiva de la inhibición GABAérgica extrasináptica podría reducir el daño celular provocado por la excitotoxicidad (Santhakumar y cols., 2010).

Por otro lado, en un estudio diseñado para dilucidar el perfil comparativo mecanicista de la gabapentina, lamotrigina y sus interacciones con moduladores GABAérgicos contra la neurotoxicidad inducida por el 3-NP. La administración de ácido 3-NP sistémica (10 mg/kg) durante 14 días redujo significativamente el peso corporal, la actividad locomotora, la fuerza de agarre, y una alteración en las enzimas del complejo mitocondrial (I, II, IV). El tratamiento con gabapentina y lamotrigina restauraron significativamente la conducta y la actividad de las enzimas de los complejos mitocondriales en el grupo tratado en comparación con el tratado con el 3-NP. Además, el tratamiento previo con GABA (50 mg/kg) y / o muscimol (0,05 mg/kg) potenció significativamente los efectos protectores de gabapentina y lamotrigina que fueron significativos en comparación con su efecto aislado (Kumar y cols., 2012). Los resultados de dicho estudio sugirieron que un mecanismo GABAérgico está implicado en el efecto protector de la gabapentina y la lamotrigina contra la neurotoxicidad inducida por el 3-NP. Lo anterior pone en evidencia la importancia que tiene el estudio de los mecanismos GABAérgicos en las neuronas estriatales afectadas en el curso de la EH. Nuestro trabajo se centrara en el estudio de la cinética de la corriente de GABA en ratones tratados con el 3-NP como modelo de la EH.

3. JUSTIFICACIÓN

Recientemente, se ha mostrado que la degeneración neuronal del núcleo estriado en pacientes que padecen la enfermedad de Huntington puede resultar de alteraciones metabólicas relacionadas con el estrés oxidativo y con procesos de excitotoxicidad (Sieradzan y Mann, 2001). Debido a que la corteza cerebral proporciona una entrada masiva glutamatérgica al estriado y a que la degeneración neuronal ocurre principalmente en las regiones relacionadas precisamente con las aferentes corticales, se ha sugerido que la alteración en los mecanismos de liberación de la vía corticoestriatal podría desencadenar la degeneración de las neuronas espinosas medianas (Cepeda y cols., 2003; Hernández-Echeagaray, 2004). El estudio de los mecanismos fisiopatológicos responsables de la mayor vulnerabilidad de las células afectadas en la EH, conduciría al desarrollo de estrategias terapéuticas neuroprotectoras capaces de desacelerar o detener el proceso neurodegenerativo o incluso lograr la total remisión de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, en la actualidad no existe un cura efectiva para la EH, por lo que los tratamientos van dirigidos a paliar su sintomatología. En este orden de ideas, la generación de modelos animales de enfermedades neurodegenerativas ha permitido estudiar en detalle los diversos mecanismos celulares y moleculares que determinan la neuropatología selectiva de estos padecimientos. Empleando el modelo animal con el 3-NP, nos centraremos en el estudio de la cinética de la corriente de GABA, ya que se ha propuesto como un mecanismo compensatorio de la exitotoxicidad en la EH, al aumentar la actividad sináptica GABAérgica que se produce en el cuerpo estriado. Además se han evidenciado cambios en las subunidades del receptor de GABA en las MSNs en modelos transgénicos de la enfermedad, por lo que es pertinente analizar las propiedades cinéticas de dicho canal. Ya que estos cambios podrían estar involucrados en algunos de los mecanismos implicados en la fisiopatología y caracterizando dichos cambios poder en un futuro establecer alguna estrategia terapéutica potencial para la EH.

4. HIPÓTESIS

La inhibición mitocondrial altera la cinética y la farmacología de los receptores de GABA como resultado de cambios neuroadaptativos debido a la disfunción mitocondrial.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la cinética de la corriente de GABA en neuronas espinosas medianas provenientes del ratón C57BL/6 tratado con concentraciones no tóxicas y subcrónicas de 3-NP *in vivo* como modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Registrar y caracterizar electrofisiológicamente la cinética de la corriente inducida por GABA en neuronas medianas del núcleo estriado en el ratón C57BL/6 control y el tratado con 3-NP.

1.1. Respuesta de GABA a 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μM .

2. Evaluar la cinética de la corriente de GABA mediante el uso de antagonistas específicos de las subunidades del canal en neuronas del núcleo estriado en el ratón C57BL/6 control y el tratado con 3-NP.

2.1. Realizar curvas dosis respuesta a GABA en presencia de antagonistas en el ratón C57BL/6.

2.2. Gaboxadol a una concentración de 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 μM . Se une a la subunidad δ del canal de GABA.

2.3. L655, 708 a una concentración de 3, 10, 30, 100 y 1000 nM. Se une a la subunidad α_5 del canal de GABA.

6. METODOLOGÍA

Se utilizaron ratones “C57BL/6” de 30 días de edad provenientes del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla o de Harlan, Inc México criados en la FES-I. Para inducir el modelo murino, que refleja la fase inicial de la EH, los ratones se sometieron a un tratamiento con el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), el cual se administró 15 mg/kg de peso, diluido en 1 ml de solución de Buffer Fosfato (PB) por cada 20 gr de peso, vía Intraperitoneal durante 5 días. Y para el grupo control, se administró 1 ml de solución PB por cada 20gr de peso. Después de que concluyó el tratamiento, se dejaron 2 días de descanso y al octavo día se realizó el registro electrofisiológico.

6.1 PROTOCOLO DE DISOCIACIÓN.

El protocolo de disociación que se empleó ya ha sido previamente descrito por Flores-Hernández y cols, 2000 y 2002; el cual se describe a continuación:

Los ratones fueron anestesiados con halotano y decapitados, los cerebros se disecaron rápidamente y se colocaron en solución fría de isetionato con bajo calcio (en mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 23 glucosa, 15 HEPES, a un pH de 7.4, y la osmolaridad de 300 –310mOsm/L, suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G– nitro – L – arginina, 1 ácido kinurénico, y fue gaseada con O₂. Posteriormente se obtuvieron rebanadas coronales de 350µm con ayuda de un vibratomo (Campden) sumergidas en la misma solución. Las disecciones del estriado fueron limitadas a la región rostral y dorsal de la comisura anterior para reducir la contaminación por el globo pálido.

Las rebanadas se mantuvieron de 1 a 6 horas a temperatura ambiente (20-22° C) en una solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutation, 0.1 N^G-nitro – L – arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con 95% O₂/5% CO₂, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300 – 310mOsm/L.

Después de al menos 1 hora de incubación se tomó una rebanada del núcleo estriado para su tratamiento enzimático; el cual se realiza en una cámara de cultivo de 40mL con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O₂, conteniendo 0.2 mg de papaína (Calbiochem) a 35° C, durante 7 minutos. Suplementada de la misma forma que la solución EBSS.

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavó con la solución de isetionato y posteriormente se disoció mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas con calor). La suspensión de células se sembró en cajas Petri de poliestireno de 35 mm (Nunclon Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión se lavó con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 1% rojo fenol, burbujeada con O₂, pH=7.4 ajustado con NaOH, 300 – 310mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje.

6.2 TÉCNICA DE PATCH-CLAMP EN MODALIDAD DE CÉLULA COMPLETA.

Para el registro electrofisiológico de las corrientes inducidas por GABA en neuronas del núcleo estriado se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje. Los electrodos de registro son estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI – 1B120F-4 Sarasota, Florida), con una resistencia de 4 – 8MΩ.

La solución interna para registro de corrientes iónicas está compuesta de (en mM): 175 N – metil – D -glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl₂, 10 ácido etilen glicol – bis (β –aminoetil éter) – N, N, N', N'– tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na₂ATP, 0.35 Na₃GTP, 0.1 leupeptina, pH = 7.3 con H₂SO₄, 265 – 270mOsm/L.

La solución externa se compone de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl₂, 2 CaCl₂, 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.4 ajustada con NaOH, 300 – 305mOsm/L, y fue suplementada según el caso con los antagonistas de las corrientes de GABA.

Los registros se obtienen con un amplificador para fijación de voltaje (voltage clamp) Multiclamp 700A (Molecular Devices, Foster City, CA), controlado con el programa pClamp Versión 8, (Molecular Devices, Foster City, CA) ejecutándose en una computadora con procesador Pentium con una interfase tipo Digidata 1322A (Molecular Devices).

Una vez que se realizó la ruptura del sello, la resistencia de acceso que resulta de la resistencia de la punta de la pipeta más contribuciones de la membrana adherida a consecuencia de la ruptura del sello, fue menor a 25MΩ. El potencial de mantenimiento que se empleó fue de 0 mV tomando en cuenta que la corriente activada por GABA es mediada por cloro, cuyo potencial de equilibrio es de -80 mV, y al mantener el potencial en continuo se inactivan corrientes de sodio y calcio. El potasio es bloqueado por el Cs y el Ba de la solución externa.

6.3 APLICACIÓN DE FÁRMACOS

Para la inducción de corrientes activadas por ligando GABA, éste se aplicó a través de un sistema de capilares con un ángulo de 45° entre ellos y una distancia de 200 a 600µm de la célula a registrar. Un capilar con la solución externa (control) y otro la misma solución más el ligando utilizado. El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H) comandadas por la salida digital del sistema Digidata 1322A (Molecular Devices) y

un aparato de control fabricado en el laboratorio (Fig. 4). Los ligandos utilizados fueron el THIP (Gaboxadol) y el L-655,708 como antagonistas.

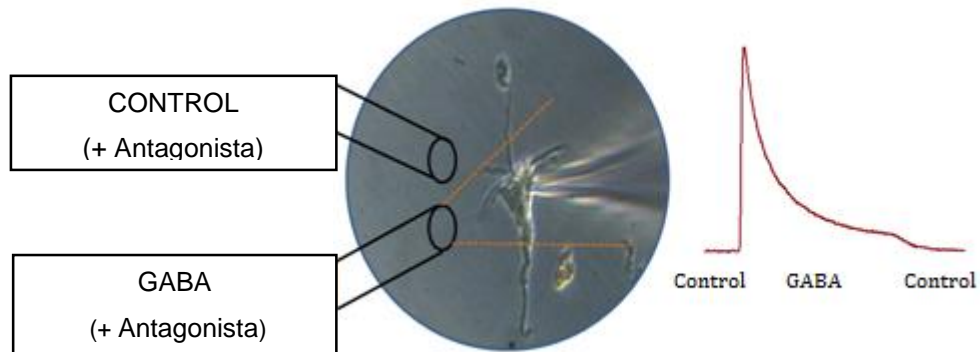
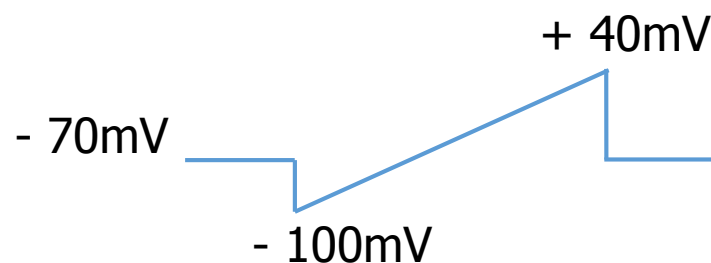


Figura 4. Aplicación de soluciones mediante capilares. Se controló la aplicación de las soluciones mediante válvulas solenoides, a la derecha se muestra un trazo representativo de corriente generada por la aplicación de GABA.

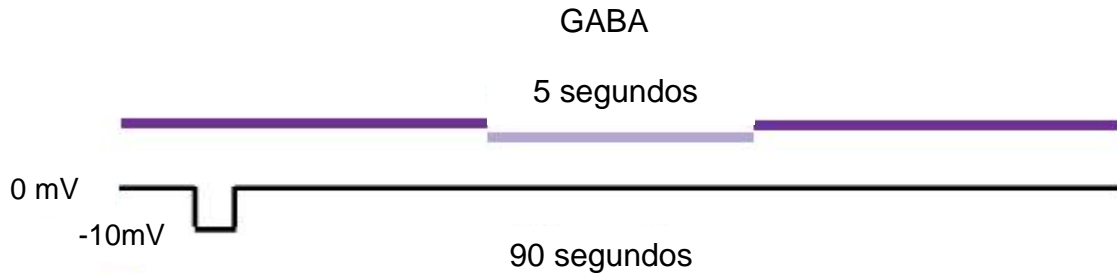
6.4 PROTOCOLOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Los protocolos empleados para el registro electrofisiológico fueron los siguientes:

Rampa: El protocolo es de -100mV a $+40\text{mV}$, con una duración de 300 ms para generar las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} , con el objetivo de conocer el estado funcional de la célula.

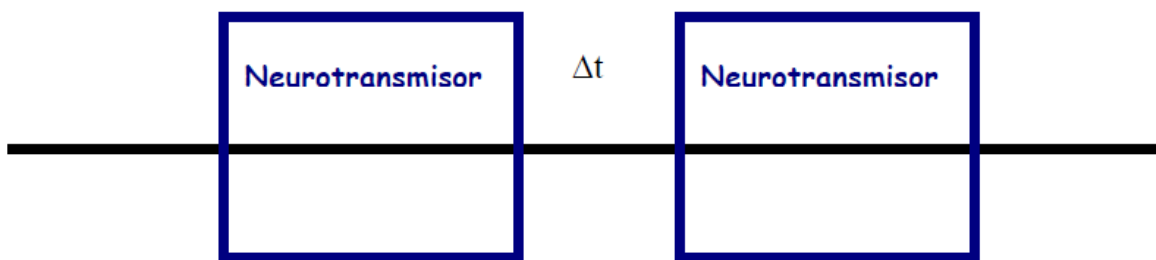


Aplicación del agonista: en este protocolo se fija y se mantiene el potencial de membrana a 0 mV, la duración de este protocolo es de 90 segundos durante los cuales se da la aplicación de GABA por 5 segundos.

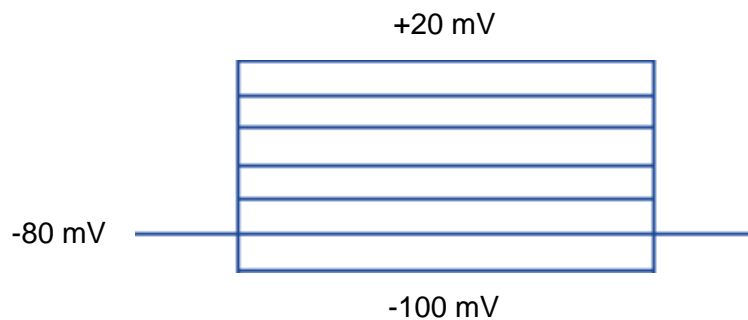


Con este protocolo se llevaron a cabo las condiciones experimentales que se describen a continuación y de igual forma para la aplicación de antagonistas de GABA:

Protocolo de recuperación: El propósito del protocolo fue estudiar la constante de tiempo en que la corriente podía ser recuperada al 100 % después de una aplicación inicial. Se aplicó un pulso de prueba y después de un intervalo de tiempo que se incrementó cada 5 segundos después del pulso inicial se dió una segunda aplicación como se muestra en el esquema. El periodo de tiempo entre aplicaciones iniciales es de 90s. Para ambos casos el potencial de mantenimiento fue de 0mV.



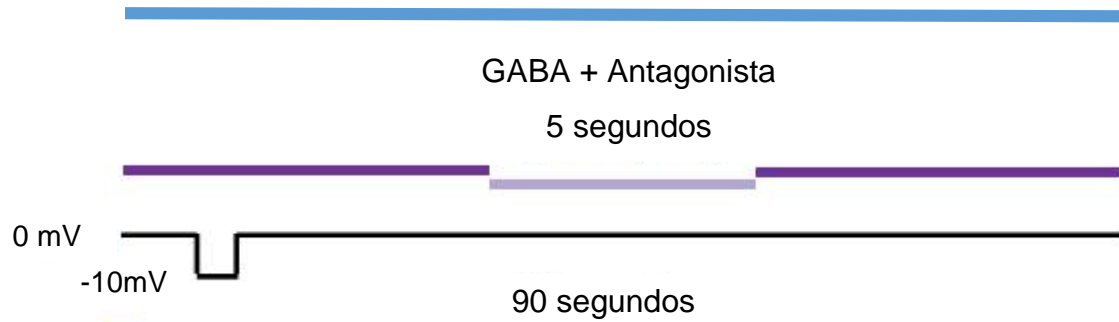
Protocolo corriente vs voltaje (IV): consistió en aplicar pulsos cuadrados de voltaje con intervalo de 20 mV y luego poner a la célula a un potencial de mantenimiento definido de -80mV . Durante el pulso cuadrado se aplica el neurotransmisor de estudio durante 5 segundos. La duración de este protocolo es de 90 segundos.



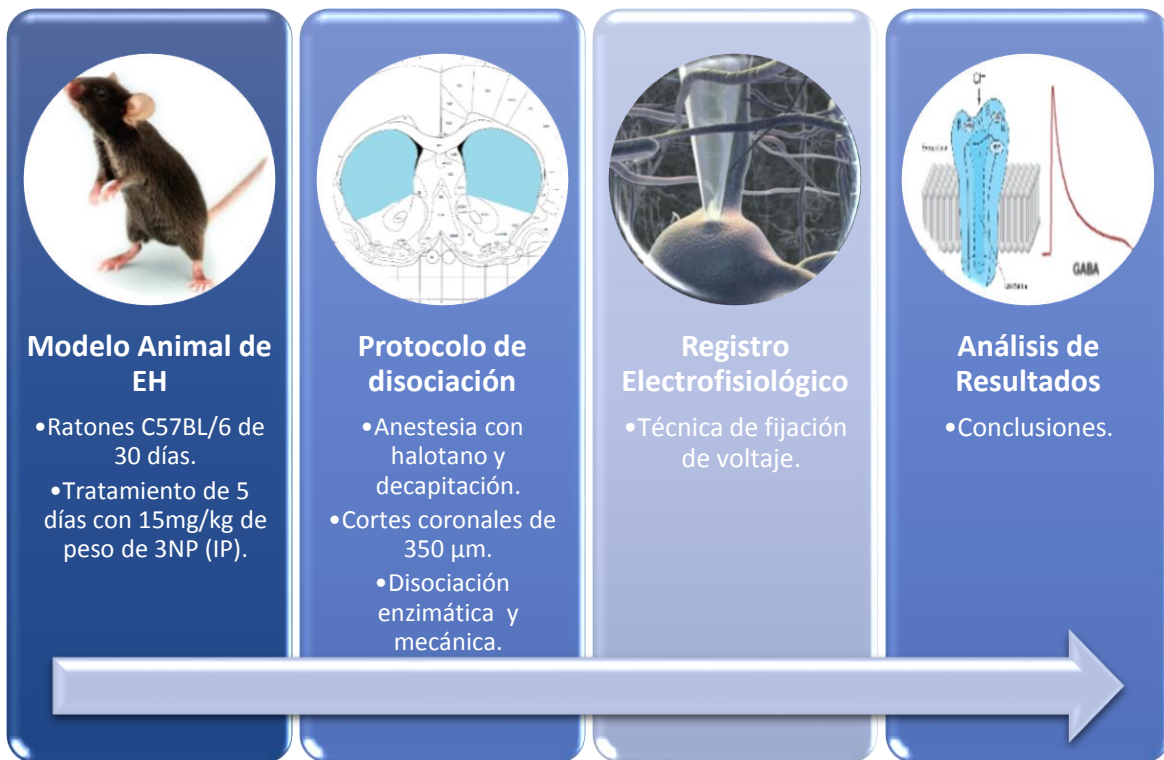
Condición control: en esta condición experimental la célula se perfundió con la solución externa conducida por el capilar 1, manteniéndose el baño con esta solución en todo el protocolo interrumpiéndose 5 segundos para bañar a la célula con una concentración de GABA 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 , 300 y 1000 μM conducida por el capilar 2. El protocolo continuará y se repetirá hasta obtener 3 o 4 trazos de corriente estable. Esta condición experimental se tomará como control y como lavado del efecto de la aplicación de los antagonistas de GABA.

Condición GABA + Antagonistas: en esta condición experimental la célula se perfundió con la solución externa más el antagonista y se caracterizará la respuesta tanto en animales control como en los tratados con 3-NP, se mantendrá el baño con esta solución en todo el protocolo interrumpiéndose cuando se bañe la célula con GABA y Gaboxadol o L-655,708 coaplicados. Se aplicó el GABA más los antagonistas 3 o 4 veces para mostrar un efecto estable.

Solución externa + Antagonista



6.5 ESQUEMA DE TRABAJO



6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como el efecto de la aplicación de los antagonistas es la reducción de la amplitud del pico de la I_{GABA} con respecto a la condición control y lavado, se calculó el porcentaje de reducción aplicado la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = ((\delta I_{NE} / ((\delta I_C + \delta I_L) / 2)) - 1) * 100$$

Donde:

δI_C = densidad de corriente en la condición control

δI_L = densidad de corriente en la condición lavado

δI_{NE} = densidad de corriente en la condición GABA

Los valores reportados representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los ajustes y gráficas se realizaron con el programa Origin 9.1 (Microcal Software Inc., Nort Hampton, MA). Estadísticamente se realizó una ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Se registraron un total de 173 células, 150 corresponden a las neuronas espinosas medianas y 23 a las interneuronas colinérgicas. De las MSN la mitad corresponden al grupo control y la otra mitad al grupo experimental tratado con el 3-NP. Las neuronas registradas presentaron una resistencia de membrana $\geq 1G\Omega$ y una resistencia de acceso $< 25M\Omega$. Aquellas células que no presentaron dichas características no fueron tomadas en cuenta en el análisis (Fig. 1,2).

A)



B)



Figura 1. Fotografías tomadas de la parte experimental de las MSN disociadas del cuerpo estriado de ratón C57BL/6. A) Neuronas del grupo control. B) Neuronas del grupo tratado con 3-NP.

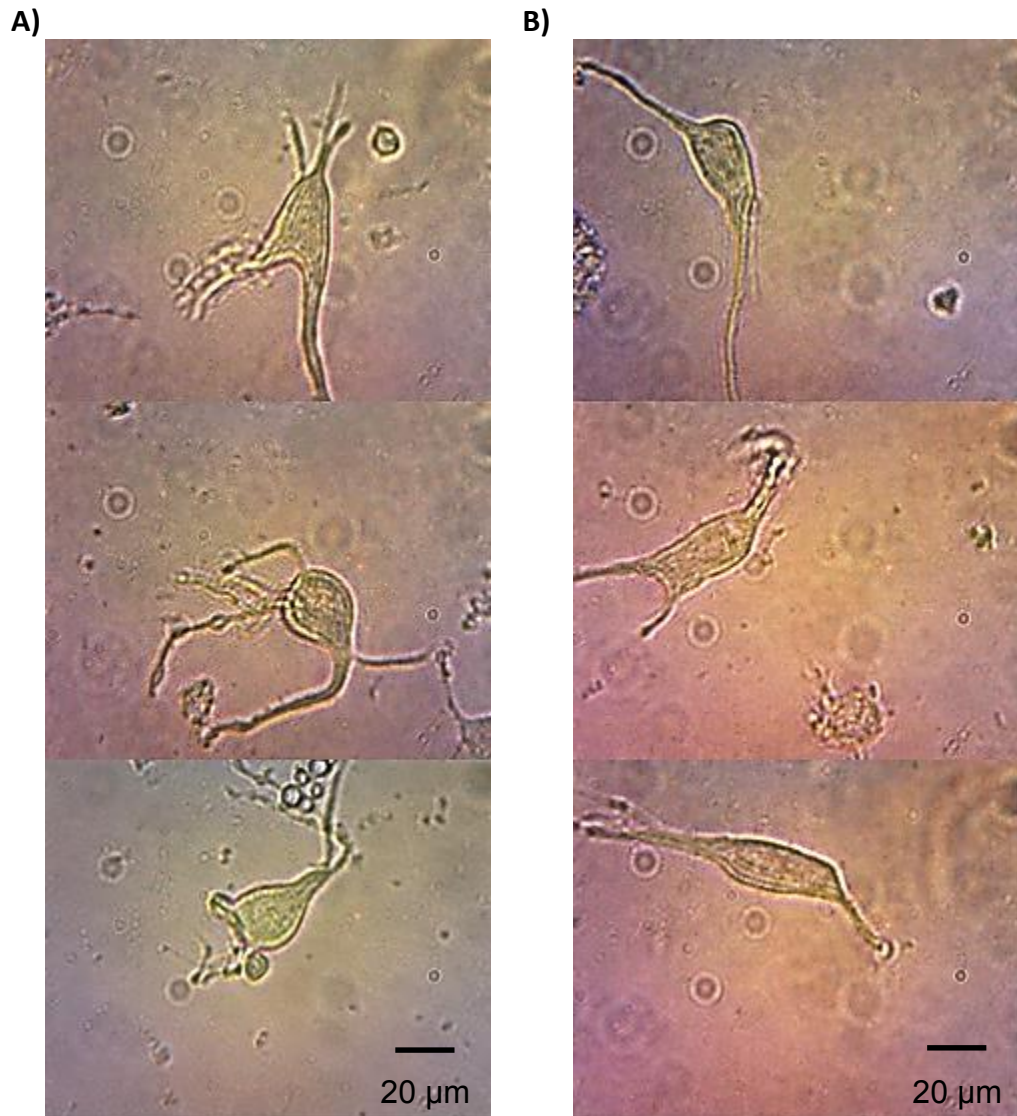
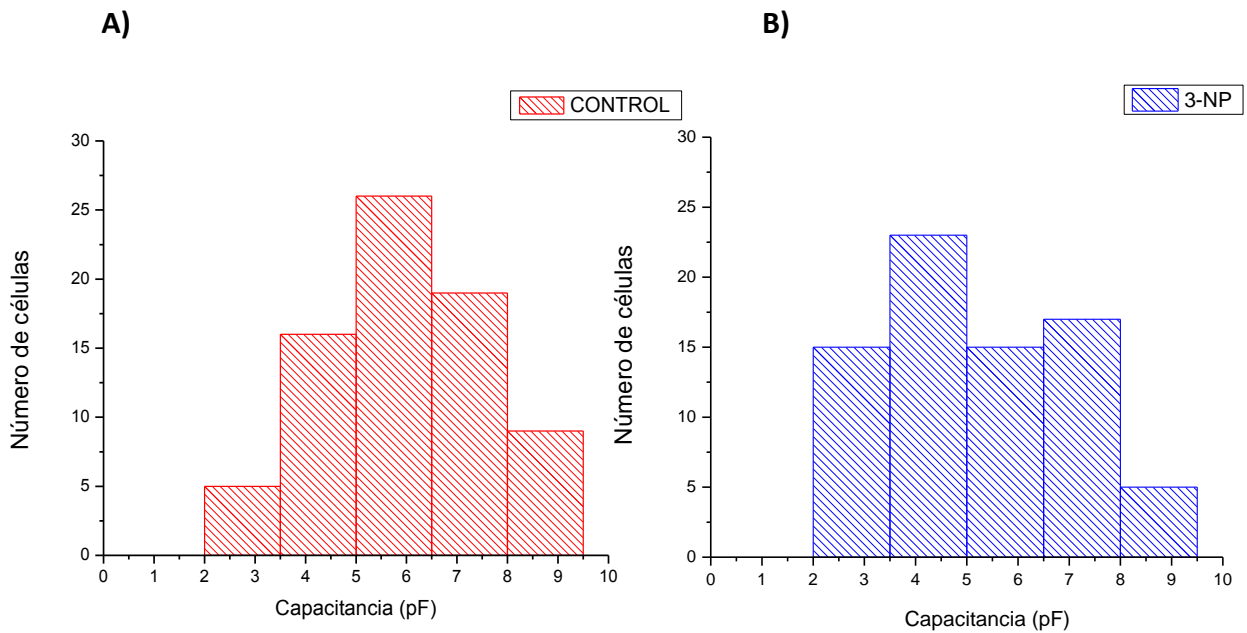


Figura 2. Fotografías tomadas de la parte experimental de las interneuronas colinérgicas disociadas del cuerpo estriado de ratón C57BL/6. A) Neuronas del grupo control. B) Neuronas del grupo tratado con el 3-NP.

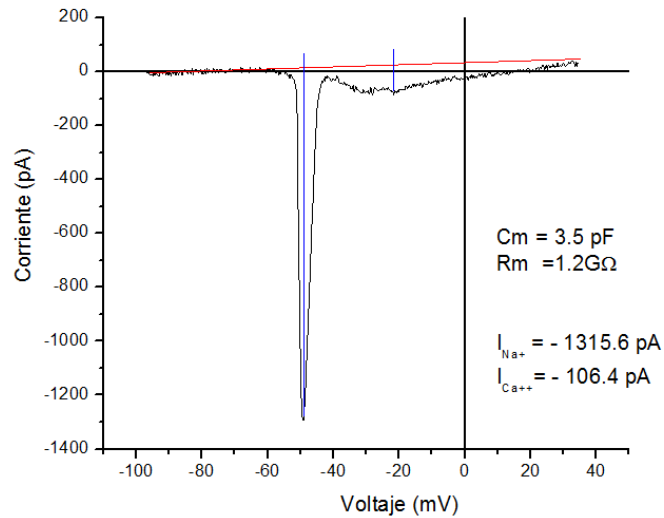
Se determinó el tamaño de las células mediante la medición de su capacitancia, parámetro electrofisiológico de equivalencia $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$. En el núcleo estriado del 95 al 98% de la población neuronal pertenece a las neuronas espinosas medianas cuya capacitancia oscila de 3 a 10 pF (Kawaguchi y cols., 1990). Y solo el 1.0% pertenece

a las interneuronas colinérgicas. El porcentaje restante pertenece a las demás interneuronas medianas presentes en el núcleo estriado.



Gráfica 1. Histograma de capacitancia. A) Se muestra la frecuencia del tamaño de las neuronas registradas de los animales control, determinado por su capacitancia presentándose con mayor frecuencia neuronas de tamaño entre 5 a 6.5 pF (n=75). **B)** Histograma de capacitancia. Se muestra la frecuencia del tamaño de las neuronas de los animales tratados con 3-NP. Siendo las de mayor frecuencia las neuronas entre 3.5 a 5 pF (n=75).

Al inicio de cada registro se realizó el protocolo de rampa de voltaje, de -100 mV a +40 mV con una duración de 300 ms para generar las corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ por la apertura de los canales dependientes de voltaje, lo que consideramos como índice de viabilidad de la célula (Gráfica 2).

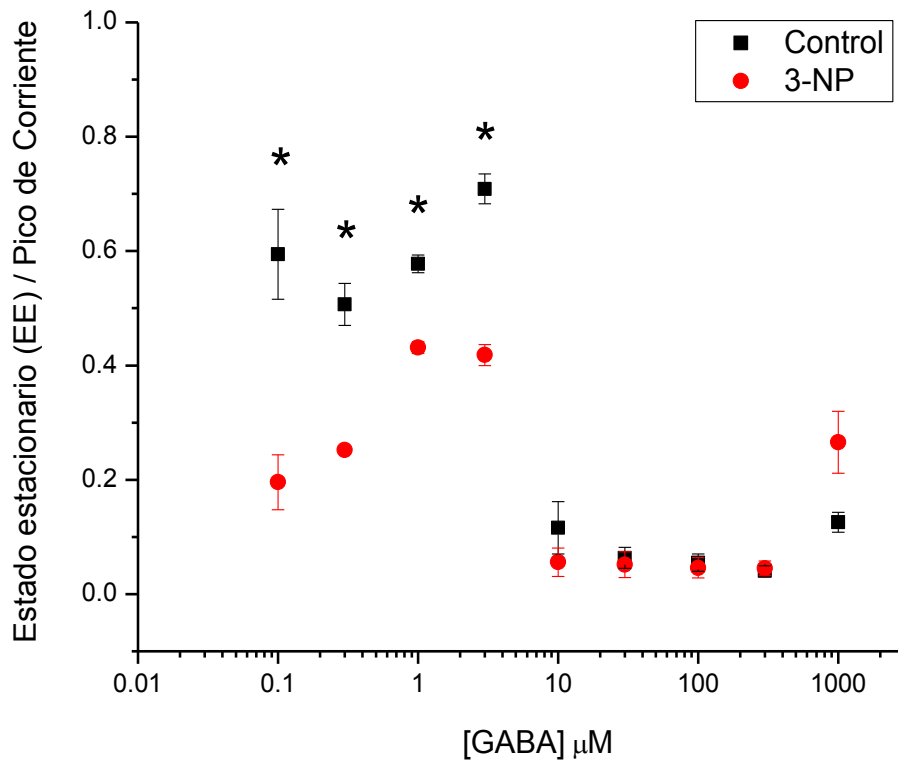


Gráfica 2. Trazo representativo de voltaje vs corriente. Empleando el protocolo rampa se generaron los trazos de corriente de Na^+ y Ca^{2+} por la apertura de los canales respectivos dependientes de voltaje tanto en neuronas del grupo control como del tratado con 3-NP.

Para estudiar la cinética de los canales de GABA, se analizaron los siguientes parámetros: estado estacionario (SS) / pico de Corriente, el tiempo al pico y la tau de desensibilización.

7.1 ESTADO ESTACIONARIO (EE) / PICO DE CORRIENTE

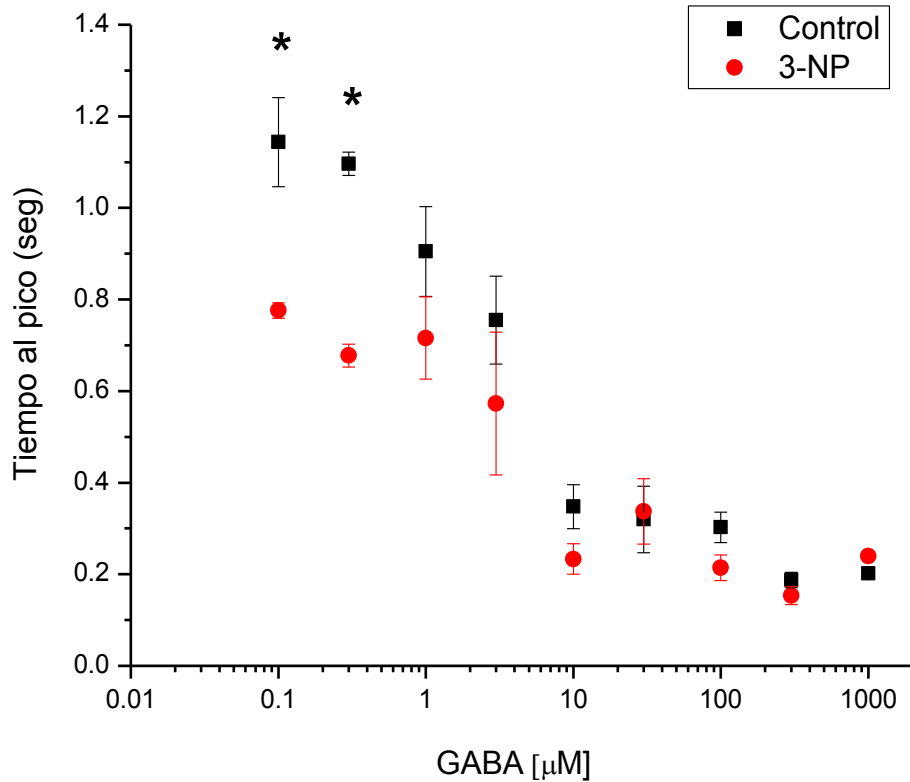
Al ser una razón de cambio, este parámetro se mide de 0 a 1, como se muestra en la siguiente gráfica con respecto a las distintas concentraciones (Gráfica 3). La relación de EE / Pico nos muestra en la dosis-respuesta que a bajas concentraciones de GABA ($<10 \mu\text{M}$) se genera una corriente que tiene poca desensibilización con un promedio de 60% mientras que a dosis $> 10 \mu\text{M}$ al desensibilización es casi del 95%. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con el 3-NP presenta una disminución significativa del valor de la relación EE/Pico sólo en bajas concentraciones de GABA.



Gráfica 3. Estado estacionario con respecto al pico de la corriente activada por GABA. El parámetro EE/Pico se utilizó como medida de desensibilización del receptor de GABA a 0.1 μM (n=12), 0.3 μM (n=10), 1 μM (n=10), 3 μM (n=12), 10 μM (n=12), 30 μM (n=12), 100 μM (n=15), 300 μM (n=15) y 1000 μM (n=15), en las MSN.

7.2 TIEMPO AL PICO

Como medida del tiempo de activación de la corriente de GABA se encontraron cambios significativos a concentraciones de 0.1 y 0.3 μM , se obtuvo mediante el análisis de varianza, un valor de $p < 0.05$ (Gráfica 4).

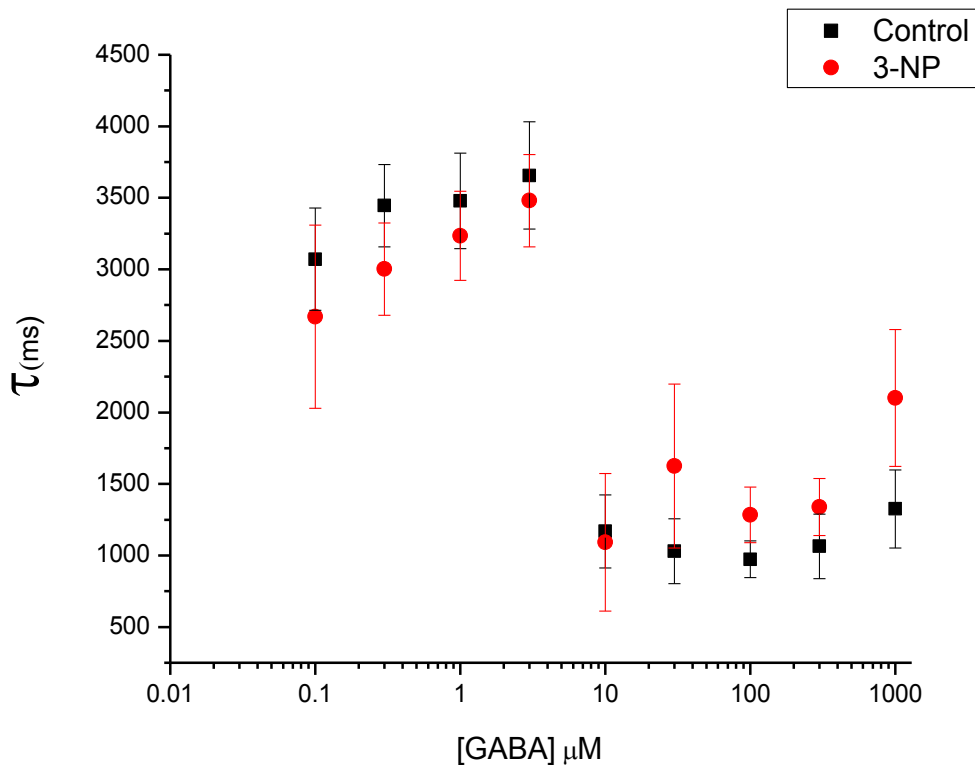


Gráfica 4. Tiempo al pico de la corriente de GABA. Las concentraciones de GABA a 0.1 μM (n=12), 0.3 μM (n=10), 1 μM (n=10), 3 μM (n=12), 10 μM (n=12), 30 μM (n=12), 100 μM (n=15), 300 μM (n=15) y 1000 μM (n=15), en las MSN.

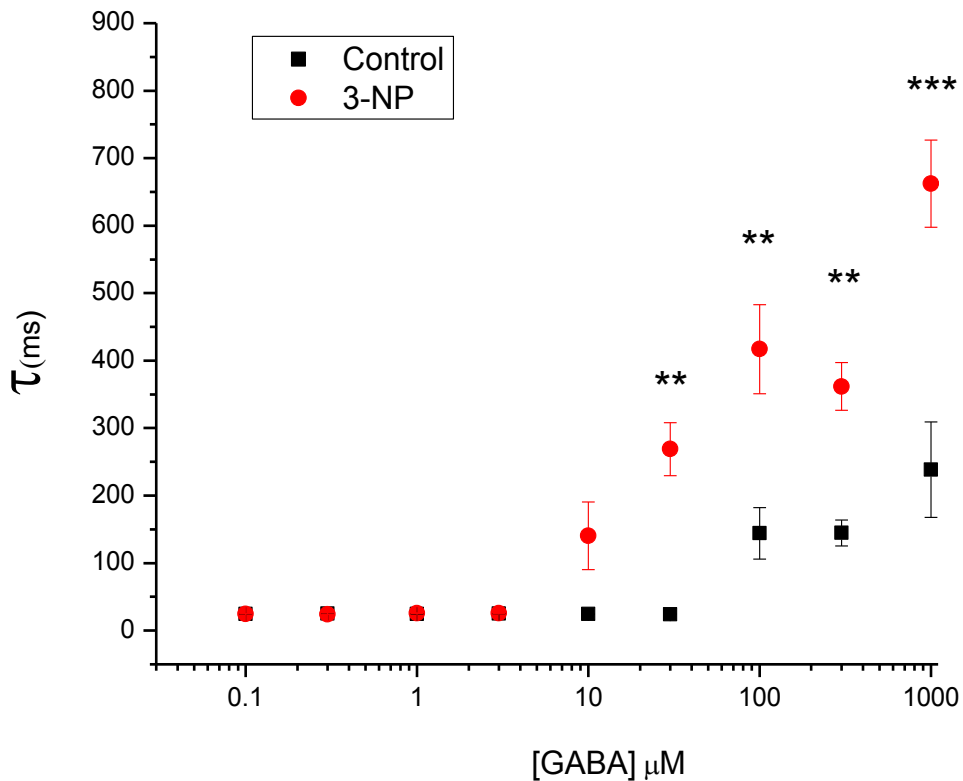
7.3 CONSTANTE DE TIEMPO DE DESENSIBILIZACIÓN (TAU)

La desensibilización del receptor GABA_A ha demostrado ser multifásica, lo que sugiere que múltiples conformaciones son posibles (Celentano y Wong, 1994; Haas & Macdonald, 1999). Anteriormente se ha investigado la desensibilización siguiendo los patrones de $\alpha\beta\delta$ y $\alpha\beta\gamma$ de los receptores GABA (Haas & Macdonald, 1999), se cree que constituyen la mayoría de isoformas del receptor GABA_A en el cerebro

(McKernan y Whiting, 1996). Tanto la velocidad y grado de desensibilización depende de la composición de subunidades. Por ejemplo, los receptores $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ mostraron una amplia desensibilización que fue descrito por una fase rápida (~ 10 ms), una fase intermedia (~ 150 ms) y una fase lenta (~ 1500 ms). En contraste, los receptores con las subunidades $\alpha_1\beta_3\delta$ se desensibilizan menos, con una sola fase lenta (~ 1500 ms) similar a la fase lenta de las corrientes de los receptores $\alpha_1\beta_3\gamma_2$. En nuestro modelo se identificaron 2 fases una lenta y una rápida. Para la τ_1 no se encontró diferencia significativa entre los grupos (Gráfica 5). En cambio, en la τ_2 se muestra significativo en la concentración de 10-1000 μM (Gráfica 6).



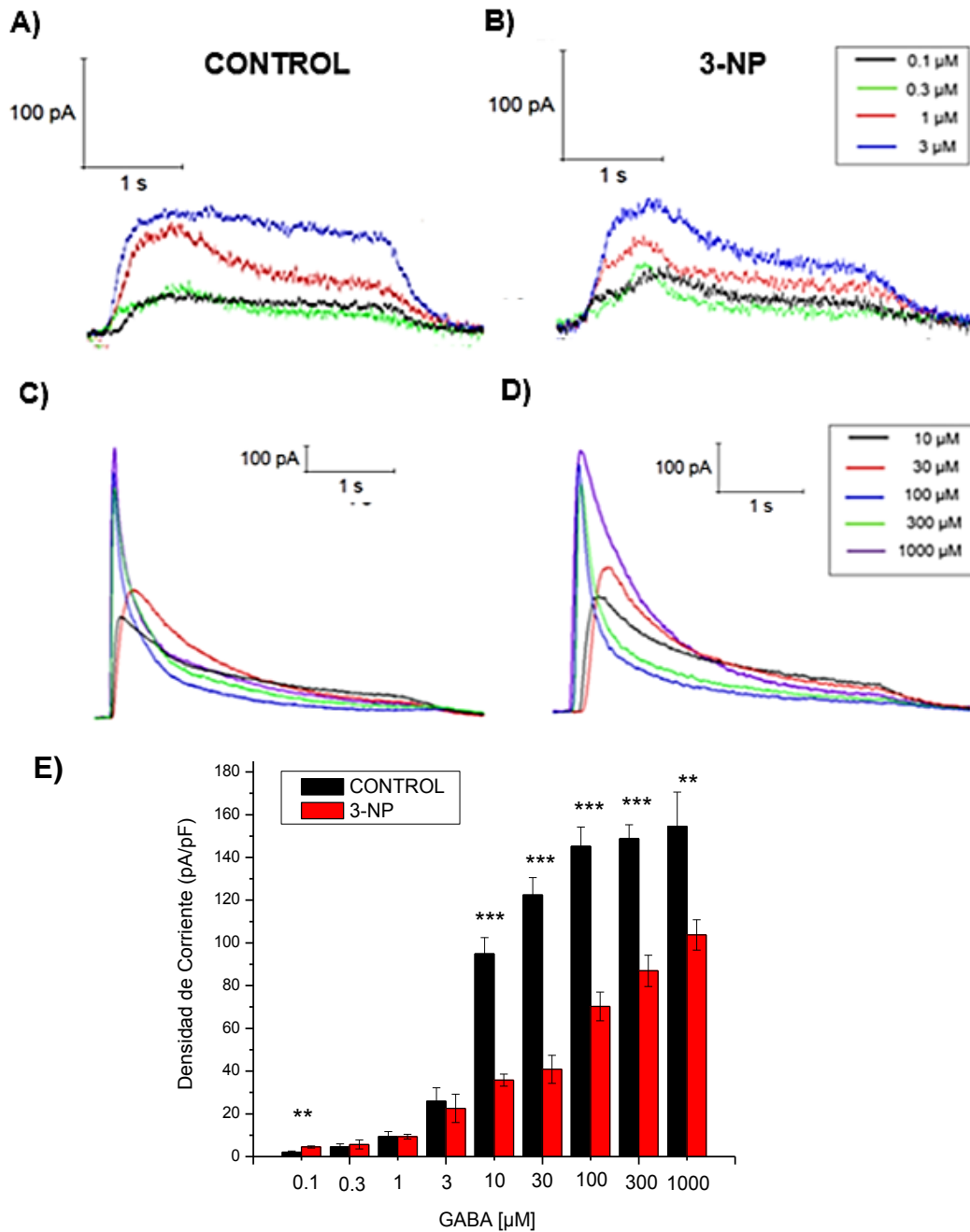
Gráfica 5. Tau de desensibilización de GABA (τ_1). La τ_1 representa la fase lenta de la desensibilización del receptor de GABA a 0.1 μM (n=12), 0.3 μM (n=10), 1 μM (n=10), 3 μM (n=12), 10 μM (n=12), 30 μM (n=12), 100 μM (n=15), 300 μM (n=15) y 1000 μM (n=15), en las MSNs.



Gráfica 6. Tau de desensibilización de GABA (τ_2). La τ_2 representa la fase rápida de la desensibilización del receptor de GABA a 0.1 μM (n=12), 0.3 μM (n=10), 1 μM (n=10), 3 μM (n=12), 10 μM (n=12), 30 μM (n=12), 100 μM (n=15), 300 μM (n=15) y 1000 μM (n=15), en las MSNs.

7.4 REGISTRO DE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR GABA (I_{GABA})

Para generar la I_{GABA} se utilizó una concentración de 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μM empleando el protocolo de aplicación de agonista. Y de esta manera se obtuvo la siguiente gráfica de densidad de corriente con respecto a la concentración de GABA (Gráfica 7).



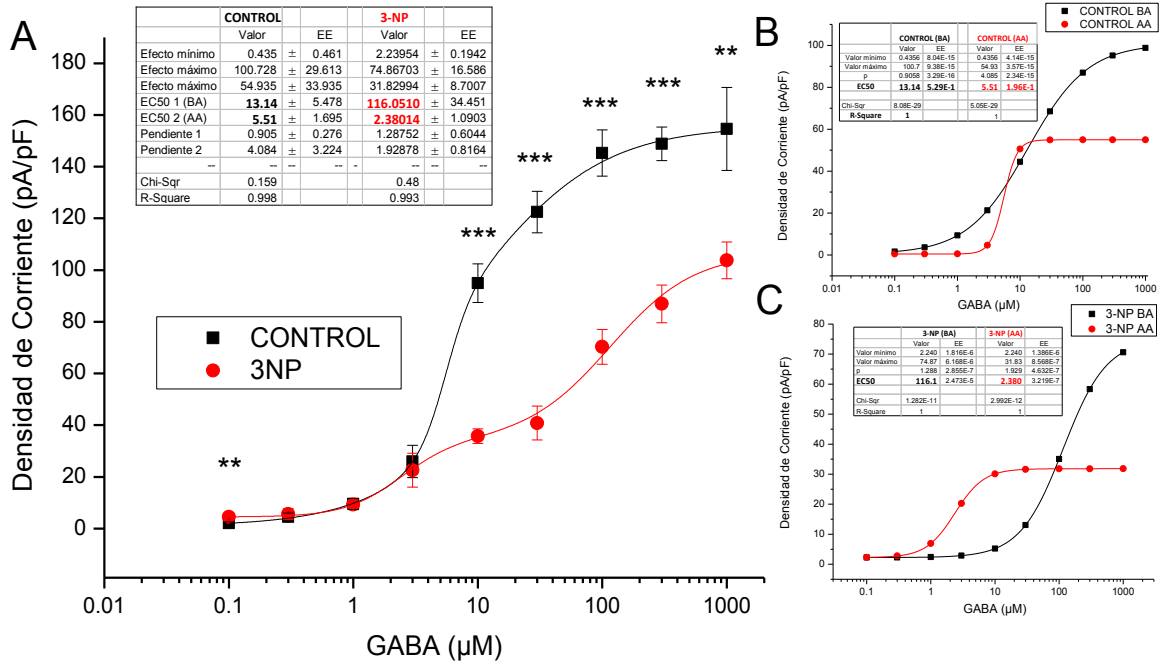
Gráfica 7. Corriente activada por GABA en el grupo experimental control y el tratado con 3-NP. A,B,C,D) Trazos representativos de la corriente generada por GABA utilizando una concentración de 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μM , de las MSN de ratón control y tratado con 3-NP. **E)** Densidad de corriente con respecto a la concentración de 0.1 μM (n=12), 0.3 μM (n=10), 1 μM (n=10), 3 μM (n=12), 10 μM (n=12), 30 μM (n=12), 100 μM (n=15), 300 μM (n=15) y 1000 μM (n=15), en ambos grupos experimentales.

Para normalizar los datos de los registros de la corriente activada por GABA, se obtuvo la densidad de corriente al pico (pA/pF). Para identificar si hay cambios en la densidad de corriente de GABA en los animales tratados con respecto al control, se realizó un análisis de varianza obteniendo un valor de $p > 0.05$ en las concentraciones de 0.3, 1 y 3 μM , $p < 0.01$ en la concentración de 0.1 μM y 1000 μM y un valor de $p < 0.001$ para 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM de GABA.

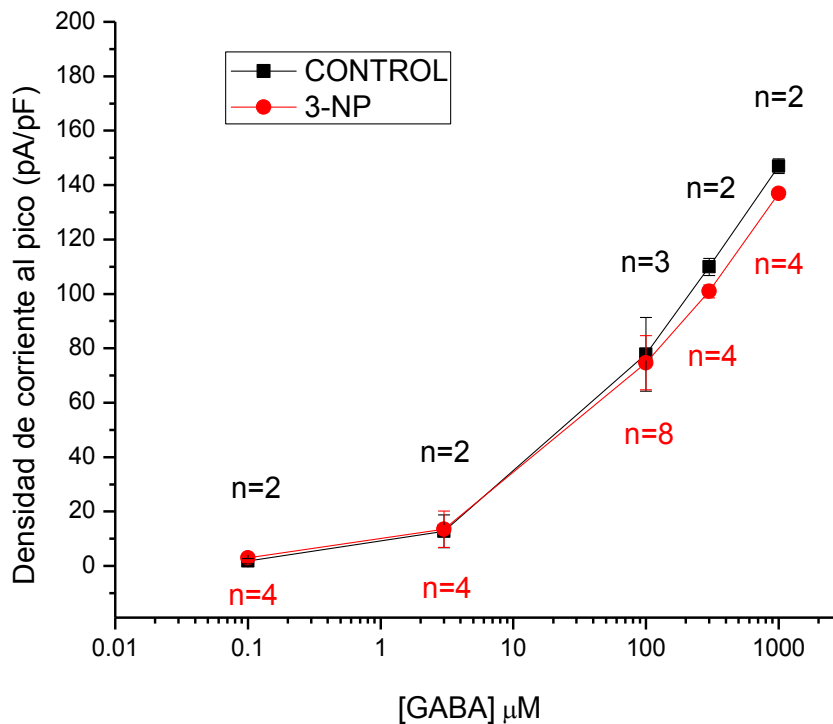
Del registro de las neuronas medianas se construyó una curva dosis-respuesta, utilizando un ajuste de doble logística, se obtuvo una EC_{50_1} de $13.14 \pm 5.4 \mu\text{M}$, EC_{50_2} de 5.51 ± 1.6 para el grupo control y una EC_{50_1} de $116.05 \pm 34.4 \mu\text{M}$, EC_{50_2} de 2.38 ± 1.0 para el grupo tratado con 3-NP (Gráfica 8. A).

Tomando en cuenta que los efectos farmacológicos en una población son reflejados en las curvas de dosis respuesta, cuando tenemos más de una población con diferente sensibilidad farmacológica, los efectos de un mismo fármaco sobre las diferentes poblaciones se suman. Cuando tenemos dos poblaciones con EC_{50} diferentes entonces en la curva dosis respuesta se observarán las diferentes fases asociadas a cada componente sigmoideal. Debido a este efecto podemos restar si conocemos los parámetros de cada una de las poblaciones farmacológicamente activas a un mismo compuesto. De esta forma, en el laboratorio el MC Gustavo Hernández Carballo desarrolló los algoritmos para poder separar los diferentes parámetros sigmoideales de funciones sigmoideales sumadas en el programa Origin (v-9.1). Este procedimiento se define como pelado o sustracción de funciones sigmoideales. Obtuvimos las gráficas del pelado de sigmoideales las cuales nos permiten observar que en el grupo control se distingue una población con baja afinidad a GABA (BA) y otra con alta afinidad (AA) (Gráfica 8, B). También se observaron dos poblaciones diferentes en el grupo tratado con 3-NP, donde la población que corresponde a la que tiene AA no cambia la EC_{50} con respecto al control. Ocurre lo contrario en la población identificada como de BA (Gráfica 8, C). Del registro de las interneuronas colinérgicas se obtuvo una gráfica de puntos,

debido a que el número de neuronas registradas no fue suficiente, no se obtuvo la curva dosis-respuesta. Se observó similitud en todas las concentraciones de GABA utilizadas en ambos grupos experimentales (Gráfica 9).



Gráfica 8. Curva Dosis-Respuesta de GABA. **A)** Densidad de corriente con respecto concentración de GABA 0.1 μM (n=12), 0.3 μM (n=10), 1 μM (n=10), 3 μM (n=12), 10 μM (n=12), 30 μM (n=12), 100 μM (n=15), 300 μM (n=15) y 1000 μM (n=15), tanto del grupo control, como del tratado con 3-NP en MSN **B)** Gráfica de pelado de sigmoidales para identificar dos poblaciones diferentes en el grupo control. **C)** Gráfica del pelado de sigmoidales para identificar dos poblaciones diferentes en el grupo tratado con 3-NP.

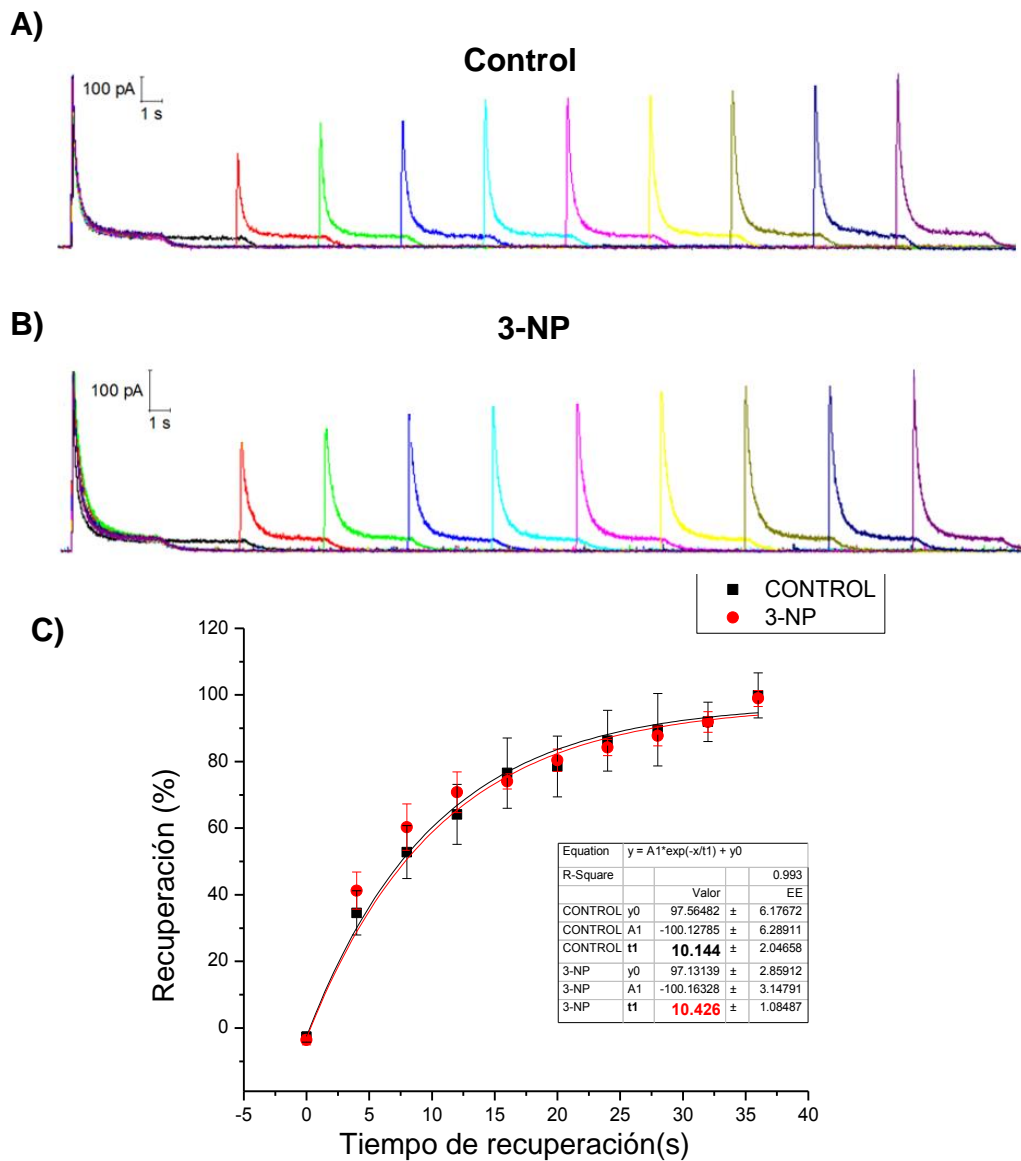


Gráfica 9. Densidad de corriente con respecto a la concentración de GABA. Se utilizaron las siguientes concentraciones de GABA: 0.1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μM , tanto del grupo control como del tratado con 3-NP en las interneuronas colinérgicas.

7.5 RECUPERACIÓN DE LA I_{GABA}

El protocolo de recuperación se utilizó para estudiar la constante de tiempo en que la corriente puede ser recuperada al 100 % después de una aplicación inicial, tanto en neuronas del grupo control como del tratado con el 3-NP. Se graficó el porcentaje de recuperación de la corriente respecto al tiempo y se realizó un ajuste de decaimiento exponencial de primer orden, obteniendo así un valor de tau (τ) de 10.14 ± 2.04 s. (n= 10 células) para el grupo control. Y para el grupo tratado con 3-NP se obtuvo un valor de $\tau = 10.42 \pm 1.0$ s (n= 10 células). Los registros se llevaron a cabo con un potencial de mantenimiento de 0mV (Gráfica 10). Se realizó un

análisis de varianza obteniendo una $p > 0.5$ por lo que no se presentan cambios significativos entre los grupos experimentales.

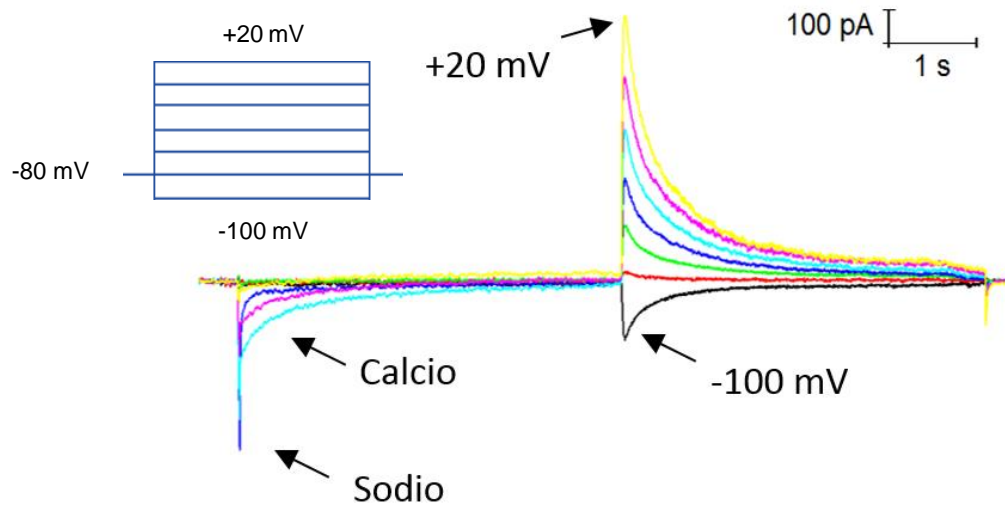


Gráfica 10. Protocolo de recuperación de I_{GABA} . **A)** Trazo representativo del protocolo de recuperación de GABA ($100\mu\text{M}$) de una neurona del grupo control. **B)** Trazo representativo en una neurona del grupo tratado con 3-NP. **C)** Gráfica del porcentaje de la recuperación de la corriente contra el tiempo generada por la aplicación de GABA $100\mu\text{M}$; se realizó un ajuste de decaimiento exponencial de primer orden para elucidar la constante de tiempo.

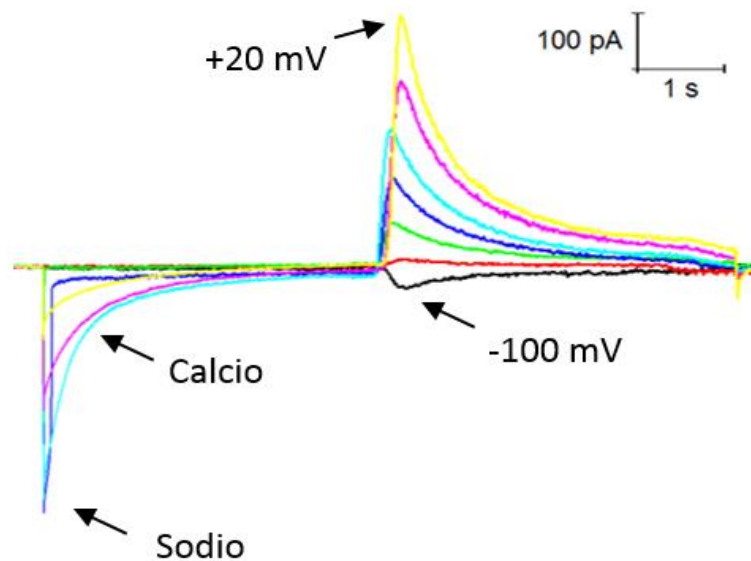
7.6 POTENCIAL DE EQUILIBRIO DE LA I_{GABA}

Se utilizó el protocolo de corriente vs voltaje (IV) para generar la corriente de GABA ($100\mu\text{M}$) a diferentes voltajes (Gráfica 11). Y para determinar el potencial de equilibrio de la I_{GABA} se realizó un ajuste de tipo polinomial de tercer orden (Gráfica 12).

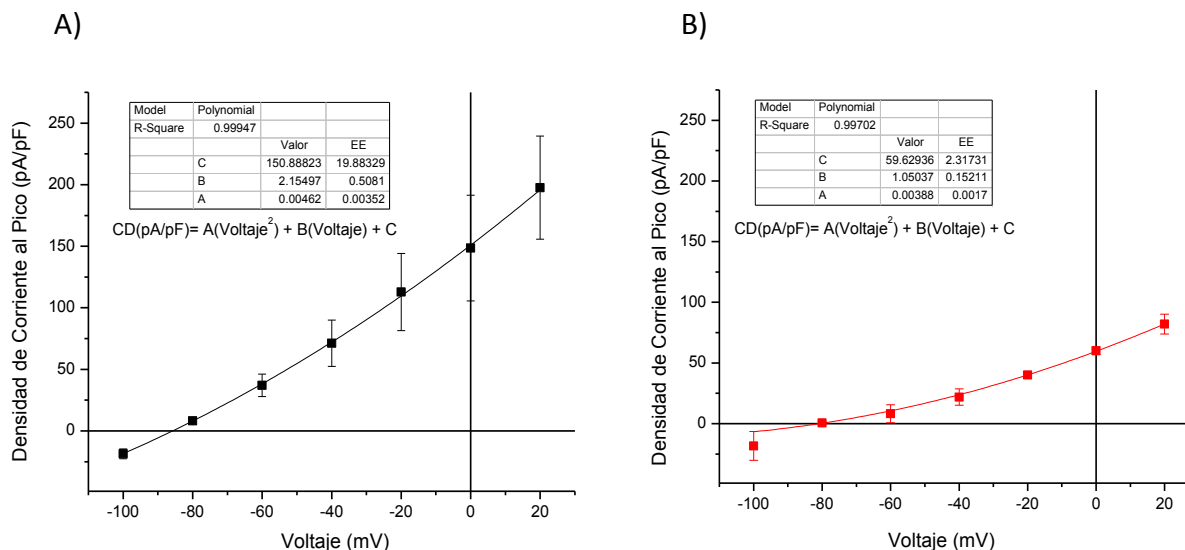
A)



B)



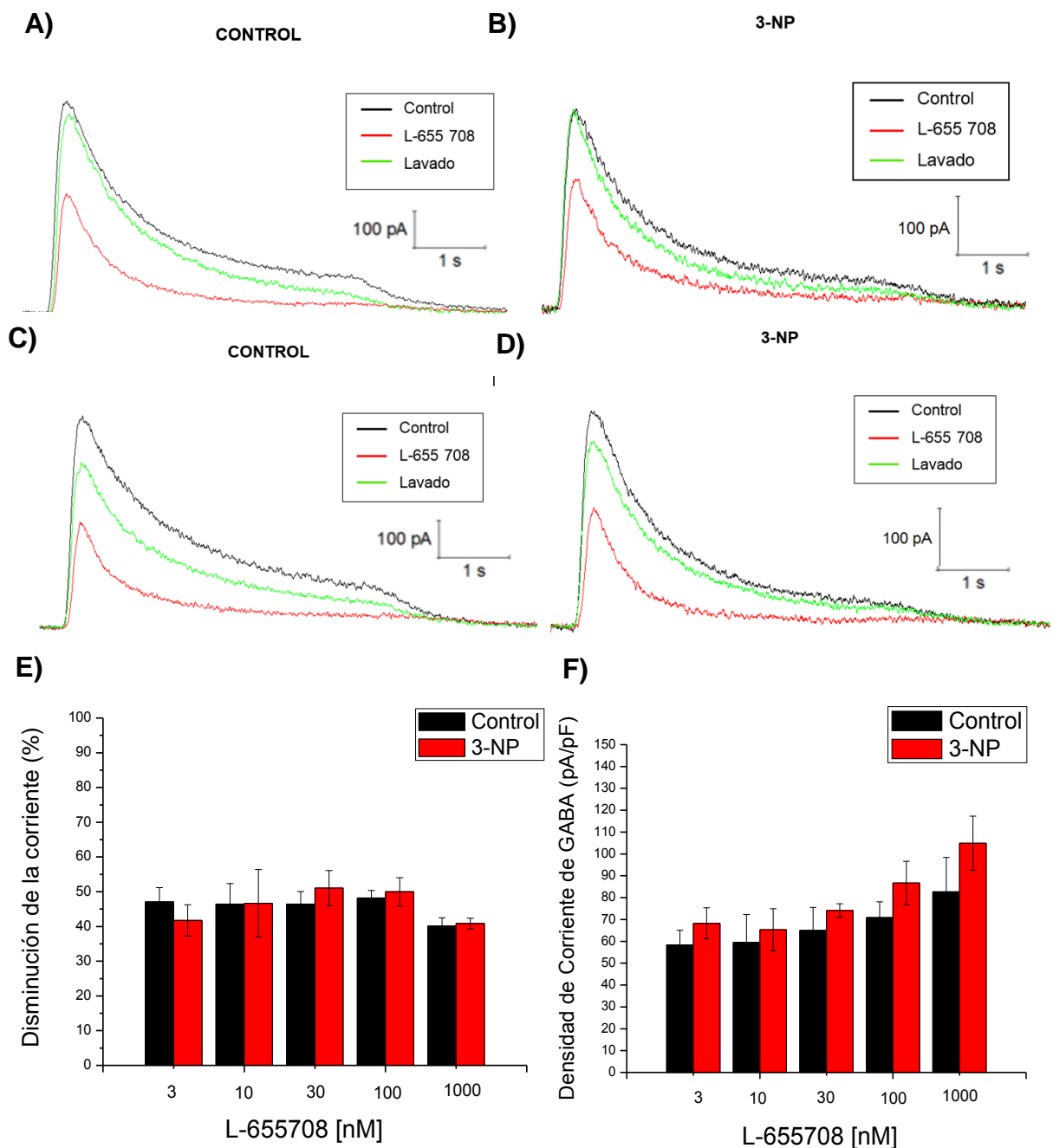
Gráfica 11. Protocolo de IV. **A)** Representación del registro de IV en una neurona del grupo control. Corriente generada por la aplicación de GABA $100\mu\text{M}$. Los voltajes a los cuales se generó la corriente van desde -100mV hasta $+20\text{mV}$ con cambios de voltaje de 20mV . Se observan las corrientes de sodio y calcio a los diferentes voltajes. **B)** Representación del registro de IV en una neurona del grupo tratado con 3-NP.



Gráfica 12. Representación de IV de I_{GABA} . Se graficó la corriente contra el voltaje generado por la aplicación de GABA 100 μ M; y se realizó un ajuste de tipo polinomial de tercer orden, para elucidar potencial de reversión **A)** En neuronas del grupo control (n=10) **B)** En neuronas de grupo tratado con 3-NP (n=10).

7.7 CINÉTICA DE LA CORRIENTE GENERADA POR GABA AL COAPLICAR ANTAGONISTAS ESPECÍFICOS A LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR.

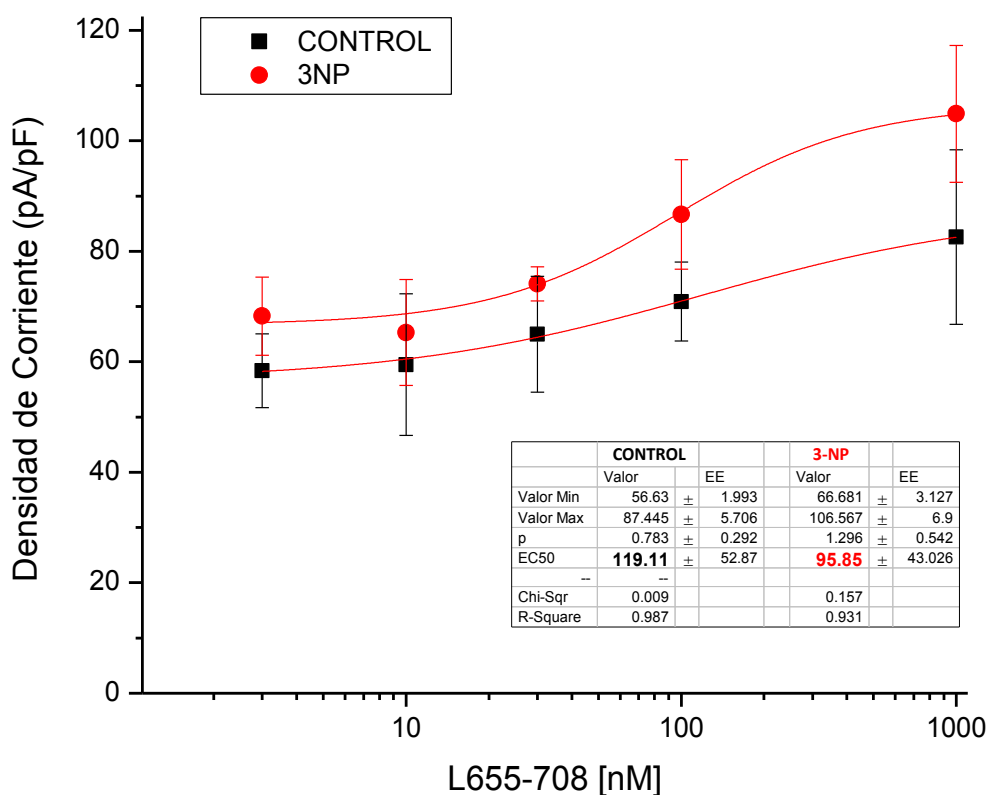
Se analizó el porcentaje de reducción de la corriente utilizando 3, 10, 30, 100, 1000 nM del antagonista de los receptores de GABA, L-655708, en las MSNs (Gráfica 13). Para generar la I_{GABA} se utilizó una concentración de 100 μ M de GABA, empleando el protocolo de aplicación de agonista + antagonista. Y de esta manera se obtuvo la gráfica de densidad de corriente con respecto a la concentración de GABA en presencia del antagonista. A continuación se muestran los trazos representativos del efecto del antagonista L-655708 sobre el receptor de GABA (Gráfica 13. A,B). No se encontraron cambios significativos en la densidad de corriente de GABA, ni en el porcentaje de reducción de la corriente al coaplicar el antagonista L-655708.



Grafica 13. A-D) Trazos representativos de la corriente generada por GABA utilizando el antagonista L-655708 a una concentración de 3 nM (n=10), 10 nM (n=10), 30 nM (n=10), 100 nM (n=11) y 1000 nM (n=11), en las MSN de ambas poblaciones, control y 3-NP. **E)** Gráfica de barras del porcentaje de reducción de la corriente de GABA con 3, 10, 30, 100, 1000 nM del antagonista L-655708 en las

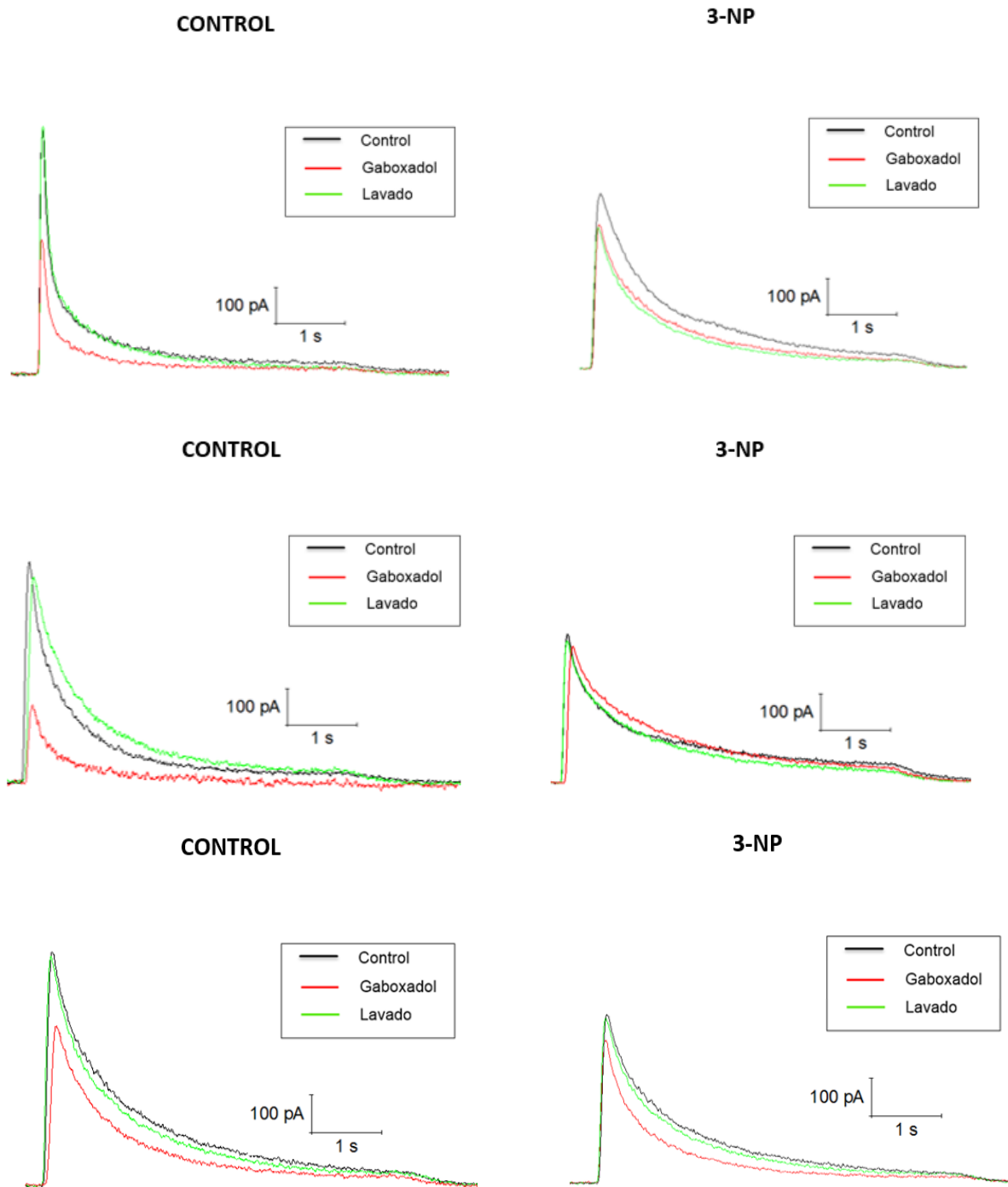
MSNs tanto en grupo control (n= 8) como en el tratado con 3-NP (n=7). **F)** Gráfica de densidad de corriente de GABA utilizando el L-655708.

Del registro de las MSNs se construyó una curva dosis-respuesta de la densidad de corriente de GABA en presencia de L-655708 y se obtuvo una EC50 de 119.11 ± 52.8 nM para el grupo control y una EC50 de 95.85 ± 43.02 μ M para el grupo tratado con 3-NP (Gráfica 14. C).



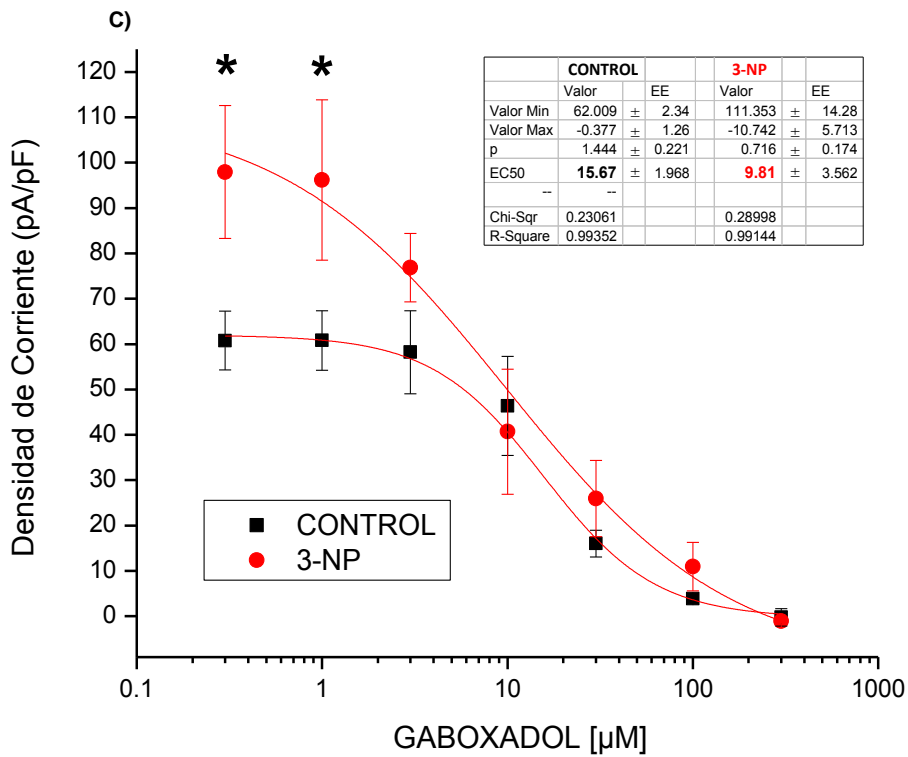
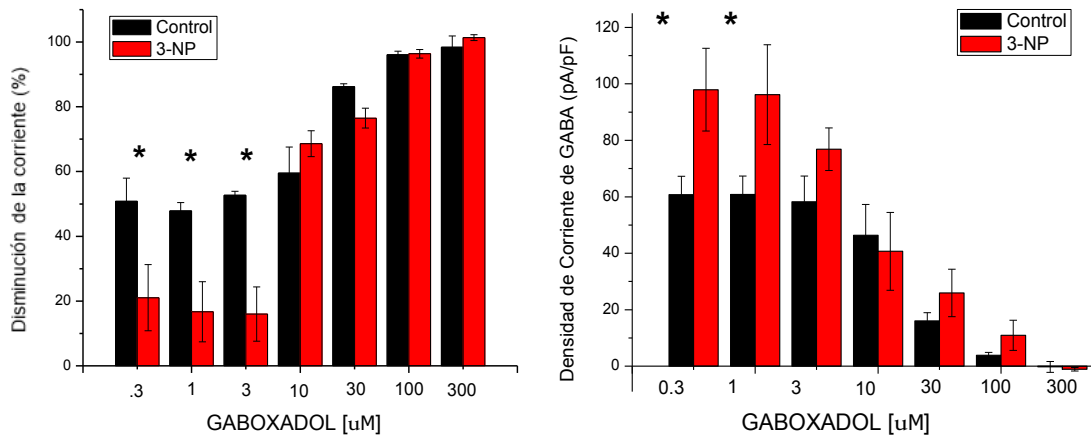
Gráfica 14. A) Gráfica Dosis-Respuesta de GABA con el L-655708 a 3 nM (n=10), 10 nM (n=10), 30 nM (n=10), 100 nM (n=11) y 1000 nM (n=11) en MSN.

A continuación se muestran los trazos representativos del efecto del antagonista Gaboxadol sobre el receptor de GABA (Gráfica 17).



Gráfica 13. Trazos representativos de la corriente de GABA (100 μ M), coaplicando Gaboxadol en ambos grupos experimentales.

Se analizó el porcentaje de reducción de la corriente utilizando 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM del antagonista Gaboxadol en las MSNs, se obtuvieron resultados significativos en las concentraciones de 0.3, 1 y 3 μM con una significancia de ($p=0.01$), ($p=0.009$), ($p=0.008$) respectivamente (Gráfica 18.A). Para generar la I_{GABA} se utilizó una concentración de 100 μM de GABA, empleando el protocolo de aplicación de agonista + antagonista. Y de esta manera se obtuvo la siguiente gráfica de densidad de corriente con respecto a la concentración de GABA en presencia del antagonista. Se observa un aumento en la densidad de corriente del grupo tratado con 3-NP con respecto al grupo control, en la concentración de 0.3 y 1 μM teniendo una significancia de ($p<0.05$) (Gráfica 18.B). Del registro de las MSNs se construyó una curva dosis-respuesta de la densidad de corriente de GABA en presencia del Gaboxadol y se obtuvo una EC_{50} de 15.67 μM para el grupo control y una EC_{50} de 11.48 μM para el grupo tratado con 3-NP (Gráfica 18.C).



Gráfica 18. A) Gráfica del porcentaje de disminución de la corriente a 0.3 μ M (n=7), 1 μ M (n=7), 3 μ M (n=7), 10 μ M (n=10), 30 μ M (n=10), 100 μ M (n=10), 300 μ M (n=10), en las neuronas medianas tanto en grupo control como en el tratado con 3-NP. **B)** Gráfica de densidad de corriente de GABA utilizando el Gaboxadol. **C)** Gráfica Dosis-Respuesta de GABA con el Gaboxadol a 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las neuronas registradas mediante la técnica de célula completa con fijación de voltaje se identificaron como neuronas medianas ó interneuronas gigantes del núcleo estriado (caudado y putamen), por su morfología, la capacitancia y su resistencia de entrada (Fig. 1, 2. Gráfica 1). Se observó que los valores de la capacitancia de las neuronas medianas en el grupo tratado con 3-NP, fueron de 3.5 a 5 pF, mientras que en el grupo control los valores de la capacitancia de las células registradas fue de 5 a 6.5 pF, por lo que se observa una tendencia a disminuir la capacitancia en las neuronas medianas del grupo tratado con 3-NP. Se ha observado que en las MSN de ratones tratados con 3-NP se reduce el número de espinas y el grosor de las dendritas, esto conlleva a una reducción en el área superficie (Mendoza y cols., 2014). La organización de las dendritas afecta la formación y la eficacia de las sinapsis así como la transmisión de señales de vuelta al soma, (Kulkarni y Firestein, 2012), aún no está claro cómo las MSN del cuerpo estriado, las neuronas más vulnerables en la EH, mantienen su función durante décadas a pesar de la expresión crónica de la huntingtina poliglutaminada (mhtt). En un estudio de Rocher y cols., (2016) quienes utilizaron ratones BACHD, un modelo de la EH que expresa el gen mhtt humana, para investigar las propiedades moleculares, morfológicas y funcionales de MSN en el cuerpo estriado, reportan que la densidad de espinas dendríticas en MSN es sustancialmente menor en los ratones BACHD que en los WT, en ausencia de cambios importantes en dendritas y sin pérdida neuronal. Detectaron también cambios funcionales en las MSN en BACHD, donde las MSNs eran hiperexcitables y la amplitud de las corrientes sinápticas fue mayor que en las MSN de los ratones WT. En conjunto, estos datos muestran que tanto las propiedades intrínsecas y la fuerza de las sinapsis se modifican en las MSN con baja densidad de espinas dendríticas en ratones BACHD. Estos mecanismos homeostáticos pueden compensar la pérdida sustancial de entradas sinápticas y por lo tanto aliviar los efectos perjudiciales de la expresión de mhtt sobre la actividad de los MSN y también posiblemente en el fenotipo motor en BACHD.

Nosotros al trabajar con células disociadas, no podemos evaluar dicha reducción, debido a que los registros se realizan en el soma de las neuronas. Por otro lado, en trabajos con ratones transgénicos (R6/2) las alteraciones en la membrana celular comienzan de la quinta a la séptima semana, se observa una reducción en la capacitancia pero no es estadísticamente significativa, en contraste las diferencias de la capacitancia en ratones R6/2 de 9-14 semanas se muestran altamente significantes en comparación al ratón WT (Cepeda y cols., 2004).

Las interneuronas gigantes no presentaron cambios debido al tratamiento con 3-NP, ni en su capacitancia ni en la cinética de la corriente de GABA. Se ha observado que las interneuronas estriatales tampoco presentan cambios en ratones transgénicos, resultando un fenómeno interesante a pesar de que estas comprenden menos del 1.0% de las neuronas estriatales (Ferrante y cols., 1985, 1987; Graveland y cols., 1985). La razón por la cual existe una mejor preservación de las poblaciones de interneuronas con relación a las neuronas espinosas de proyección en la EH es aún desconocida. Se ha propuesto que la muerte neuronal en la EH pudiera deberse, al menos en parte, a la reversión del transporte de calcio causada por un desacople metabólico. Así, el efecto diferencial de la enfermedad sobre las poblaciones neuronales podría resultar de la mayor o menor capacidad para amortiguar los cambios en el calcio intracelular. En apoyo a esta posibilidad, se ha mostrado que 1) las neuronas espinosas medianas poseen la proteína amortiguadora de calcio llamada calbindina, 2) algunos de los grupos de interneuronas menos afectadas poseen calretinina (Bennett y Bolam 1993) y/o paralbumina (Bennett y Bolam 1994), y 3) el contenido de calbindina en el estriado de pacientes con EH decrece significativamente. Es importante destacar, sin embargo, que algunas de las interneuronas GABAérgicas menos afectadas también expresan calbindina (Bennett y Bolam., 1993; Alexis y cols., 2000), por lo que la

expresión diferencial de proteínas de calcio quizá sea solamente una parte de la explicación de la susceptibilidad diferencial de las neuronas estriatales a la EH. Si bien una gran variedad de factores intrínsecos y extrínsecos regulan al proceso de muerte neuronal, la presencia o ausencia de factores neurotróficos juega un papel central en la modulación de este proceso. En fechas recientes, se ha descrito que los niveles del factor derivado del cerebro (BDNF) están disminuidos en el núcleo caudado de cerebros de animales transgénicos con expresión de la *htt*. Esta disminución en la disponibilidad de BDNF parece resultar de la incapacidad de la *htt* para regular la síntesis de este factor neurotrófico en el estriado y la corteza cerebral afectados. Así, se ha propuesto que la disminución relativa de BDNF en el estriado conduce a la muerte selectiva de las células espinosas medianas (Zuccato y cols., 2001). Esta disminución, sin embargo, no parece afectar la sobrevivencia de las interneuronas de manera significativa. De hecho, la sobre expresión de BDNF conduce a la muerte de algunas interneuronas estriatales (Gustafsson y cols., 2003). Este hecho sugiere que factores neurotróficos diferentes a BDNF, protegen a las interneuronas estriatales en cerebros de modelos animales y de pacientes con HD. En apoyo a esta posibilidad, diversos estudios han mostrado que la supervivencia neuronal depende no solo de un solo factor neurotrófico, sino de la disponibilidad de varios de ellos expresados simultánea o secuencialmente en patrones espacio-temporal específicos (McAllister y Katz, 1995; McAllister y Poo, 2001).

El ictus isquémico es un modelo particularmente interesante de la lesión cerebral debido a que causa la muerte selectiva de subpoblaciones neuronales en el cuerpo estriado. Las neuronas de proyección espinosa que contienen dopamina y de adenosina 3', 5'-monofosfato-regulada fosfoproteína de 32 kD (DARPP-32+) y las interneuronas no espinosas que contienen parvalbúmina-(PV+), mueren en la lesión isquémica, mientras que las interneuronas colinérgicas sobreviven (Teramoto y cols., 2003).

En nuestro trabajo determinamos la viabilidad celular mediante el protocolo de rampa (Gráfica 2), y para conocer el tiempo necesario de espera entre aplicaciones consecutivas se empleó el protocolo de recuperación, obteniéndose constantes de desensibilización (τ) similares para los dos grupos experimentales. Por lo tanto, en base a las τ obtenidas se determinó la duración del protocolo. Una vez establecida la duración de 90 segundos entre episodios, utilizamos el protocolo de aplicación del agonista.

Al normalizar los datos de los registros de la corriente de GABA, se obtuvo la densidad de corriente al pico (pA/pF) para las distintas concentraciones 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μ M, encontrando una disminución significativa de la densidad de corriente en neuronas del grupo tratado con 3-NP en las concentraciones de 0.1, 10, 30, 100, 300, 1000 μ M de GABA.

La falla en el metabolismo energético se ha sugerido como uno de los mecanismos más importantes que subyacen la degeneración neuronal. De hecho, las neuronas están expuestas a el daño oxidativo debido a su alto consumo de O^2 para generar el ATP necesario para mantener todas las funciones neuronales (Halliwell, 2001) El bloqueo de la fosforilación oxidativa puede producir el daño celular observado en tejidos post-mortem de pacientes afectados por la EH (Gu y cols, 1996).

Una de las consecuencias del daño mitocondrial que tiene lugar después de la isquemia cerebral es la pérdida adicional de ATP y de otros metabolitos energéticos. La disminución de los niveles de ATP está ligada al transporte en reverso del glutamato, disminución que, a su vez, provoca una elevación de este neurotransmisor excitador en el espacio extracelular. Por otro lado, diversos trabajos han demostrado que la acción neuroprotectora de los antioxidantes, al actuar sobre los complejos I-III de la cadena respiratoria mitocondrial, resulta en un incremento de la respiración y de la producción de ATP retrasando la disminución de ATP y el subsiguiente transporte en reverso de glutamato inducidos por la isquemia (Villalonga, 2008)

Está bien establecido que la isquemia cerebral transitoria en la rata conduce a un daño selectivo de ciertas poblaciones neuronales como en las MSN en el cuerpo estriado dorsolateral, similar a lo que ocurre en nuestro modelo donde el efecto específico de la toxina en las MSN es probablemente debido a una combinación de los factores en el ambiente celular local. El uso de 3-NP para estudiar la etiología de la enfermedad revela que la disfunción mitocondrial inducida por la toxina es seguido por la excitabilidad neuronal alterada y una disminución de la liberación de neurotransmisores (Lane y cols., 2015).

Existen pruebas de que los cambios en el sistema GABAérgico se producen después de los protocolos de lesión isquémica y otros (Domann y cols., 1993; Mittmann y cols., 1994; Schiene y cols., 1996; Neumann-Haefelin y cols., 1998). Durante la reorganización de los mapas retinotópicos después de una lesión isquémica, el contenido de GABA se reduce y a pesar de que la densidad de los receptores postsinápticos GABA_A α_1 aumenta, el receptor de GABA_A no puede ser saturado, resultando en la reducción de la inhibición GABAérgica (Cepeda y cols., 2004).

Del registro de las MSN se construyó una curva dosis-efecto y mediante el ajuste de una doble logística nos muestra que al menos tenemos dos poblaciones diferentes de receptores ya que muestran una afinidad y eficacia distinta a GABA. Del registro de las interneuronas gigantes, al ser un porcentaje menor al 0.5% de la población neuronal en el núcleo estriado (Wilson y cols., 1990), no se pudo determinar la EC50 debido a que no fue posible registrar interneuronas gigantes donde se alcanzaran concentraciones saturantes. En las MSN se observó un cambio en la EC50₁, la cual corresponde a la población de receptores con baja afinidad, por lo que confirmamos que se existen cambios en los receptores de GABA debido al tratamiento con 3-NP.

Recientes estudios *in vitro* mostraron que la función del receptor de GABA, puede verse afectada por factores que pueden ser relevantes en la isquemia cerebral, como el aumento de los niveles de calcio citosólico y la formación de radicales de oxígeno (Mouginot y cols., 1991; Schwartz y cols., 1.992). En cultivos neuronales, niveles normales de ATP parecen ser necesarios para mantener la función del receptor de GABA (Chen y cols., 1990).

Para comprender mejor los cambios observados en la corriente de GABA en ambos grupos, se procedió a estudiar la cinética de dicha corriente, analizando los siguientes parámetros: estado estacionario (SS) / pico de Corriente, el tiempo al pico y la constante de tiempo de desensibilización (τ).

En el análisis realizado al estado estacionario con respecto al pico de la corriente de GABA resultó ser diferente significativamente para las concentraciones de a 0.1, 0.3, 1 y 3 μM . Las subunidades del receptor de GABA, dictan la sensibilidad a GABA así como otras propiedades biofísicas del receptor. En los receptores GABA_A recombinantes, gran parte de la sensibilidad a GABA está influida por las subunidades alfa; subunidad α_6 tiene la mayor afinidad por GABA (Ducic y cols., 1995), una propiedad necesaria para los receptores en el espacio extrasináptico debido a los bajos niveles de GABA en el ambiente. Además, la incorporación de la subunidad δ aumenta la afinidad en los receptores GABA en expresión heteróloga en células de fibroblastos (Saxena y Macdonald, 1994; Fisher y Macdonald, 1997). La desactivación de los receptores y las tasas de desensibilización también dependen de la composición de subunidades. Receptores que contienen la subunidad α_1 tienen mayor tasa de desensibilización (Bianchi y cols., 2002), mientras que los receptores que contienen la subunidad γ_2 tiene una cinética más rápida que los receptores que contienen la subunidad delta (Haas y Macdonald, 1999), ideal para su papel en la inhibición sináptica. En comparación con los receptores que contienen γ_2 , los receptores $\alpha\beta\delta$ tienen una desensibilización más lenta y menos extensa (Haas y Macdonald, 1999; Bianchi y cols., 2001; Bianchi y

cols., 2002), por lo que sugerimos que los cambios en la cinética de la corriente de GABA en el grupo tratado pueden deberse al cambio en la expresión de subunidades del receptor GABA_A.

Como medida del tiempo de activación de la corriente de GABA no se encontraron cambios significativos a ninguna concentración. La desensibilización del receptor GABA_A ha demostrado ser multifásica, lo que sugiere que múltiples conformaciones son posibles (Celentano y Wong, 1994; Haas & Macdonald, 1999). Anteriormente se ha investigado la desensibilización, siguiendo los patrones de $\alpha\beta\delta$ y $\alpha\beta\gamma$ de los receptores GABA_A (Haas & Macdonald, 1999), se cree que constituyen la mayoría de isoformas del receptor GABA_A en el cerebro (McKernan y Whiting, 1996). Tanto la velocidad y grado de desensibilización depende de la composición de subunidades. Por ejemplo, los receptores $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ muestran una amplia desensibilización que fue descrito por una fase rápida (~ 10 ms), una fase intermedia (~ 150 ms) y una fase lenta (~ 1500 ms). En contraste, los receptores con las subunidades $\alpha_1\beta_3\delta$ se desensibilizan menos, con una sola fase lenta (~ 1500 ms) similar a la fase lenta de las corrientes de los receptores $\alpha_1\beta_3\gamma_2$. En nuestro modelo se identificaron 2 fases una lenta (τ_1) y una rápida (τ_2). Para la τ_1 no se encontró diferencia significativa entre los grupos (Gráfica 8). En cambio, en la τ_2 se mostró significativo en las concentraciones de 30, 100, 300, 1000 μ M (Gráfica 9), por lo que nuestros resultados nos muestran que podría existir el cambio en las subunidades del receptor de GABA, debido a que la constante de desensibilización en el grupo control es similar a la que presenta la isoforma $\alpha_1\beta_3\gamma_2$, a diferencia del grupo experimental tratado con 3-NP, en donde la τ_2 se vuelve más lenta en comparación al grupo control, similar a la isoforma con la subunidad δ ($\alpha_1\beta_3\delta$).

Al utilizar el protocolo de IV, pudimos determinar que el potencial de equilibrio en el grupo control es de 85.0 mV y en el grupo tratado con 3-NP es de 79.0 mV, el cual es cercano al potencial de equilibrio del ion cloro, debido a que las concentraciones intra y extracelulares de Cl⁻ no varían en nuestros experimentos.

En reportes que estudian la muerte celular debido a un exceso de la liberación de glutamato como lo que ocurre en la isquemia cerebral, se ha observado como consecuencia de esto, un aumento de la liberación compensatoria de GABA y la internalización de los receptores GABA_A sinápticos y la expresión de los receptores GABA_A perisinápticos produciendo un incremento en la inhibición tónica como un proceso limitado del cerebro para reparar el daño neural, provocado por la isquemia (Clarkson, 2011).

En nuestro trabajo proponemos que existen cambios en los receptores de GABA debido al tratamiento con el 3-NP. Y que dichos cambios pueden ser en las subunidades del receptor o en la cantidad de receptores GABA_A que se expresan en las MSN. El uso de los antagonistas Gaboxadol y L-655708 comprueban nuestra hipótesis. Permitieron describir que es la subunidad delta y no la alfa la encargada de los cambios observados en las cinéticas de las corrientes inducidas por GABA. El antagonista de la subunidad α_5 L-655708 no indujo cambios significativos en la densidad de corriente de cloro activada por GABA. Por lo que con los resultados obtenidos no puede demostrarse que exista algún cambio en la expresión de la subunidad α_5 del receptor GABA_A en ambas poblaciones, control y con el tratamiento con 3-NP. Ya que el L-655708 es un antagonista selectivo para el sitio de benzodiazepina de los receptores GABA_A que contienen la subunidad α_5 y el cual muestra selectividad 50-100 veces más que a receptores GABA_A que contienen α_1 , α_2 , α_3 y α_6 o subunidades en combinación con β_3 y γ_2 (Quirk y cols., 1996). Por otro lado, la presencia del Gaboxadol, el cual se une a los receptores GABA_A que contienen la subunidad δ y que compite por el mismo sitio de unión de GABA (Drasbek y Jensen, 2006), produjo cambios significativos tanto en la densidad de corriente de cloro, como en el porcentaje de reducción de la misma. La diferencia de los resultados con el gaboxadol y el L-655708 puede deberse a que a pesar de que ambos se unen a receptores extrasinápticos, se ha observado en estudios de inmunoprecipitación que las subunidades δ también pueden asociarse con la subunidad α_1 , y la subunidad α_1 también ha sido encontrada en receptores

65

extrasinápticos (Mertens y cols., 1993), es decir, no solo se expresa con la subunidad α_5

Con el uso del Gaboxadol solo se encontraron cambios en concentraciones bajas (0.3, 1, 3 μM), lo que concuerda con las concentraciones bajas que requieren los receptores extrasinápticos para activarse. Se ha reportado que los receptores GABA_A que contienen la subunidad δ se encuentran extrasinápticamente (Nusser y cols., 1998) y son, por tanto, interesantes en términos del volumen de la transmisión GABA_A extrasináptica. Estos receptores GABA también muestran una alta afinidad para GABA y son débilmente desensibilizados (Saxena y Macdonald, 1994). Por lo tanto, estos receptores reaccionan a baja concentración micromolar del ambiente de GABA , lo que conduce a una inhibición tónica de la conductancia en las neuronas postsinápticas (Drasbek y Jensen, 2006).

Nuestros resultados muestran un aumento en la densidad de I_{GABA} con 0.3 y 1 μM de Gaboxadol en la población de neuronas medianas de los ratones que recibieron el tratamiento con 3-NP. Por lo que también se encontraron resultados significativos en el porcentaje de reducción de la I_{GABA} en concentraciones de 0.3, 1, y 3 μM de Gaboxadol en la misma población, donde se observó que el porcentaje de reducción es menor que en la población control. Como se mencionó previamente el Gaboxadol compite por el mismo sitio de unión de GABA en el receptor, lo que podría estar ocurriendo al coaplicar GABA + Gaboxadol. A pesar de que el Gaboxadol se conoce como antagonista también se ha reportado que actúa como "super-agonista" al incrementar la inhibición, en experimentos realizados en líneas celulares L (-tk) que expresan $\alpha_4\beta_3\delta$, el Gaboxadol provocó una respuesta de amplitud más grande que GABA en los receptores $\alpha_4\beta_3\delta$, fue el primer informe de un agonista con mayor eficacia que GABA , aumentando la posibilidad de que el GABA se comporta como un agonista parcial en este subtipo (Brown y cols., 2002). Por lo que proponemos que podrían estar ocurriendo alguno de los siguientes dos fenómenos, el primero, que existe un aumento en este subtipo de receptor de GABA en las neuronas del

grupo experimental tratado con 3-NP, el segundo, que al unirse el Gaboxadol al sitio de unión en el receptor GABA_A provocaría cambios alostéricos en el receptor que producirían el aumento en la densidad de corriente de GABA observada en nuestros resultados.

Por otro lado, podríamos explicar los cambios en la densidad de I_{GABA}, comparando lo que sucede en ratones R6/2 donde se ha comprobado que en neuronas medianas existe un aumento en la expresión de receptores con la subunidad $\alpha 1$ (Cepeda, 2004). A pesar de que no es el mejor modelo para comparar con el de 3-NP el cual ilustra el papel de la mitocondria en la lesión de las MSN, puesto que el R6/2 solo expresa el exón 1 del gen, por lo que todas las regiones regulatorias no están presentes, los resultados coinciden con los cambios en las subunidades de receptor de GABA. Así como los efectos del bloqueo de la fosforilación oxidativa sobre la expresión y composición de las subunidades del receptor de GABA, se sabe que en procesos isquémicos hay un rearrreglo de las mismas donde se produce un déficit bioenergético similar a lo que sucede en nuestro modelo con 3-NP, también se presentan cambios en la expresión de las subunidades del receptor de GABA (Cepeda y col., 2004). Por otro lado, existen nuevos hallazgos observados sobre diversas subunidades del receptor GABA ($\alpha 1$, $\beta 2,3$ y $\gamma 2$) las cuales se encuentran sobrepresadas durante la EH y donde la regulación positiva es evidente antes de que haya pérdida de células notable (Allen y cols, 2009)

Lo que podría estar ocurriendo en nuestro modelo, sería un aumento en la expresión de receptores de GABA que contienen la subunidad δ lo que explicaría el aumento en la densidad de I_{GABA} y la disminución en el porcentaje de reducción de la misma en neuronas medianas de la población tratada con 3-NP.

La inhibición tónica o la señal continua de GABA establece la base de la inhibición. El GABA actúa a través de los receptores extrasinápticos tónicamente suprimiendo la excitabilidad neuronal y regulando el disparo del potencial de acción. Por lo tanto, con el propósito de facilitar la recuperación funcional, por ejemplo en enfermos de

isquemia se requiere un aumento en la excitabilidad cerebral para superar este hipofuncionalismo. Recientemente se ha demostrado mejoras notables en la recuperación funcional post-isquemia, al utilizar el antagonista L-655708 en pacientes después del accidente cerebrovascular, implicando a las subunidades $\alpha 5$ y δ , como nuevas dianas para el desarrollo de agentes para ayudar a los pacientes de ictus (Clarkson, 2011). De la misma manera podríamos proponer con nuestros resultados, a la subunidad δ como una diana para el desarrollo de próximos estudios en la enfermedad de Huntington.

Poco se sabe de la conducta a largo plazo y de la recuperación sináptica después de esta ola temprana de la patología inducida por el 3-NP. Existe evidencia en patologías donde se ve afectada la actividad sináptica pero sin pérdida de células, donde el comportamiento y la recuperación conductual está alineada con cambios adaptativos en la función sináptica, es decir, que la célula intenta contrarrestar los cambios provocados por la patología (Hasbani y cols., 2000). El daño isquémico a las sinapsis, sin pérdida neuronal, como ocurre con infartos leves o ataques al corazón, la recuperación de los daños en la sinapsis contribuye a la restauración de la función neurológica (Hasbani y cols., 2000). Siendo conscientes de que los daños centrales y periféricos debido a disfunciones metabólicas podría ayudar en el tratamiento clínico de las primeras etapas de la EH. Los tratamientos diseñados para mejorar el metabolismo energético podrían modificar el curso de la enfermedad y retrasar su progresión.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten concluir:

- El tratamiento con 3-NP induce cambios en la cinética de las corrientes activadas por GABA en las neuronas medianas y no en las neuronas gigantes del neocórtex.
- En el estudio de la dosis respuesta de GABA en las neuronas medianas mostró cambios multifásicos entre las neuronas controles y las tratadas con 3-NP.
- Al evaluar dos antagonistas específicos de los receptores de GABA, el L 655-708 que reconoce específicamente las subunidades α_5 y el gaboxadol que reconoce las subunidades δ , encontramos que el L 655-708 no muestra efectos significativos entre las dos poblaciones. El Gaboxadol mostró diferencias significativas, definiendo que el tratamiento produce modificaciones en la expresión de la subunidad δ que se pueden observar electrofisiológicamente.

Con nuestros resultados apoyamos la hipótesis propuesta.

Entre las perspectivas futuras se considera llevar a cabo pruebas de biología molecular para sustentar los cambios en las subunidades de los receptores de GABA y realizar más registros electrofisiológicos en neuronas gigantes para evaluar con más precisión la cinética de la corriente activada por GABA. Por otro lado, realizar pruebas conductuales que nos permitan verificar con lo ya reportado lo que sucede en nuestro modelo de la EH.

10.REFERENCIAS

Alberch J, Perez-Navarro E, Canals JM, 2004. Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prug. Brain Res.* 146: 195-229.

Albin RL, Young A, Penney JB, 1995. The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 18: 63–64.

Alexander GE, Crutcher MD, 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13: 266-271.

Alexi T, Hughes P E, Knusel B, Tobin A J, 1998. Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague–Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. *Exp Neurol* 153; 74–93.

Alston TA, Mela L, Bright HJ, 1977. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74; 3767–3771.

Ambrose , CM.; 1994. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 20: 27-38.

Auerbach W, Huribert MS, Hiklih-Maguire P, Wadghiri YZ, Wheeler VC, Cohen SI, Joyner AL, MacDonald ME. Turnbull DH, 2001. The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum.Mol.*10: 2515-2523.

Bar-Gad I, Hagai B, 2001. Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*, 11: 689-95.

Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT, 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13: 4181-4192.

Beal MF, Matson WR, Swartz KJ, Garnache PI-I, Bird ED, 1990. Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurcnic acid. *J. Neurochem.* 55: 1327-1339.

Berardelli A, Noth J, Thompson PD, Bollen EL, Curra A, Deuschl G, van Dijk JG, Topper R, Schwarz M, Roos RA, 1999. Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Mov Disord.* 14: 398-403.

Binawade Y, Jagtap A, 2013. Neuroprotective effect of lutein against 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like symptoms: possible behavioral, biochemical, and cellular alterations. *J Med Food.*(10):934-43

Blum, D.; Gall, D.; Cuvelier, L.; Schiffmann, S.N. Topological analysis of striatal lesions induced by 3-nitropropionic acid in the Lewis rat. *Neuroreport* 2001, 12, 1769–1772.

Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR. 3-nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 289-93

Borlongan CV, Nishino H, Sanberg PR, 1997a. Systemic but not intraparenquimal administration of 3- nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington`s disease: a speculative explanation. *Neurosci Res* 28; 185-189

Borlongan CV, Koutouzis TK, Freeman TB, Hauser RA, Cahill DW, Sanberg R, 1997b. Hyperactivity and hypo activity in a rat model of Huntington's Disease: The systemic 3- nitropropionic acid model. *Brain Res Protoc* 1; 253–257.

Bowery N.G, Bettler B, Froestl W, Gallagher J.P, Marshall F, Raiteri M, Bonner T.I, Enna S.J. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -Aminobutyric Acid B Receptors: Structure and Function. *Pharmacological Reviews* vol. 54 no. 2 247-264

Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P, 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals *Prog Neurobiol* 59; 427.

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, y Blum D, 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 95, 1521–1540

Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA, 2002. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha(4)\beta(3)\delta$ GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol*. 136:965--974.

Browne SE, Howling AC, MacGarvey U, Balk Mi, Bcrgvr SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF, 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurul*. 41: 646-653.

Cepeda C, Starling AJ, Wu N, Nguyen OK, Uzgil B, Soda T, Marjorie VMA, Levine MS, 2004. Increased GABAergic Function in Mouse Models of Huntington's Disease: Reversal by BDNF. *Journal of Neuroscience Research* 78:855–867.

Cepeda C, Cummings D M, and Andre V, Holley SM y Levine MS, 2010. Genetic mouse models of Huntington's disease: focus on electrophysiological mechanisms. *ASN NEURO* 2(2).

Chai J, 2000. Transcriptional dysregulation in Huntingtons disease. Trends Neurosci. 23: 387-392.

Chebib M, 2004. GABAC receptor ion channels. Clin Exp Pharmacol Physiol 31: 800–804.

DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel W, Carraiy R, Reeves SA., 1995. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. Neuron 14: 1075-1081.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel W, Aronin N, 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. Science 277: 1990-1993.

Drasbek KR and Jensen K, 2005. THIP, a Hypnotic and Antinociceptive Drug, Enhances an Extrasynaptic GABAA Receptor-mediated Conductance in Mouse Neocortex Cerebral Cortex August 2006;16:1134—1141.

Enna SJ, Möhler H, 2007. The GABA receptors. Third Edition. Humana Press Inc.

Enz R, Brandstatter JH, Hartveit E, Wassle H, Bormann J, 1995. Expression of GABA receptor rho 1 and rho 2 subunits in the retina and brain of the rat. Eur J Neurosci 7: 1495–501.

Ernst M, Stefan B, Stefan B, Werner S, 2005. Comparative Models of GABA_A receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. Molecular Pharmacology, 68:1291–1300.

Fan MM, Raymond LA, 2007. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. Prog.Neurubiol. XI: 272-293.

Ferrante Ri, Kowall NW, Bcal MF, Martin JB, Bird ED, Richardson EP, Jr., 1987. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46: 12-27.

Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert C, Jokel E, Fienberg A, Greengard P, Levine MS, 2002. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol.* 88: 3010-20.

Flores-Hernandez J, Hernandez J, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P y Surmeier DJ, 2000. D1 dopamine receptor activation reduces GABA (A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PPI signaling casacade. *J. Neurophysio.* 83: 2996-3004.

Galvan A, Wichmann T, 2007. GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders. *Prog. Brain Res.* 160: 287-3 12.

Gauthier LR, Charrin BC, Borrefl-Pages M, Dompierre J, Rangone H, Cordelieres FP, De Mi, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F, 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along micmtubulcs. *Cell* 118: 127-138.

Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M, 1985. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227: 770-773.

Guyot MC, Palfi S, Stutzmann JM, Maziere M, Hantraye P, Brouillet E, 1997. Riluzole protects from motor deficits and striatal degeneration produced by systemic 3-nitropropionic acid intoxication in rats. *Neurosci* 81; 141–149.

Haddad M.S. and Cummings L.S. (1997). "Huntington's disease." *Psychiatr Clin Nortl Am*, Dec;20(4):791-807.

Hasbani MJ, Underhill SM, de Erausquin GA, Goldberg MP, 2000. Synapse loss and regeneration: a mechanism for functional decline and recovery after cerebral ischemia? *The Neuroscientist* 6:110 –119.

HDRG, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72: 971-983.

Hernández-Echeagaray E, 2004. Avances sobre la Neurobiología de la Enfermedad de Huntington. En: *Temas Selectos de Neurociencias III*. Ed. Javier Velázquez Moctezuma, Editorial UAM. ISBN 970-31-0244-1 (pp. 33-41).

Hernández-Echeagaray E, González N, Ruelas A, Mendoza E, Rodríguez-Martínez E, Antuna-Bizarro R, 2011. Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. *Neurol Sci* 32; 241-54.

Hoogeveen, A. T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K. E., Roos, R. A., van Ommen, G. J., and Galjaard, H, 1993. "Characterization and localization of the Huntington disease gene product." *Hum. Mol. Genet.*, 2(12), 2069-2073.

Huntington G, 1872. On Chorea. *Medical and Surgical Reporter*. 26: 320-321.

Johnston GAR, 2005. GABA_A receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Design* 11: 1867-85.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC, 1990. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.* 3421– 38.

Kegel, K. B., Sapp, E., Yoder, J., Cuiffo, B., Sobin, L., Kim, Y. J., Qin, Z. H., Hayden, M. R., Aronin, N., Scott, D. L., Isenberg, G., Goldmann, W. H., and DiFiglia, M. 2005. "Huntingtin associates with acidic phospholipids at the plasma membrane." *J. Biol. Chem.*, 280(43), 36464-36473

Klapstein, G. J., Fisher, R. S., Zanjani, H., Cepeda, C., Jokel, E. S., Chesselet, M. F., 2001. Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurophysiol.* 86, 2667–2677.

Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW, Konnerth A. Postsynaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation. *Science* 2002; 295: 1729-34.

Kreitzer AC, Malenka RC, 2008. Striatal Plasticity and basal ganglia circuit function. *Cell press. Neuron* 60: 543-54.

Kumar P, Kalonia H, Kumar A, 2012. Possible GABAergic mechanism in the neuroprotective effect of gabapentin and lamotrigine against 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 674(2-3):265-74. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.11.030. Epub 2011 Nov 28.

Leavitt, B. R., Van Raamsdonk, J. M., Shehadeh, J., Fernandes, H., Murphy, Z., Graham, R. K., Wellington, C. L., Raymond, L. A., and Hayden, M. R., 2006. "Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity." *J. Neurochem.*, 96(4), 1121-1129

Lerner TN, Kreitzer AC, 2011. Neuromodulatory control of striatal plasticity and behavior, *Curr Opin Neurobiol*, 21:1-6

Li SH, Schilling G, Young WS, III, Li Xi, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG, 1993. Huntington's disease gene (ff15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11: 985-993.

Liu H-G, Ma Y, Meng D-W, Yang A-C, Zhang J-g, 2013. A Rat Model of Hemidystonia Induced by 3-Nitropropionic Acid . *PLoS ONE* 8(10)

Lovestone, S., Hodgson, S., Sham, P., Differ, A. M., and Levy, R. (1996). "Familial psychiatric presentation of Huntington's disease." *J. Med. Genet.*, 33(2), 128-131.

Ludolph, A.C.; He, F.; Spencer, P.S.; Hammerstad, J.; Sabri, M, 1991. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* 18, 492–498.

Martinez-Delgado G, Estrada-Mondragon A, Miledi R, Martinez-Torres A, 2010. An Update on GABA_A Receptors. *Curr Neuropharmacol* 8: 422–433.

Mehrotra A, Sandhir R 2014. Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: Behavioral, biochemical and histological evaluation. *Behavioural Brain Research*.

Mertens S, Benke D, Mohler H, 1993. GABA_A receptor populations with novel subunit combinations and drug binding profiles identified in brain by $\alpha 5$ - and δ -subunit-specific immunopurification. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 8, pp. 5965–5973.

Miller R, 2008. The theory of the basal ganglia and their disorders. *Conceptual advances in Brain Research*. CRC Press Taylor & Francis Group. pp 3-8; 13-18.

Naarding P, Kremer H P, and Zitman F G, 2001. Huntington's disease: a review of the literature on prevalence and treatment of neuropsychiatric phenomena Eur. Psychiatry, 16(8), 439-445.

Nakano K, Kayahara T, Tsutsumi T, Ushiro H, 2000. Neural circuits and functional organization of the striatum. J. Neurol. 247 Suppl 5: VI-15.

Novelli A, Reilly JA, Lysko PG et al, 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. Brain Res 451:205–212

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P et al, 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. Nature 307:462–465

Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P, 1998. Segregation of different GABA(A) receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. J Neurosci 18:1693--1703.

Olsen RW, Sieghart W, 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update Pharmacol Rev 60: 243-60.

Pang, Z.; Geddes, J.W., 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: Acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. J. Neurosci., 17,3064–3073.

Purves D, 2007. Neuroscience third edition. Editorial Sinauer Associates. pp. 426-427.

Quirk K, Blurton P, Fletcher S, Leeson P, Tang F, Mellilo D, Ragan CI, McKernan RM, 1996. [3H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the alpha 5 subunit. *Neuropharmacology*. 1996;35 (9-10):1331-5.

Ramalingam V, Mei-Hong Q, Chang C, Lu J, 2010. Role of basal ganglia in sleep-wake regulation: neural circuitry and clinical significance. *Frontiers in Neuroanatomy*. Vol. 4, 145:1-10.

Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., and Cattaneo, E, 2001. "Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing." *J. Biol. Chem.*, 276(18), 14545-14548

Rocher AB, Gubellini P, Merienne N, Boussicault L, Petit F, Gipchtein P, Jan C, Hantraye P, Brouillet E, Bonvento G, 2016. Synaptic scaling up in medium spiny neurons of aged BACHD mice: A slow-progression model of Huntington's disease. *Vol 86, Pages 131–139.*

Rodríguez E, Rivera I, Astroga S, Medoza E, García F, Hernández-Echeagaray E, 2010. Uncoupling Oxidative/Energy Metabolism with Low sub Chronic Doses of 3-Nitropropionic acid or Iodoacetate in vivo Produces Striatal Cell Damage. *Int J Biol Sci* 6; 199-212.

Rosas-Arellano A, Machuca-Parra AI, Reyes-Haro D, Miledi R, Martinez- Torres A, 2012. Expression of GABA ρ receptors in the neostriatum: localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells. *J Neurochem* 122: 900–910.

Rosenblatt, A. and Leroi, I. (2000). Neuropsychiatry of Huntington's disease and other basal ganglia disorders. *Psychosomatics*, 41 (1), 24-30.

Santhakumar V, Jones RT, Mody I. Developmental regulation and neuroprotective effects of striatal tonic gabaa currents *Neuroscience*. 2010 May 19; 167(3): 644–655. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.048

Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P. G., Young, A. B., Penney, J., Vonsattel, J. P., Aronin, N., and DiFiglia, M, 1997. "Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients." *Ann. Neurol.*, 42(4), 604-612.

Saxena NC, Macdonald RL, 1994. Assembly of GABA(A) receptor subunits: role of the delta subunit. *J Neurosci* 14:7077--7086.

Schulz JB, Henshaw DR, MacGarvey U, Beal MF, 1996. Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem Int* 29; 167–171.

Sharp, A. H., Loev, S. J., Schilling, G., Li, S. H., Li, X. J., Bao, J., Wagster, M. V., Kotzuk, J.A., Steiner, J. P., Lo, A., and 1995. "Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product." *Neuron*, 14(5), 1065-1074.

Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li Xi, 2005. Expression of mutant huntingtin in guai cells contril,utes to neuronal excitotoxicity. *J. Cell Blot.* 171: 1001-1012.

Siegel GJ, 2006. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Seven edition. Elsevier Academic Press. 291-300.

Sieradzan K. A. y Mann D. M. A. 2001. The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 27.

Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ, 1993. Relationship between trinucleotide

repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4: 393-397

Sumathi T, Asha D, Suganya SN, Prasanna K, Mohanan Sandhya K. 2013. Neuroprotective activity of L- theanine on 3- nitropropionic acid induced neurotoxicity in rat striatum. *nt J Neurosci.* The huntington's disease collaborative research group, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* 72: 971-83.

Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Dcys D, Cancel G, Saudou F, Wthcr C, David G, Tora L, 1995. Polyglutaminc expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 378: 403-406.

van Vugt JP, Siesling S, Piet KK, Zwinderman AH, Middelkoop HA, van Hilten JJ, Roos RA, 2001. Quantitative assessment of daytime motor activity provides a responsive measure of functional decline in patients with Huntington's disease. *Mov Disord.* 16: 481-488.

Vonsattel JP, Nyers RH, Stevens Ti, Ferrunte Ri, Bird ED, Richardson EP, Jr., 1995. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44: 559-577.

Walker FO, 2007. Huntington's disease. *Lancet* 369: 218-228.

Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Traver s H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F, Ramos Arroyo MA, 1987. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326: 194-197.

Wilson CJ, Chang HT y Kitai, ST, 1990. Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum, *J. Neurosci.* 10: 508-519.

