

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA,
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL**

FACULTAD DE FARMACIA

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES
EN DISTINTOS MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

INMACULADA RITE ZAMBRANO

TESIS DOCTORAL, 2004

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada “**Regulación de la expresión de BDNF en los ganglios basales en distintos modelos de la enfermedad de Huntington**”, presentada por la Lda. Inmaculada Rite Zambrano para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla a 3 de septiembre de 2004.

Fdo: Alberto Machado de la Quintana.

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA Y JOSÉ LUÍS VENERO RECIO, CATEDRÁTICO Y TITULAR UNIVERSITARIO, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada “**Regulación de la expresión de BDNF en los ganglios basales en distintos modelos de la enfermedad de Huntington**”, presentada por la Lda. Inmaculada Rite Zambrano para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección y reuniendo los requisitos exigidos, dando conformidad a su presentación.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Sevilla a 3 de septiembre de 2003.

Fdo: Alberto Machado de la Quintana.

Fdo: José Luís Venero Recio.

BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
Cx	Corteza
DA	Dopamina
DCG-IV	2S:2'R:3'R:-2-(2'3'-dicarboxiciclopropil)glicina
Dig-UTP	UTP unido a digoxigenina
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
Est	Estriado
FNTs	Factores neurotróficos
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GB	Ganglios basales
Glu	Glutamato
GP	Globo pálido
HPM	Haz prosencefálico medial
Htt	Huntingtina
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
KA	Ácido kaínico
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
NMDA	N-metil-D-aspartato
NST	Núcleo subtalámico
NTs	Neurotrofinas
QA	Ácido quinolínico
SN	Substantia nigra
SNPC	Substantia nigra pars compacta
SNC	Sistema nervioso central
SNPR	Substantia nigra pars reticulata
TH	Tirosina hidroxilasa
TrkB	Receptor tropomiosintirosinquinasa de BDNF

A mis padres

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. GANGLIOS BASALES

1.A. DESCRIPCIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES

1.B. NEUROQUÍMICA DEL ESTRIADO

1.C. NEUROQUÍMICA DE LA SUBSTANTIA NIGRA

1.D. CIRCUITOS DEL SISTEMA DE LOS GANGLIOS BASALES

1.D.1. Vía directa

1.D.2. Vía indirecta

1.D.3. Papel modulador de la substantia nigra en la regulación de las vías directa e indirecta

2. DEGENERACIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES: ENFERMEDADES DE HUNTINGTON Y PARKINSON

2.B. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

2.B.1. Descripción de la enfermedad de Huntington

2.B.2. Patología de la enfermedad de Huntington

2.B.3. Modelos animales de la enfermedad de Huntington

2.A. ENFERMEDAD DE PARKINSON

2.A.1. Descripción de la enfermedad de Parkinson

2.A.1. Patología de la enfermedad de Parkinson

2.A.3. Modelos animales de la enfermedad de Parkinson

3. MUERTE NEURONAL POR EXCITOTOXICIDAD

3.A. RECEPTORES DE GLUTAMATO

3.A.1. Receptores ionotrópicos

3.A.2. Receptores metabotrópicos (mGluR)

3.B. MECANISMOS DE LA MUERTE NEURONAL POR EXCITOTOXICIDAD

4. FACTORES NEUROTRÓFICOS

4.A. FUNCIONES DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS

4.B. CLASIFICACIÓN DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS

4.C. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF)

- 4.C.1. Distribución de BDNF en el Sistema Nervioso Central.
- 4.C.2. Receptores de BDNF
- 4.C.3. Transporte de BDNF
- 4.C.4. Regulación de la expresión de BDNF en el SNC
 - 4.C.4.1. *Regulación de la expresión de BDNF en patologías de los ganglios basales*
- 4.C.5. Funciones de BDNF
- 4.C.6. Neuroprotección con BDNF en modelos de neurodegeneración
 - 4.C.6. *Neuroprotección con BDNF en modelos de neurodegeneración de los ganglios basales*

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

2. REACTIVOS

3. OPERACIONES.

- 3.1. Lesión excitotóxica del estriado
- 3.2. Bloqueo del transporte en la vía nigroestriada
- 3.3. Lesión excitotóxica de la substantia nigra pars reticulata

4. HIBRIDACIÓN *IN SITU* ISOTÓPICA

- 4.1. Obtención de la ribsonda
- 4.2. Reacción de hibridación
- 4.3. Detección y cuantificación de la señal de hibridación en la película de autorradiografía
- 4.4. Emulsión autorradiográfica
- 4.5. Cuantificación de la señal de hibridación *in situ* tras el tratamiento con la emulsión autorradiográfica

5. HIBRIDACIÓN *IN SITU* ISOTÓPICA Y NO ISOTÓPICA COMBINADAS

- 5.1. Obtención de la ribsonda
- 5.2. Reacción de hibridación
- 5.3. Revelado de la sonda no isotópica

5.4. Cuantificación de la señal en la técnica de doble hibridación *in situ*

6. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE DE LAS SECCIONES

7. ESTADÍSTICA

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO CON ACIDO KAINICO (KA) O ACIDO QUINOLINICO (QA) EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LA SUBSTANTIA NIGRA (SN) Y LA CORTEZA

1.A. EXTENSIÓN DE LA LESIÓN PROVOCADA EN EL ESTRIADO POR LA INYECCIÓN DE KA O QA

1.B. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA PROVOCADA EN EL ESTRIADO CON KA O QA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LA SN

1.B.1. Las células donde encontramos ARNm de BDNF en la SN son neuronas dopaminérgicas

1.C. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA PROVOCADA EN EL ESTRIADO CON KA O QA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LA CORTEZA

2. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO CON KA O QA NO ALTERA LOS NIVELES DE ARNm DE *trkB* NI EN LA CORTEZA NI EN LA SN

3. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD NEURONAL EN LA SN Y LA CORTEZA TRAS LA INYECCIÓN EN ESTRIADO DE KA O QA

3.1. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD NEURONAL EN LA SN TRAS LA INYECCIÓN EN ESTRIADO DE KA O QA

3.2. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD NEURONAL EN LA CORTEZA TRAS LA INYECCIÓN EN ESTRIADO DE KA O QA

4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN EL NÚCLEO SUBTALÁMICO (NST) TRAS LA INYECCIÓN DE KA O QA EN EL ESTRIADO

4.1. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO CON KA O QA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN EL NST

4.2. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO CON KA O QA AUMENTA LA ACTIVIDAD NEURONAL EN EL NST

5. EFECTO DEL BLOQUEO DEL TRANSPORTE AXONAL EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES Y LA CORTEZA

5.1. EFECTO DEL BLOQUEO DEL TRANSPORTE EN EL HAZ PROSENCEFÁLICO MEDIAL EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF

5.2. EFECTO DEL BLOQUEO DEL TRANSPORTE EN EL HAZ PROSENCEFÁLICO MEDIAL EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE CFOS

6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES Y LA CORTEZA TRAS LA INYECCIÓN EN ESTRIADO DE DCG-IV: COMPARACIÓN CON LA INYECCIÓN DE QA

6.A. EXTENSIÓN DE LA LESIÓN PROVOCADA EN EL ESTRIADO POR LA INYECCIÓN DE DCG-IV

6.B. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA PROVOCADA EN EL ESTRIADO CON DCG-IV AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LA SN PARS COMPACTA (SNPC) Y EN LA CORTEZA

6.C. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO CON DCG-IV NO ALTERA LOS NIVELES DE ARNm DE *trkB* NI EN LA CORTEZA NI EN LA SN

6.D. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD NEURONAL EN LA SN Y EN LA CORTEZA TRAS LA INYECCIÓN EN ESTRIADO DE DCG-IV

6.D.1. El aumento de la expresión de ARNm de BDNF en la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado es dependiente de un aumento de actividad neuronal

6.E. EFECTO DE LA INYECCIÓN EN EL ESTRIADO DE DCG-IV EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF Y DE CFOS EN EL NST

7. EFECTO DE LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DE LA SN PARS RETICULATA (SNPR) EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES

7.A. ESTUDIO DE LA LESIÓN PROVOCADA EN LA SNPR POR LA INYECCIÓN DE NMDA

7.B. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN EL NST Y OTROS NÚCLEOS DE LOS GANGLIOS BASALES TRAS LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DE LA SNPR

7.C. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE CFOS EN EL NST Y EN EL ESTRIADO TRAS LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DE LA SNPR

DISCUSION

1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LA SNPC TRAS LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO

2. SENTIDO BIOLÓGICO DEL AUMENTO DE EXPRESIÓN DE BDNF EN LA SNPC TRAS LA LESIÓN DEL ESTRIADO

3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LA CORTEZA TRAS LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO

4. EFECTO DE LA INTERRUPCIÓN DEL TRANSPORTE ENTRE EL ESTRIADO Y LA SN EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BDNF

5. ¿CUÁL EXCITOTOXINA, KA O QA, ES MEJOR HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE BDNF?

6. DCG-IV COMO MODELO PARA ESTUDIAR LA EXPRESIÓN DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES

7. EXPRESIÓN DE BDNF EN EL ESTRIADO TRAS LA LESIÓN EXCITOTÓXICA

8. EXPRESIÓN DE ARNm DE *trkB* EN LOS GANGLIOS BASALES TRAS LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO

9. AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE BDNF Y DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN EL NST

10. LA PÉRDIDA DE TEJIDO DLANA NO SIEMPRE AUMENTA LA EXPRESIÓN DE BDNF: LESIÓN EXCITOTÓXICA DE LA SNPR

11. POSIBLE APLICACIÓN CLÍNICA

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCIÓN

1. GANGLIOS BASALES

1.A. DESCRIPCIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales del cerebro de vertebrados implicados en el control del movimiento.

Dentro de los ganglios basales se incluyen los siguientes centros: el núcleo caudado, el putamen, el segmento externo del globo pálido (GPe), el segmento interno del globo pálido (GPi), el núcleo subtalámico (NST) y la substantia nigra (SN). La SN se divide en dos zonas: la parte compacta (SNPC), formada por neuronas ricas en neuromelanina, y la parte reticulada (SNPR). El caudado y el putamen provienen de la misma estructura por lo que están constituidos por el mismo tipo de células, fusionándose además por la parte anterior; al conjunto se le conoce como cuerpo estriado (Est), nombre que se le da también en la rata, una especie anatómicamente menos diferenciada, donde ambas estructuras constituyen un núcleo único. También en la rata, que es la especie usada en esta tesis, el GPi se denomina núcleo entopeduncular (NEP).

La proyección más importante que reciben los ganglios basales es la aferencia excitatoria que llega de la corteza cerebral al estriado, que clásicamente se ha considerado el núcleo de entrada de información dentro del conjunto de los GB. Desde el estriado la información fluye por las llamadas vía indirecta y vía directa hasta llegar a los núcleos de salida de información de los GB, que son el GPi y la SNPR, y cuyas aferencias se dirigen, a través del tálamo, de vuelta a la corteza. Al contrario que la mayoría de los componentes del sistema motor, los GB no reciben ni envían ninguna conexión directa a la médula espinal. Por tanto, los GB, junto con el cerebelo, constituyen el más importante bucle subcortical del sistema motor.

Los ganglios basales están implicados en aspectos cognitivos y de orden superior del control motor. Además, debido a las extensas conexiones con la corteza asociativa y estructuras límbicas, los ganglios basales participan en aspectos no relacionados con el movimiento, como las funciones afectiva y cognitiva.

Numerosos autores han revisado la anatomía y el funcionamiento de los GB, entre otros, Albin y col. (1989); Alexander y Crutcher (1990); DeLong (1990); Parent (1990); Smith y Bolam (1990); Gerfen (1992a, b); Graybiel y col. (1994); Parent y Hazrati (1995); Chesselet y Delfs (1996); Levy y col. (1997); Bergman y col. (1998); Smith y col. (1998). La primera parte de la introducción de esta tesis está basada en estos trabajos.

1.B. NEUROQUÍMICA DEL ESTRIADO

A nivel neuroquímico, el estriado está formado por neuronas de proyección e interneuronas.

La gran mayoría de las neuronas del estriado (90-95%) son las denominadas neuronas espinosas de proyección de tamaño medio cuyo neurotransmisor es el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Dentro de estas neuronas GABAérgicas de proyección se distinguen varias subpoblaciones. La subpoblación que proyecta sus axones sobre el GPi y la SNPR (responsable de la llamada vía directa de flujo de información a través de los GB) utiliza como neurotransmisor sustancia P. La subpoblación que proyecta sus axones sobre el GPe (responsable de la vía indirecta) utiliza como neurotransmisor encefalina. Además, la mayoría de estas dos subpoblaciones de neuronas contienen la proteína fijadora de calcio calbindina (Gerfen y col., 1985; DiFiglia y col., 1989; Bennett y Bolam, 1993). Existe otra pequeña subpoblación de neuronas de proyección, con sustancia P como neurotransmisor, cuya estructura diana es la SNPC (Tabla 1).

En cuanto a las interneuronas que forman parte del estriado, podemos distinguir cinco subpoblaciones, siendo todas ellas de fenotipo GABAérgico excepto una, que es de fenotipo colinérgico. La subpoblación colinérgica está formada por neuronas no espinosas de tamaño grande que no contienen proteínas fijadoras de calcio.

Las interneuronas GABAérgicas son no espinosas y de tamaño medio, con subpoblaciones que contienen o NADPH diaforasa (NADPHd) (utilizada como marcador de la óxido nítrico sintasa, NOS), o una de las proteínas fijadoras de calcio parvalbúmina o calretinina, conteniendo el resto de interneuronas sólo GABA (ver revisión de Kawaguchi y col., 1995).

Esta subdivisión entre las subpoblaciones no es tan absoluta, ya que un pequeño número de neuronas de cada subpoblación puede no contener todos los marcadores fenotípicos de esa subpoblación, o puede contener un marcador adicional.

Tabla 1. Clasificación de neuronas del estriado^a

Tipo de neurona	Tejido diana	Neurotransmisor	Fenotipo
Neuronas de proyección			
Espinosas de tamaño medio	GPe	GABA	Encefalina, calbindina ^b
Espinosas de tamaño medio	GPI/SNPR	GABA	Sustancia P, calbindina ^b
Espinosas de tamaño medio	SNPC	GABA	Sustancia P
Interneuronas			
No espinosas de gran tamaño	-----	ACh	-----
No espinosas de tamaño medio	-----	GABA	-----
No espinosas de tamaño medio	-----	GABA	NADPHd, NOS, somatostatina, neuropéptido Y, (calbindina) ^c
No espinosas de tamaño medio	-----	GABA	Parvalbúmina
No espinosas pequeñas	-----	GABA	Calretinina

^aTabla resumen de los principales fenotipos neuronales del estriado. Las subpoblaciones no necesariamente se excluyen entre sí, pero a no ser que se indique de otra manera, la mayoría de las células de cada grupo expresa los fenotipos mencionados. Los paréntesis indican subpoblaciones pequeñas.

^bAproximadamente el 75% de estas neuronas contienen calbindina.

^cAproximadamente el 20% de las neuronas que contienen NADPHd contienen también calbindina.

Ach: acetilcolina; GABA: ácido gamma-aminobutírico; GPe y GPI: segmento externo e interno del globo pálido; NADPHd: NADPH diaforasa; NOS: óxido nítrico sintasa; SNPC: substantia nigra pars compacta; SNPR: substantia nigra pars reticulata.

1.C. NEUROQUÍMICA DE LA SUBSTANTIA NIGRA

La substantia nigra se divide fundamentalmente en substantia nigra pars compacta y substantia nigra pars reticulata.

La SNPC está formada principalmente por neuronas de proyección dopaminérgicas. Dentro de la zona que ocupa la SNPR también pueden encontrarse algunas neuronas dopaminérgicas, pero se consideran neuronas de la SNPC desplazadas ventralmente (Faull y Mehler, 1978; Beckstead y col., 1979; Deutch y col., 1986). La mayor parte de las neuronas dopaminérgicas de la SNPC también contienen el neuropéptido colescistoquinina (CCK) (Fallon y col., 1983; Fallon y Seroogy, 1985; Seroogy y col., 1989) (Ver tabla 2).

La principal eferencia de la SNPC se dirige al estriado a lo largo de la parte lateral del haz prosencefálico medial (HPM), aunque también hay proyecciones desde la SNPC a la corteza, a la amígdala y al núcleo accumbens (Fallon, 1981; Loughlin y Fallon, 1983, 1984).

Las neuronas de la SNPR son principalmente GABAérgicas (Oertel y col., 1982) y muchas de ellas contienen también la proteína fijadora de calcio parvalbúmina (Gerfen y col., 1985; Celio, 1990; Hontanilla y col., 1997; McRitchie y col., 1998). Las principales áreas de proyección de la SNPR son el tálamo, el tegmento y el tectum (Faull y Mehler, 1978; Beckstead y col., 1979). La SNPR recibe su principal aferencia desde el estriado, formándose por tanto un bucle cerrado entre la SN y el estriado, ya que las neuronas de la SNPC proyectan sobre el estriado, y a su vez las neuronas del estriado mandan sus aferencias a la SNPR (Szabo, 1962).

En toda la SN (tanto en la SNPC como en la SNPR) existe una pequeña población de neuronas cuyo neurotransmisor es desconocido que proyectan sobre el estriado (van der Kooy y col., 1981; Fallon y Loughlin; 1985).

Tabla 2. Clasificación de las neuronas de la SN^a

Tipo de neurona	Tejido diana	Neurotransmisor	Fenotipo
Neuronas de proyección			
SNPC	CPu, Corteza, AMI, NAc	DA	CCQ, calretinina, (calbindina)
SNPC, SNPR	CPu	No DA ^b	?
SNPR	Tal, Teg, Tecto	GABA	(Parvalbúmina)
SNPR	CPu	DA ^c	Calretinina
Interneuronas			
SNPC	-----	No DA ^b	?

^aTabla resumen de los principales fenotipos neuronales de la sustantia nigra. Las subpoblaciones no necesariamente se excluyen entre sí, pero a no ser que se indique de otra manera, la mayoría de las células de cada grupo expresa los fenotipos mencionados. Los paréntesis indican subpoblaciones pequeñas.

^bNeurotransmisor desconocido.

^cUn pequeño número de neuronas dopaminérgicas se encuentran desplazadas ventralmente en la SNPR.

AMI: amígdala; CCQ: colescistoquinina; CPu: caudado-putamen; DA: dopamina; GABA: ácido gamma-aminobutírico; NAc: núcleo accumbens; SNPC: sustantia nigra pars compacta; SNPR: sustantia nigra pars reticulata; Tal: tálamo; Teg: tegmento.

1.D. CIRCUITOS DEL SISTEMA DE LOS GANGLIOS BASALES

En el apartado 1.B hemos descrito que en el estriado existen dos subpoblaciones que alcanzan la SNPR y el GPi (los núcleos de salida de información de los GB) a través de vías diferentes. Se distingue, por un lado, la población neuronal que proyecta directamente a la SNPR (en menor medida a la SNPC) y al segmento interno del globo pálido (vía estriadonigral), y por otro, la que alcanza a la SNPR mediante conexiones polisinápticas (vía estriadopalidal), proyectando primero al segmento externo del globo pálido (Gerfen y Young, 1988; Gerfen y col., 1990; Le Moine y col., 1990, 1991; Gerfen, 1992a, b; Flaherty y Gaybriel, 1993), el cual, a su vez, proyecta al NST. Todas estas conexiones son inhibitoras, utilizando GABA como neurotransmisor. El NST, por su parte, envía aferencias excitadoras a la SNPR y el GPi (Figura 1).

Por tanto, el circuito que comienza en la corteza invadiendo el estriado y que llega a la SN y al GPi, bien a través de la vía estriadonigral (vía directa) o de la estriadopalidal (vía indirecta), se cierra mediante las neuronas GABAérgicas (y por tanto inhibitoras) de la SNPR y del segmento interno del globo pálido, que constituyen la mayor eferencia de los ganglios basales, invadiendo los núcleos talámicos mediodorsal y ventromedial (los cuales proyectan a la corteza frontal) e intralaminar (el cual proyecta al estriado), el colículo superior y el núcleo pedúnculo-pontino. Estas neuronas son tónicamente activas y producirán, por tanto, la inhibición de las células talámicas que devuelven la proyección a las zonas de la corteza implicadas en el control motor.

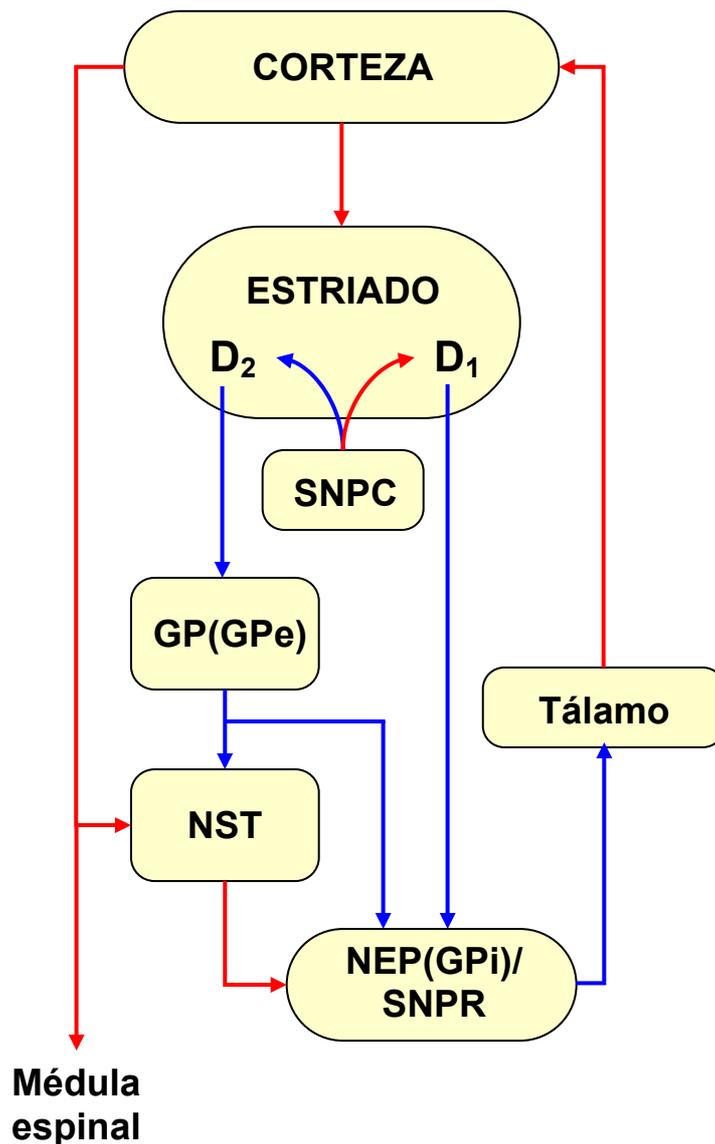


Figura 1. Esquema que representa las principales conexiones de los ganglios basales. Las flechas rojas indican conexión de tipo excitador mediada por glutamato, y las flechas azules indican conexión de tipo inhibitorio mediada por GABA, con excepción de la conexión entre la SNPC y el estriado que, en ambos casos (sinapsis excitadora o inhibitoria), está mediada por dopamina. D₁: Receptores de dopamina de tipo D₁, hacen que la DA medie una sinapsis excitadora. D₂: Receptores de dopamina de tipo D₂, cuando la DA se une a ellos se establece una sinapsis inhibitoria. GP(GPe): globo pálido en roedores (segmento externo del globo pálido en humanos); NEP(GPi): núcleo entopeduncular en roedores (segmento interno del globo pálido en humanos); NST: núcleo subtalámico; SNPC: substantia nigra pars compacta; SNPR: substantia nigra pars reticulata.

1.D.1. Vía directa

En la vía directa, cuando la proyección corticoestriatal mediada por glutamato produce la excitación de las neuronas estriatales, se produce una inhibición fásica, es decir, una inhibición del disparo de las neuronas inhibitoras de proyección de la SNPR y del GPi, lo que resulta en la desinhibición de las neuronas talamocorticales (Figura 2). Por tanto, la activación de la vía directa tiene como consecuencia una acción facilitadora del movimiento.

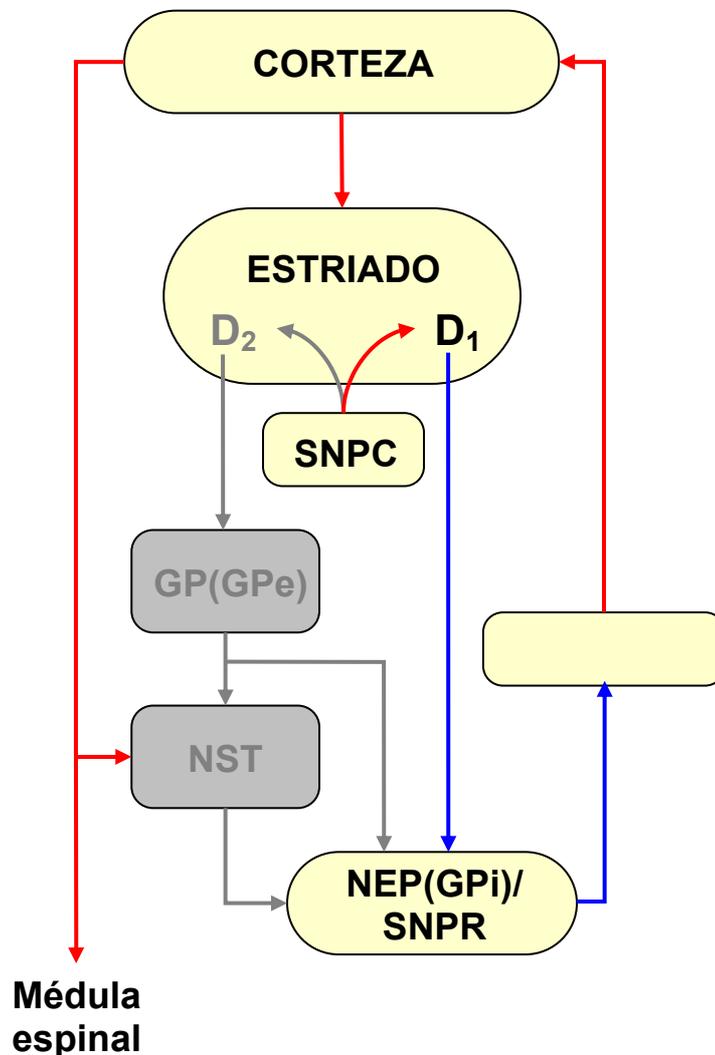


Figura 2. Esquema que representa la vía directa en los ganglios basales. La vía indirecta se sombrea en gris. La subpoblación de neuronas del estriado que expresa el receptor D₁ proyecta directamente a los núcleos de salida de información de los GB.

1.D.2. Vía indirecta

La vía indirecta opera de forma diferente: la excitación corticoestriatal produce una inhibición del segmento externo del globo pálido (mediada por GABA), el cual a su vez envía una eferencia GABAérgica al NST. Esta inhibición del GPe produce, por tanto, la desinhibición del NST, cuya proyección a la SNPR y al GPi es glutamatérgica y por tanto, excitadora. Esto resultaría en la excitación de las neuronas de la SNPR y del GPi, y por tanto, en la inhibición de la vía talamocortical (Figura 3). De esta manera, la activación de la vía indirecta tiene probablemente como consecuencia la parada de los movimientos voluntarios y la supresión de los movimientos involuntarios.

Además de la vía indirecta “clásica” (la descrita hasta aquí), estudios posteriores han demostrado como la interconexión entre los distintos núcleos de los GB es mucho más compleja de lo que en un principio se pensó. Así, por ejemplo, el GPe proyecta directamente al GPi y a la SNPR, y el NST recibe una aferencia glutamatérgica directamente desde la corteza cerebral. Los estudios sobre la anatomía y los circuitos de los GB han demostrado que las múltiples vías indirectas de flujo de información son de hecho componentes de un sistema altamente interconectado, que debe ser considerado más como una “red” indirecta de flujo de información que como una “vía” (Para una descripción detallada de los diferentes circuitos dentro de los GB ver Smith y col., 1998).

De hecho, un gran número de trabajos han demostrado como el circuito real de flujo de información en los GB es mucho más complejo de lo propuesto en el modelo de la vía directa-indirecta (Chesselet y Delfs, 1996; Levy y col., 1997; Henderson y Dunnett, 1998; Smith y col., 1998; entre otros).

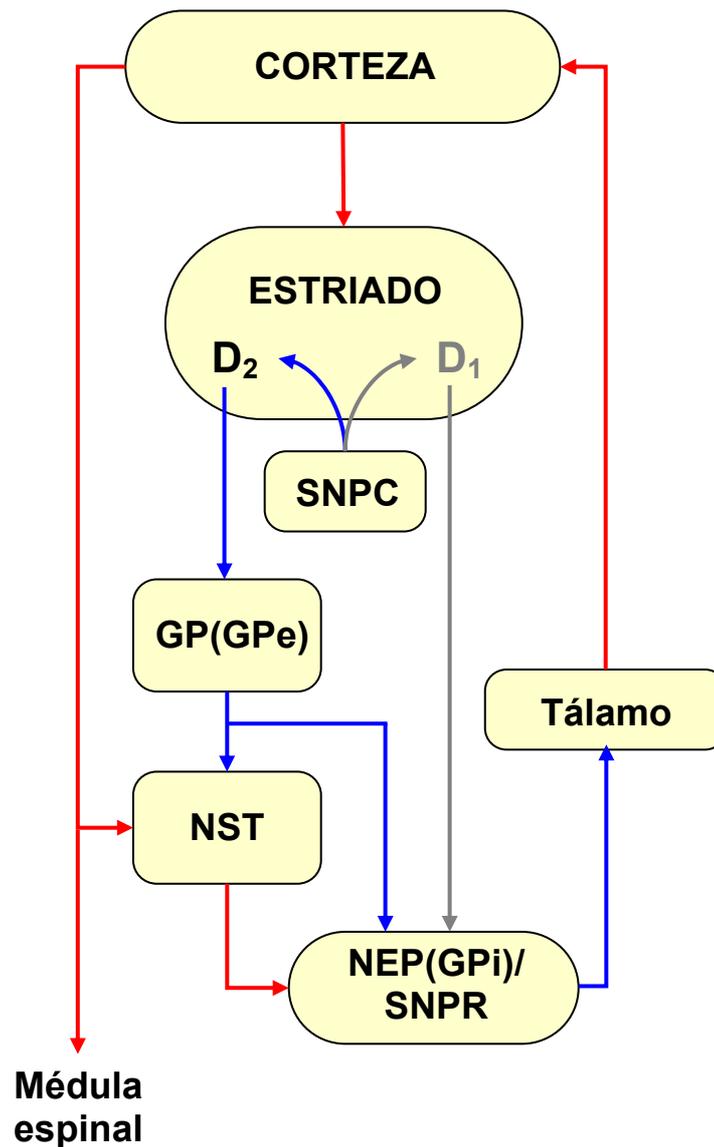


Figura 3. Esquema que representa la vía indirecta “clásica” de los GB. La subpoblación de neuronas del estriado que expresa el receptor D₂ establece sinapsis con las neuronas del GPe, que a su vez, establecen sinapsis con el NST. Estas dos conexiones son de tipo inhibitorio. Desde el NST se establece una conexión de tipo glutamatérgico con los núcleos de salida de información de los GB (GPi y SNPR). En gris se sombrea la vía directa. D₁: receptor de dopamina de tipo D₁; D₂: receptor de dopamina de tipo D₂; GP(GPe): globo pálido en roedores (segmento externo del globo pálido en humanos); NEP(GPi): núcleo entopeduncular en roedores (segmento interno del globo pálido en humanos); NST: núcleo subtalámico; SNPC: substantia nigra pars compacta; SNPR: substantia nigra pars reticulata.

1.D.3. Papel modulador de la SN en la regulación de las vías directa e indirecta

El equilibrio de la transmisión de información a través de las vías directa e indirecta está estrechamente regulado por la proyección dopaminérgica nigroestriatal. Esta aferencia dopaminérgica sobre el estriado regula la vía directa y la indirecta de forma diferente debido a la presencia de receptores postsinápticos dopaminérgicos distintos en las dos poblaciones de neuronas de proyección del estriado.

El neurotransmisor DA ejerce un efecto excitador sobre la vía directa debido a la activación de los receptores D_1 (la mayor parte de ellos expresados por las neuronas que proyectan directamente a la SNPR/GPi), mientras que sobre la vía indirecta, el efecto es inhibitorio y está mediado por los receptores D_2 , siendo el resultado último la desinhibición de las neuronas talamocorticales (ver figura 1).

El resultado de la activación de las vías directa e indirecta, por lo tanto, sería opuesto si no mediara la actividad de la proyección dopaminérgica nigroestriatal. Debido al efecto excitador sobre la vía directa y al inhibitorio sobre la indirecta la acción de la proyección dopaminérgica sobre el estriado es una acción facilitadora del movimiento.

2. DEGENERACIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES: ENFERMEDADES DE HUNTINGTON Y PARKINSON

Dentro de los síndromes clínicos derivados del daño a los ganglios basales nos centraremos en la descripción de dos de ellos: la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.

2.A. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

2.A.1. Descripción de la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) o Corea de Huntington es una enfermedad degenerativa progresiva y terminal caracterizada por movimientos incontrolados al azar de tipo espasmódico. Además, el paciente desarrolla tanto demencia como desórdenes psiquiátricos (Ver revisiones de MacMillan y Quarrell, 1996; Haque y col., 1997).

Los movimientos “espasmódicos” se van intensificando progresivamente hasta producirse de cuerpo entero. La personalidad de los pacientes cambia drásticamente, y con frecuencia sufren episodios de depresión, de ansiedad y/o cambios de humor repentinos. Conforme la enfermedad progresa, los movimientos incontrolados son sustituidos por rigidez, bradiquinesia y distonía, aunque el patrón y la progresión de la sintomatología puede variar enormemente entre pacientes.

No hay tratamiento efectivo para la EH, y los pacientes generalmente reciben terapia paliativa de la sintomatología, es decir, tratamiento farmacológico para intentar minimizar los movimientos incontrolados, la rigidez y los desórdenes psiquiátricos.

La EH es una enfermedad genética que se hereda de forma autosómica dominante, causada por una mutación en la región codificante del gen de la huntingtina. Esta mutación consiste en una repetición excesiva (más de cuarenta veces) de un triplete CAG que en el gen normal se repite como mucho hasta treinta y cinco veces (The Huntington’s Disease Collaborative Research Group, 1993).

2.A.2. Patología de la enfermedad de Huntington

La estructura más severamente afectada en la enfermedad de Huntington es el estriado, aunque también se detecta atrofia en la corteza. Actualmente se admite que esta enfermedad también puede afectar a otras áreas del cerebro, aparte del estriado y la corteza (MacMillan y Quarrell y col., 1996; Vonsattel y DiFligia, 1998).

En el nivel microscópico, las neuronas del estriado contienen cuerpos intracelulares llamados inclusiones neuronales intranucleares. El análisis ultraestructural de estas inclusiones ha revelado que están formadas por fragmentos de la proteína huntingtina (htt) unidos a ubiquitina. Diferentes estudios sugieren que las repeticiones excesivas que aparecen en la huntingtina mutada hacen que esta proteína tenga tendencia a formar agregados, inclusiones neuronales intranucleares y de esta manera, causar citotoxicidad.

El análisis post mortem del estriado de pacientes con EH ha revelado una pérdida casi completa de las neuronas GABAérgicas espinosas de proyección de tamaño medio, con una relativa supervivencia de las interneuronas colinérgicas y NADPHd-positivas. La degeneración de las neuronas estriatales se produce en distintas etapas que se solapan entre sí. Así, las primeras neuronas que degeneran son las neuronas GABAérgicas espinosas de tamaño medio que contienen encefalina. Mientras esas células van progresivamente muriendo, las neuronas GABAérgicas espinosas de tamaño medio que contienen sustancia P comienzan a degenerar. En los últimos estadios mueren las restantes neuronas GABAérgicas de proyección, es decir, aquellas que inervan la SNPC.

La muerte de las neuronas GABAérgicas que forman la vía indirecta en la EH tiene como consecuencia una disminución de la actividad de la vía indirecta frente a la vía directa, lo que conlleva una sobreexcitación de las neuronas corticales, de ahí los movimientos espasmódicos que se producen en los primeros estadios de la enfermedad.

2.A.3. Modelos animales de la enfermedad de Huntington

Los modelos animales de la EH están basados en lesiones causadas en el estriado mediante desequilibrios metabólicos o excitotoxicidad.

Las toxinas mitocondriales causan un patrón de degeneración en el estriado similar al que aparece en la EH. El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) y el ácido malónico (MA) (para revisión ver Alexi y col., 1998; Sanberg y col., 1999) son toxinas mitocondriales que interfieren en la síntesis de ATP por medio de la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que es una enzima de la membrana mitocondrial que forma parte del complejo II de la cadena electrónica y que también participa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

La administración intraestriatal en determinadas dosis de agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato (Glu) como son el ácido kaínico (KA), ácido iboténico (IA), N-metil-D-aspartato (NMDA) o ácido quinolínico (QA) causa neurodegeneración en el estriado (McGeer y McGeer, 1976; Coyle y Schwarcz, 1976; Schwarcz y col., 1979, 1983; Beal y col., 1986; Hantraye y col., 1990; Ferrante y col., 1993; Roberts y col., 1993), ya que la estimulación excesiva de los receptores de Glu lleva a la muerte celular por excitotoxicidad (revisado en el siguiente apartado de la introducción).

2.B. ENFERMEDAD DE PARKINSON

2.B.1. Descripción de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad degenerativa progresiva y terminal caracterizada por rigidez muscular, bradiquinesia (lentitud de movimientos), temblor en reposo y pérdida de reflejos posturales (revisado por Lang y Lozano, 1998a, b). Los síntomas van agravándose conforme la neurodegeneración continúa hasta que el paciente es virtualmente incapaz de moverse.

La piedra angular de la terapia antiparkinsoniana es la L-3,4-hidroxifenilalanina (L-DOPA), que es la molécula precursora de la dopamina. En la mayoría de los pacientes, la L-DOPA palía un gran número de los síntomas de la EP, especialmente, el temblor y la rigidez. Desafortunadamente, el tratamiento crónico con L-DOPA lleva a una disminución de su efectividad, de tal forma que tras un tiempo de tratamiento que varía según cada paciente se vuelve completamente ineficaz. Además, el tratamiento con L-DOPA puede tener como efecto secundario la aparición de disquinesias que pueden llegar a ser tan severas como para incapacitar al paciente tanto o más que la propia EP.

La etiología de la enfermedad de Parkinson es desconocida en la mayoría de los casos aunque existen también formas de la enfermedad asociadas a síndromes genéticos.

2.B.2. Patología de la enfermedad de Parkinson

La sintomatología de la EP es debida a la pérdida de la dopamina estriatal como consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNPC. En la EP tiene lugar una pérdida progresiva y relativamente selectiva de las neuronas ricas en melanina de la SNPC, lo que da lugar a una disminución de la dopamina que llega al estriado desde esta estructura.

La pérdida de DA en el estriado conlleva un desequilibrio en la actividad de las dos vías de proyección estriatales, activándose la vía estriadopalidal y reprimiéndose la estriadonigral, lo que conduce a la activación de las neuronas del talámo y, por lo tanto, a la inhibición de la corteza, siendo ésta la causa de la mayoría de los síntomas de la enfermedad. La disminución de DA en el estriado también produce la sobreactivación de las interneuronas colinérgicas de esta estructura, con repercusiones en el control motor.

2.B.3. Modelos animales de la enfermedad de Parkinson

Los tres modelos animales de EP más ampliamente utilizados son la axotomía del haz prosencefálico medial (HPM), la inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o la inyección de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

El modelo de axotomía consiste en cortar los axones de las neuronas de la SNPC que inervan el estriado mediante el uso de una cuchilla quirúrgica especial. El corte de estos axones da lugar a la degeneración de los correspondientes cuerpos neuronales en la SNPC (Knüsel y col., 1992; Beck y col., 1995; Alexi y Hefti, 1996; Tseng y col., 1997; Venero y col., 1997; Hagg y col., 1998).

La 6-OHDA es generalmente administrada en el HPM, en el estriado o, algunas veces, directamente en la SN, donde es selectivamente captada por las neuronas dopaminérgicas, en las que causa estrés oxidativo y por último la muerte (Cohen y Heikkila, 1974; Hefti y col., 1980).

El MPTP es una toxina mitocondrial que causa una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNPC. Administrada de forma sistémica sólo es efectiva en algunas especies, como por ejemplo en los primates, incluido el hombre, pero otras especies, como la rata, son resistentes (Langston y col., 1983, 1984; Heikkila y col., 1984, 1985b; Giovanni y col., 1994; Muthane y col., 1994). Sin embargo, la infusión de MPTP o su metabolito activo 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPP⁺) intracerebralmente causa lesiones dopaminérgicas en todas las especies donde se ha ensayado (Heikkila y col., 1985a; Giovanni y col., 1994). El MPTP es convertido en el organismo en MPP⁺, que es reconocido por el transportador de dopamina y de esta manera captado selectivamente por las neuronas dopaminérgicas, donde causa fallo mitocondrial y por último muerte celular.

3. MUERTE NEURONAL POR EXCITOTOXICIDAD

En esta tesis hemos causado lesiones en distintas estructuras de los ganglios basales, como el estriado y la SNPR, mediante excitotoxicidad. Como hemos comentado en el apartado anterior, la muerte neuronal por excitotoxicidad ocurre debido a una estimulación de los receptores de glutamato que se convierte en patológica. La acción neurotóxica del glutamato ha sido ampliamente comprobada en una gran variedad de enfermedades, por ejemplo, en el daño neuronal que se produce tras isquemia o hipoglucemia (Choi y Rothman, 1990; Olney, 1990; Choi, 1992, entre otros), en la neuropatía producida por crisis epilépticas (Isokawa y Levesque, 1991; entre otros); en los estados inflamatorios y neurodegenerativos asociados a infecciones virales en el SNC (Giulian y col., 1990; Lipton y col., 1991; Toggas y col., 1994) y en la degeneración crónica asociada a las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Plaitakis y col., 1982; Beal y col., 1986; Young y col., 1986, 1988; Meldrum y Garthwaite, 1990; Rothstein y col., 1990; entre otros).

3.A. RECEPTORES DE GLUTAMATO

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC. Los receptores de Glu se dividen en dos subtipos principales: los ionotrópicos (acoplados a un canal iónico) y los metabotrópicos (asociados a una proteína transmembrana acoplada a diferentes sistemas de segundos mensajeros) (Para revisión ver, entre otros, Michaelis, 1998).

3.A.1. Receptores ionotrópicos

La familia de los receptores ionotrópicos de Glu habitualmente se subdivide en tres categorías en función de su selectividad por distintos agonistas: el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) y el receptor del ácido kaínico (KA) (para revisión ver Boulter y col., 1992; Hollmann y Heinemann, 1994; Nakanishi y Masu; 1994; Michaelis, 1998).

La discriminación entre receptores AMPA y KA ha sido difícil de establecer en el SNC, pero la introducción de agentes farmacológicos más selectivos ha demostrado la existencia de ambos tipos de receptores, y ha permitido establecer las características de cada uno de ellos. Estos dos subtipos de receptores ionotrópicos de glutamato son los encargados de llevar a cabo la transmisión sináptica rápida del SNC. Los canales formados por estos receptores son primariamente permeables a Na^+ y K^+ .

En el caso del receptor NMDA, para que se produzca la activación del canal de Ca^{2+} a él asociado es necesario que la neurona postsináptica esté fuertemente despolarizada. De hecho, los receptores NMDA responden a glutamato más lentamente que los receptores AMPA/kainato, y por tanto, median la transmisión sináptica excitatoria lenta. Esta respuesta lenta de los receptores NMDA a la activación por glutamato se cree que es debida al hecho de que están tónicamente inhibidos por el ión Mg^{2+} presente en el espacio extracelular que rodea las neuronas (Mayer y col., 1994; Nowak y col., 1994). Cuando este canal iónico se abre, el Ca^{2+} entra en la célula y activa diferentes procesos intracelulares que conducen a la fosforilación de quinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina y a la potenciación a largo plazo (Bliss y Collingridge, 1993). Si esta corriente postsináptica de Ca^{2+} no es regulada, puede producirse la muerte neuronal por excitotoxicidad.

3.A.2. Receptores metabotrópicos (mGluR).

Estos receptores están acoplados a proteínas G y controlan la actividad de enzimas de membrana y canales iónicos. Hasta ahora se conocen ocho subtipos (dependiendo del sistema de segundos mensajeros empleado y de los agonistas que los activan; Tanabe y col., 1992) que se clasifican en tres grupos: grupo I (integrado por los mGluR1 y mGluR5), grupo II (mGluR2 y mGluR3), y grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) (para revisión ver Conn y Pin, 1997; Schoepp y col., 1999; Bruno y col., 2001).

La activación de los receptores del grupo I provoca un incremento de la excitación neuronal ya que tienen ubicación postsináptica. Los receptores de los grupos II y III, por el contrario, son presinápticos y por lo tanto generan un descenso de la actividad neuronal ya que actúan como autorreceptores, provocando la disminución de la liberación de Glu al ser activados (Shigemoto y col., 1997).

3.B. MECANISMOS DE LA MUERTE NEURONAL POR EXCITOTOXICIDAD

Hay evidencias de que los efectos tóxicos de los aminoácidos excitadores son principalmente debidos a la activación del receptor NMDA. La activación de este receptor lleva a la entrada de Ca^{2+} en la célula, pudiéndose producir una sobrecarga de este ión en el espacio intracelular (ver revisión de Greene y Greenamyre; 1996). La sobrecarga de Ca^{2+} puede causar una activación indiscriminada de señales dependientes de calcio, como por ejemplo, la activación de fosfolipasas y proteasas, así como estrés oxidativo por el aumento de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

La sobreestimulación de los receptores AMPA/KA también conduce a la muerte celular por excitotoxicidad ya que su activación permite indirectamente que entre Ca^{2+} en la célula a través del canal asociado al receptor NMDA. La completa activación de los receptores NMDA requiere que se elimine el bloqueo de este receptor por parte del Mg^{2+} . Como este bloqueo es un proceso dependiente de voltaje, la activación rápida de los receptores AMPA/KA disminuye la inhibición de los receptores NMDA por Mg^{2+} con la consiguiente entrada de Ca^{2+} al espacio intracelular.

Algunas de las proteasas que se supone que son activadas con la entrada de Ca^{2+} en la célula son las que activan las enzimas caspasas, determinantes en el proceso de apoptosis. Más aún, el flujo de Ca^{2+} al interior de las células puede activar proteasas que conviertan la enzima xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, cuya activación lleva a la producción de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno, causantes de estrés oxidativo. Otra enzima activada por la entrada de Ca^{2+} es la fosfolipasa A_2 , que da lugar a ácido araquidónico, cuyo metabolismo por la enzima ciclooxigenasa lleva a la generación de anión superóxido (Needleman y col., 1989; Kappus, 1990). La enzima NOS (óxido nítrico sintasa) también es activada por la entrada en la célula de Ca^{2+} libre. Esta enzima produce anión $\cdot\text{NO}$, que es liberado al espacio extracelular que rodea las neuronas estimuladas, causando la activación de guanililciclasas en esas neuronas y seguidamente la muerte celular (Garthwaite y col., 1989; Marin y col., 1992). La producción de anión $\cdot\text{NO}$ se puede activar mediante estimulación de los receptores NMDA o los receptores AMPA/KA (Bredt y Zinder, 1989; Garthwaite y col., 1989; Marin y col., 1992). Se cree que para que el anión $\cdot\text{NO}$ resulte tóxico es necesario la formación de anión superóxido en la misma célula, y que ambas especies reaccionen para producir peroxinitrito, un agente oxidante muy fuerte (Beckman y col., 1994; Kooy y col., 1995) que causa nitración de residuos de tirosina en proteínas y oxidación tanto de proteínas como de lípidos y ácidos nucleicos.

La citotoxicidad causada por Ca^{2+} es un mecanismo complejo y puede no sólo ser debida a la sobrecarga intracelular de Ca^{2+} sino también a un desequilibrio en la homeostasis de este ión y en la síntesis de ATP en la mitocondria (Castilho y col., 1998; Stout y col., 1998). El NMDA ha demostrado no sólo aumentar los niveles de Ca^{2+} en el citosol sino también dentro de la mitocondria (Peng y col., 1998).

Las regiones que reciben aferencias glutamatérgicas, como el estriado y la SNPR, y que por tanto tienen receptores de glutamato, están predispuestas a sufrir degeneración por excitotoxicidad.

4. FACTORES NEUROTRÓFICOS

4.A. FUNCIONES DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS

Los factores neurotróficos (FNTs) son péptidos de secreción que actúan como factores de crecimiento durante el desarrollo fenotípico y contribuyen al mantenimiento de poblaciones neuronales específicas en el SNC, tanto en el estado adulto como durante el desarrollo. Estas proteínas pueden actuar a través de una vía de señalización retrógrada a partir de neuronas diana, o por mecanismos paracrinos o autocrinos, controlando así numerosos aspectos relacionados con la estructura neuronal y glial (Yuen y col., 1996; ver revisión de Siegel y Chauchan, 2000).

Los FNTs promueven la supervivencia de las neuronas, estimulan el crecimiento de axones e influyen en la maduración sináptica durante el desarrollo. Se ha propuesto que durante el desarrollo los axones compiten por cantidades limitadas de FNTs, los cuales son producidos por sus tejidos diana (Grimes y col., 1996; Yuen y col., 1996). Las neuronas que no fuesen capaces de obtener una cantidad de FNTs suficiente para cubrir sus necesidades morirían mediante apoptosis (muerte celular programada) (Thoenen y col., 1987; Henderson, 1996; ver revisión de Connor y Dragunow de 1998 sobre FNTs y enfermedades neurodegenerativas).

En la etapa adulta, los factores neurotróficos son requeridos para mantener tanto las funciones celulares como el fenotipo específico de las neuronas (Sofroniew y col., 1990; Conner y Varon, 1996; Cooper y col., 1996; Blesch y col., 1998). De cualquier forma, aún no está claro hasta que punto las neuronas maduras son dependientes del soporte trófico de las células diana.

A los FNTs no sólo se les atribuyen las funciones anteriormente comentadas, sino que también hay evidencias de que pueden regular las disfunciones neuronales, la activación astrocítica y las reacciones inflamatorias que aparecen en condiciones patológicas. Numerosas investigaciones sugieren que algunos FNTs también modulan la plasticidad neuronal que aparece con el envejecimiento y con algunos traumas y enfermedades neurodegenerativas (Blesch y col., 1998).

En conclusión, la importancia de los FNTs en la supervivencia y diferenciación fenotípica de las neuronas durante el desarrollo, así como en el mantenimiento y protección de las neuronas maduras y dañadas en el sistema nervioso de los vertebrados está bien documentada (Ebadi y col., 1997; Connor y Dragunow, 1998). Más aún, evidencias recientes sugieren que la alteración que se produce en los niveles de FNTs como consecuencia del envejecimiento, de factores genéticos u otras causas podría contribuir a la etiología de las enfermedades neurodegenerativas. Así pues, se ha propuesto que la pérdida de soporte trófico endógeno derivado de tejido inervante (diana) para poblaciones neuronales concretas puede ser una base etiopatológica importante en enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Connor y Dragunow, 1998; Siegel y Chauchan, 2000).

4.B. CLASIFICACIÓN DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS

La mayoría de los factores neurotróficos pertenecen a varias familias de moléculas relacionadas tanto estructural como funcionalmente: (1) Superfamilia del factor de crecimiento nervioso (NGF) o familia de las neurotrofinas (NTs); (2) Familia del factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF); (3) Superfamilia de las neuroquinas o neuropoyetinas; (4) Superfamilia de los factores de crecimiento no neuronales. Todos estos FNTs actúan mediante la unión a receptores específicos (Clasificación tomada de Siegel y Chauchan, 2000).

- 1. Superfamilia del factor de crecimiento nervioso (NGF) o familia de las neurotrofinas (NTs).** Esta superfamilia incluye el NGF, el factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4/5 (NT-4/5) y la neurotrofina-6 (NT-6) (Mufson y col., 1999), pero esta última no se ha encontrado en mamíferos. Los receptores de la superfamilia del NGF incluyen al receptor de baja afinidad de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}), con afinidad por todos los miembros de la superfamilia, y los receptores de alta afinidad Tropomiosintirosinquinasa *trkA*, *trkB* y *trkC*. NGF se une específicamente a *trkA*, BDNF y NT-4/5 se unen específicamente a *trkB*, mientras que NT-3 se une a *trkC* y con menor afinidad a *trkB* (ver revisiones de Barbacid, 1995; Patapoutian y Reichardt, 2001).
- 2. Superfamilia del factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF), relacionada estructuralmente con la superfamilia del factor transformante de crecimiento β (TGF- β).** Esta familia incluye el GDNF (Kriegstein y col., 1995) y tres miembros relacionados estructuralmente llamados neurturina (Ibáñez, 1998), persefina (Milbrandt y col., 1998) y artemina (Baloh y col., 1998). Los receptores de esta familia están constituidos son heterodímeros constituidos por el componente Ret y uno de los receptores del factor de crecimiento (GFR α 1-4) (Baloh y col., 2000).
- 3. Superfamilia de las neurocininas o neuropoyetinas.** La superfamilia de las neurocininas incluye el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor inhibidor de leucemia (LIF), la interleucina-6 (IL-6), la cardiotrofina-1 (CT-1) y la oncostatina. Estas moléculas ejercen su acción mediante la unión a complejos formados por el receptor gp130 y el receptor β del factor inhibidor de leucemia (LIFR β).

4. **Superfamilia de los factores de crecimiento no neuronales.** Esta superfamilia incluye factores de crecimiento no neuronales pero que se encuentran en concentraciones significativas en el sistema nervioso incluyendo al factor ácido de crecimiento de fibroblastos (aFGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF) y la proteína morfogenética de hueso (BMP).

4. C. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF)

El factor de crecimiento derivado de cerebro o BDNF es una proteína homodimérica de 28-kDa formada por dos subunidades de 14-kDa unidas no covalentemente. BDNF pertenece a la familia de las originalmente conocidas como neurotrofinas (NTs) o familia del NGF (Rosenthal y col., 1991; Wetmore y col., 1991; Rosenfeld y col., 1995). La secuencia de aminoácidos de BDNF es idéntica tanto en humanos como en rata y cerdo, lo que indica que ha habido una conservación de la secuencia entre especies.

Los excitantes descubrimientos en torno a las funciones fisiológicas del NGF animaron a la comunidad científica a la búsqueda de otras moléculas estructuralmente relacionadas. BDNF fue purificado del cerebro del cerdo gracias a su capacidad de promover la supervivencia de una subpoblación de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Barde y col., 1982).

BDNF es necesario para la supervivencia de algunas neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico y se expresa ampliamente en el sistema nervioso central, especialmente en el hipotálamo, en la corteza y en la amígdala (Ernfors y col., 1990a, b; Hofer y col., 1990; Phillips y col., 1990; Wetmore y col., 1990). La expresión de BDNF parece no disminuir con la edad (Lapchak y col., 1993b; Narisawa-Saito y Nawa, 1996; Katoh-Semba y col., 1997, 1998) lo que sugiere que esta NT puede tener un papel esencial en el sistema nervioso central de adultos.

4.C.1. Distribución de BDNF en el Sistema Nervioso Central

Los datos incluidos en este apartado se refieren principalmente a distribución de ARNm y proteína de BDNF en el SNC de roedores ya que los estudios presentados en esta tesis han sido realizados en ratas. También se hace hincapié en la distribución de BDNF en el complejo de los ganglios basales y estructuras relacionadas, no incluyendo datos de la distribución de esta neurotrofina en otras estructuras del SNC, ya que en esta tesis sólo se recogen datos de expresión de BDNF en los ganglios basales y en la corteza.

Se han detectado altos niveles de ARNm y proteína de BDNF en el hipocampo y en la corteza cerebral, tanto en estudios realizados en roedores (Ernfors y col., 1990a, b; Hofer y col., 1990; Wetmore y col., 1990, 1991; Dugich-Djordjevic y col., 1995; Schmidt-Kastner y col., 1996; Conner y col., 1997; Furukawa y col., 1998, entre otros) como en humanos (Phillips y col., 1990, Connor y col., 1997; Murer y col., 1999a; entre otros). En el estudio realizado a cabo por Murer y col. (1999a) se encontraron neuronas inmunopositivas a BDNF en todas las áreas de la corteza examinadas, estando estas neuronas preferentemente localizadas en las capas II/III y V/VI.

Los receptores de alta afinidad de BDNF (*trkB*) también están presentes en la corteza y en el hipocampo como han demostrado numerosos estudios tanto en roedores (Altar y col., 1994b; Drake y col., 1999; entre otros) como en humanos (Ferrer y col., 1999). De hecho, casi todas las neuronas que expresan ARNm de BDNF en la corteza y en el hipocampo también contienen ARNm de *trkB* (Kokaia y col., 1993; Giehl y col., 1998).

Respecto a los ganglios basales, la proteína de BDNF se ha detectado en el estriado, aunque parece estar presente en las fibras pero no en los cuerpos neuronales de esta estructura (Dugich-Djordjevic y col., 1995; Kawamoto y col., 1996; Radka y col., 1996; Altar y col., 1997; Conner y col., 1997; Yan y col., 1997a). En cualquier caso, los niveles de ARNm de BDNF en el estriado son prácticamente indetectables (Hofer y col., 1990; Maisonpierre y col., 1990; Wetmore y col., 1990; Ceccatelli y col., 1991; Castrén y col., 1995; Schmidt-Kastner y col., 1996; Altar y col., 1997; Conner y col., 1997). Sin embargo, tanto el ARNm como la proteína de *trkB* se expresan en las neuronas del estriado de la rata (Merlio y col., 1992; Yan y col., 1997b).

Murer y col. (1999a) no encontraron evidencias de inmunorreactividad para BDNF ni en cuerpos celulares ni en fibras del globo pálido en humanos. Sin embargo, en el núcleo subtalámico se detectó la proteína de BDNF en fibras pero no en los cuerpos neuronales.

En relación con las neuronas de la substantia nigra, un gran número de estudios ha confirmado la presencia de proteína (Dugich-Djordjevic y col., 1995; Conner y col., 1997; Yan y col., 1997a; Furukawa y col., 1998; entre otros) y ARNm (Wetmore y col., 1990; Gall y col., 1992; Seroogy y Gall, 1993; Seroogy y col., 1994; Venero y col., 1994a; Schmidt-Kastner y col., 1996; Conner y col., 1997; entre otros) de BDNF en esta estructura. La mayoría de las neuronas dopaminérgicas de la SN expresan tanto la proteína como el mensajero de *trkB* (Merlio y col., 1992; Altar y col., 1994; Yan y col., 1997b; Numan y Seroogy, 1999), lo que sugiere coexpresión de BDNF y su receptor de alta afinidad en las mismas neuronas.

4.C.2. Receptores de BDNF

Las acciones biológicas de BDNF, como ya hemos comentado anteriormente, son mediadas por dos tipos de receptores de membrana. Por un lado, BDNF se une al receptor de baja afinidad de neurotrofinas p75 ($p75^{NTR}$), al que se unen con la misma afinidad todos los miembros de las NTs. El otro receptor de BDNF es un receptor de la familia de receptores de alta afinidad de las NTs conocido como *trkB* (Klein y col., 1991; Soppet y col., 1991; Kaplan y Stephens, 1994; Barbacid, 1995).

TrkB es así llamado por pertenecer a una familia de receptores (receptores *trk* de las NTs) constituidos por una isoforma de tropomiosina y un dominio citoplasmático tirosinquinasa. El gen de *trkB* puede dar lugar a varios transcritos de ARNm en roedores, dos de ellos codifican la forma catalítica o forma completa de *trkB*, el receptor que media las principales acciones biológicas de BDNF (Barbacid 1994; Dechant y col., 1994; Snider, 1994). Otros dos transcritos dan lugar a dos isoformas de *trkB* a las que les falta una gran parte del dominio intracelular y no presentan actividad tirosinquinasa; estas isoformas son conocidas como receptores “truncados” de *trkB* (Klein y col., 1990; Middlemas y col., 1991).

La unión de BDNF a su receptor *trkB* conlleva la activación de éste mediante un proceso de dos pasos: dimerización del receptor y autofosforilación del dominio intracelular tirosinquinasa (Schlessinger y Ullrich, 1992). El receptor activado es capaz de interaccionar y fosforilar varias dianas en el interior de la célula (Segal y Greenberg, 1996).

Aunque la forma catalítica de *trkB* es considerado como el receptor que media las principales acciones biológicas de BDNF, una de las formas “truncadas” (*trkb.T1*) es la isoforma predominante en el cerebro adulto (Escandón y col., 1994; Allendoerfer y col., 1994; Armanini y col., 1995). La función que se ha propuesto para este tipo de receptores es modular la acción de BDNF mediante la unión formando heterodímeros a la forma catalítica de *trkB* regulando así la disponibilidad extracelular de BDNF, ya que una vez que BDNF se une al receptor “truncado”, el complejo ligando-receptor es internalizado (Klein y col., 1990; Middlemas y col., 1991).

El receptor de baja afinidad $p75^{NTR}$ posee una estructura relacionada con las proteínas de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), caracterizadas por poseer una región intracelular no catalítica conocida como “dominios de la muerte” (Chao, 1994; Bothwell, 1995). La función de este receptor no está claramente establecida. Por una parte, $p75^{NTR}$ puede modular la respuesta celular a BDNF interaccionando con su receptor de alta afinidad *trkB* (Barbacid 1994a, b; Chao, 1994; Dechant y col., 1994; Bothwell, 1995; Chao y Hempstead, 1995). Sin embargo, se ha establecido claramente que $p75^{NTR}$ puede inducir respuestas celulares, particularmente muerte celular, en ausencia de receptores *trk*, un efecto en principio sólo demostrado para NGF (Carter y Lewin, 1997; Dechant y Barde, 1997; Frade y Barde, 1999), que posteriormente se ha observado también en el caso de unión de BDNF a $p75^{NTR}$ (Friedman, 2000). En el sistema nervioso periférico (SNP), la activación de $p75^{NTR}$ por BDNF parece producir la muerte por apoptosis de las neuronas del sistema simpático (Bamji y col., 1998).

De cualquier forma, el ratón mutante deficiente en $p75^{NTR}$ no muestra las alteraciones características observadas en los ratones deficientes en BDNF o *trkB*, lo que sugiere que $p75^{NTR}$ no es esencial para la mayoría de las acciones biológicas de BDNF *in vivo* (Barbacid 1994a, b; Snider, 1994).

4.C.3. Transporte de BDNF

Numerosos estudios han demostrado que el BDNF es transportado de forma retrógrada tanto por neuronas del SNP como por neuronas del SNC (revisiones de Altar y DiStefano, 1998; von Bartheld, 1998; Mufson y col., 1999). Si se aplica BDNF localmente puede ser captado por los axones de las neuronas vecinas y transportado retrógradamente a los correspondientes cuerpos celulares en el SNC de mamíferos adultos (DiStefano y col., 1992; revisado por Mufson y col., 1999).

Centrándonos en los ganglios basales, el BDNF exógeno inyectado en el estriado de roedores es transportado retrógradamente a algunas áreas de la corteza, algunos núcleos talámicos, a neuronas del rafe, y a una subpoblación de neuronas dopaminérgicas de la SN (Mufson y col., 1994, 1999; Anderson y col., 1995). En la corteza, el BDNF transportado retrógradamente se observa principalmente en la capa V de la zona frontoparietal ipsilateral al estriado donde fue inyectado. En cuanto a la SN, prácticamente todas las neuronas que contienen BDNF transportado retrógradamente son también inmunorreactivas para la enzima tirosina hidroxilasa (TH), es decir, son neuronas dopaminérgicas, lo que indica selectividad del transporte de BDNF a una determinada población neuronal.

El concepto de transporte anterógrado de BDNF fue demostrado en las regiones clave de los ganglios basales por Altar y col. (1997). El hecho de que en el estriado no pueda detectarse ARNm de BDNF pero sí la proteína llevó a los autores a proponer que esta proteína era transportada anterógradamente al estriado desde las neuronas de la corteza y la SNPC, las cuales sí expresan ARNm de BDNF. En ese estudio, los autores encontraron que en ratas tratadas con colchicina, una sustancia bloqueadora del transporte axoplásmico, el contenido estriatal de proteína de BDNF disminuía, mientras que aumentaba el de la corteza y el de la SNPC. Más aún, lesiones de la corteza hicieron que el contenido de proteína de BDNF en el estriado disminuyese un 66%, mientras que lesiones en la SNPC disminuyeron el contenido en proteína de BDNF un 14%. Consecuentemente, los autores concluyeron que la mayoría del BDNF presente en el estriado procedía de la corteza cerebral, y secundariamente de la SNPC, las dos principales aferencias del estriado.

El transporte anterógrado de BDNF no está limitado a los sistemas cortico o nigroestriatal. De hecho, en las revisiones de Altar y DiStefano (1998); Mufson y col. (1999); y Murer y col. (2001) se comentan los trabajos que han demostrado el transporte anterógrado de BDNF en otras regiones del SNC. Así por ejemplo, las crisis epilépticas aumentan los niveles de ARNm de BDNF en las neuronas granulares del giro dentado (una zona del hipocampo) mientras que se observa un aumento de la proteína de BDNF en las fibras musgosas, esto es, en los axones de estas células granulares (Smith y col., 1997).

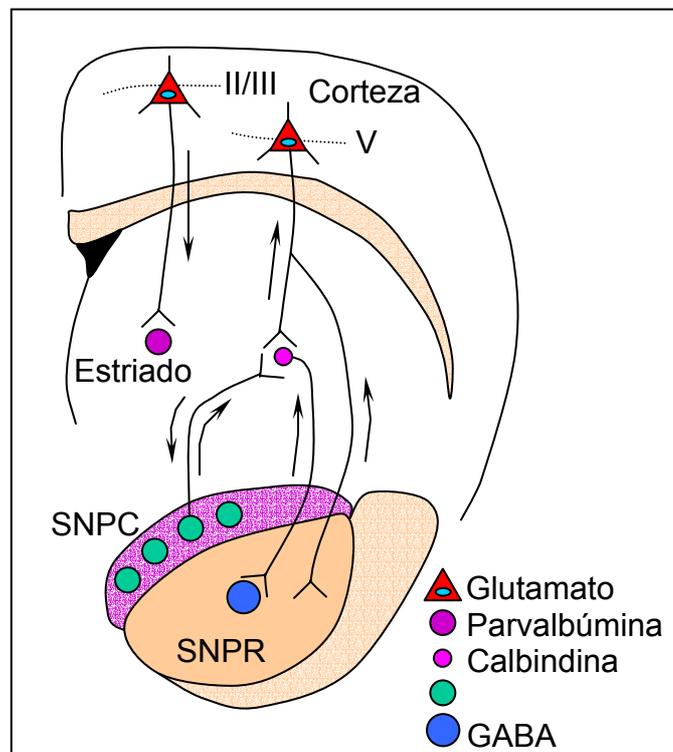


Figura 4. Transporte de BDNF en el sistema corticoestriatal de rata. No hay transporte retrógrado de BDNF a las capas II/III de la corteza ni transporte anterógrado de BDNF desde el estriado. El transporte de BDNF se señala mediante flechas. II/III: capas II/III de la corteza; V: capa V de la corteza; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro; SNPC: substantia nigra pars compacta; SNPR: substantia nigra pars reticulata.

4.C.4. Regulación de la expresión de BDNF en el SNC

La expresión del gen de BDNF está regulada por señales fisiológicas o por daños en el SNC.

Se ha establecido claramente que la expresión de BDNF es dependiente de actividad neuronal en el SNC de mamíferos adultos. Los primeros estudios sobre la regulación por actividad neuronal de la expresión de BDNF mostraron como la expresión de ARNm de BDNF aumenta varias veces en el hipocampo de roedores tras crisis epilépticas (Zafra y col., 1990; Ballarin y col., 1991; Ernfors y col., 1991; Gall y col., 1991; Isackson y col., 1991; Castrén y col., 1998). Aumentos en la expresión de ARNm de BDNF no sólo se encontraron tras crisis epilépticas de larga duración o recurrentes sino también después de episodios cortos de tipo epiléptico en el hipocampo (Ernfors y col., 1991; Isackson y col., 1991). Más aún, el aumento en la expresión de mensajero de BDNF tras las crisis epilépticas no sólo se observa en el hipocampo sino que también se detecta en un gran número de regiones de la corteza y en la amígdala (Ballarin y col., 1991; Ernfors y col., 1991; Gall y col., 1991; Isackson y col., 1991; Zafra y col., 1991; Dugich-Djordjevic y col., 1992). Un estudio de Katoh-Semba y col. (1999) demostró aumentos de la proteína de BDNF en el hipocampo, el *septum*, la corteza cerebral, el estriado y el hipotálamo de ratas tratadas intraperitonealmente con ácido kaínico. Estudios posteriores demostraron aumentos en la proteína de BDNF en el hipocampo tras crisis epilépticas (Nawa y col., 1995; Smith y col., 1997; Yan y col., 1997a).

Otra serie de trabajos diseñados para aumentar la actividad neuronal usando paradigmas distintos a las crisis epilépticas demostraron cambios en la expresión de BDNF. La estimulación eléctrica con parámetros que inducen potenciación a largo plazo (LTP) aumenta la expresión de ARNm de BDNF en el hipocampo (Patterson y col., 1992; Castrén y col., 1993; Dragunow y col., 1993). De acuerdo con esos estudios, los niveles de proteína y ARNm de BDNF aumentan en el hipocampo tras someter a animales de experimentación a tareas de aprendizaje (Kesslak y col., 1998; Hall y col., 2000; Mizuno y col., 2000).

Incluso cambios espontáneos en la actividad bioeléctrica o cambios en la actividad neuronal inducidos por fármacos modifican la expresión de ARNm de BDNF *in vitro* (Rutherford y col., 1997, 1998; Gorba y col., 1999b).

Ciertos estímulos sensoriales también puede inducir la expresión de BDNF en importantes estructuras del SNC, como por ejemplo, la luz en la corteza visual (Castrén y col., 1992), los cambios osmóticos en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Castrén y col., 1995) y un tipo de estimulación sensorial conocida como "estimulación de los bigotes" en la corteza somatosensorial (Rocamora y col., 1996). Volviendo a la regulación de BDNF en la corteza visual por estimulación sensorial, el bloqueo de la llegada de estímulos sensoriales desde uno de los ojos lleva a un descenso en los niveles de BDNF, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en la corteza ipsilateral (Bozzi y col, 1995; Rossi y col., 1999; Lein y Shatz, 2000).

La expresión de BDNF también puede estar regulada por neurotransmisores y hormonas. De acuerdo con la idea de que BDNF puede ser regulado por la actividad neuronal, hay evidencias de que los agonistas de receptores glutamatérgicos inducen la expresión de BDNF, mientras que los agonistas de los receptores GABA_A la inhiben (Zafra y col., 1990; revisado por Lindholm y col., 1994; y Marty y col., 1997). Otros mediadores de sinapsis u hormonas involucrados en la regulación de BDNF son la acetilcolina (Ach) (Knipper y col., 1994; French y col., 1999), la serotonina (Nibuya y col., 1995; Vaidya y col., 1999; Zetterstrom y col, 1999), el óxido nítrico (Xiong y col., 1999), la tiroxina (Lüesse y col., 1998), los gluco y mineralcorticoides (Chao y col, 1998; Schaaf y col., 1998), y los esteroides (Gibbs, 1999).

Otros estímulos fisiológicos como la actividad física (Neeper y col., 1996; Oliff y col., 1998; Russo-Neustadt y col., 1999; Cirelli and Tononi, 2000; Berchtold y col., 2001; Adlard y col., 2004; Griesbach y col., 2004), la restricción calórica (Lee y col., 2000), el sueño y el ritmo circadiano (Bova y col., 1998; Liang y col., 1998; Berchtold y col., 1999; Cirelli and Tononi, 2000) también parecen regular la expresión del gen de BDNF.

Otro importante cuerpo de trabajos ha demostrado que la expresión de BDNF en el SNC no está sólo regulada por factores fisiológicos sino que también se encuentra modificada bajo una serie de circunstancias patológicas.

Así por ejemplo se ha observado un aumento en los niveles de ARNm y/o proteína de BDNF en el SNC tras un coma hipoglucémico o isquemia cerebral (Lindvall y col., 1992; Merlio y col., 1993; Kokaia y col., 1998; Korhonen y col., 1998; revisado por Hughes y col., 1999) y en interneuronas situadas cerca de neuronas corticales de proyección axotomizadas (Wang y col., 1998). Niveles aumentados de BDNF se han observado en las neuronas del hipocampo después de isquemia cerebral (Miyake y col., 2002) y daño traumático (Grundy y col., 2000). El estrés, sin embargo, reduce la expresión de BDNF (Smith y col., 1995, Smith and Cizza, 1996; Ueyama y col., 1997; Altar, 1999; Adlard y col., 2004).

4.C.4.1. Regulación de la expresión de BDNF en patologías de los GB.

Existe también un gran número de trabajos centrados en los ganglios basales que estudian cambios en la expresión de BDNF mediante el uso de distintos modelos de enfermedades del movimiento como la enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington.

Así, lesiones del sistema dopaminérgico nigroestriado inducidas por una inyección en el estriado de 6-OHDA aumentan de forma transitoria los niveles de ARNm de BDNF en la parte lateral de la SNPR, sugiriendo un papel neuroprotector de esta neurotrofina en la remodelación del sistema dopaminérgico que sigue a la lesión (Aliaga y col., 2000). Igualmente, lesiones del HPM con 6-OHDA inducen la expresión de ARNm de *trkB* en el estriado (Numan y Seroogy, 1997), sugiriendo así una respuesta compensatoria de las neuronas estriatales debido a la pérdida del soporte trófico procedente del mesencéfalo ventral. Más recientemente se ha puesto de manifiesto la relación existente entre la pérdida de inervación por parte del sistema dopaminérgico nigroestriado y la inducción de BDNF y *trkB* en la vía nigroestriada y en el propio lugar de la lesión tras la axotomía del HPM (Venero y col., 2000).

La inyección en el estriado de distintos agonistas de los receptores de glutamato aumenta la expresión de ARNm de distintas neurotrofinas de forma diferencial (Canals y col., 1998). Así, tras la lesión excitotóxica causada por la inyección de KA o AMPA aumenta la expresión de ARNm de BDNF en esta estructura, pero esto no ocurre en el caso de QA o ACPD (agonista de los receptores ionotrópicos tipo NMDA y agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato; respectivamente). Este resultado sugiere que la regulación de la expresión de NTs podría estar involucrada en una acción autocrina/paracrina que podría contribuir a la modulación de la eficacia de la sinapsis y/o la supervivencia de neuronas estriatales tras una lesión excitotóxica. Un aumento de la expresión de BDNF se ha observado también en la corteza ipsilateral tras la lesión excitotóxica del estriado con KA o QA (Canals y col., 2001).

La expresión de BDNF en la corteza, estructura que como hemos visto en el apartado 4.C.3 proporciona esta NT al estriado por transporte anterógrado, está regulada por huntingtina; por tanto, una función importante de esta proteína podría ser la activación de la transcripción de BDNF (Zuccato y col., 2001). De hecho, la mayoría de las neuronas corticales que expresan BDNF también expresan Htt, y en un modelo de EH en la rata, la reducción de los niveles de Htt precede a la reducción de los niveles de BDNF (Fusco y col., 2003).

Por último, se ha observado en estudios post-mortem del cerebro de pacientes de Parkinson valores de BDNF en la SNPC inferiores a los detectados en individuos de la misma edad (Mogi y col., 1999; Parain y col., 1999). En el caso de enfermos de Huntington, Ferrer y col. (2000) encontraron una disminución en los niveles de proteína de BDNF que era específica de caudado y putamen, no observando esta disminución ni en la corteza ni en el hipocampo. Sin embargo, en un estudio posterior Zuccato y col. (2001) observaron una disminución de casi el 50% en los niveles de ARNm y proteína de BDNF en la corteza frontoparietal de pacientes de EH.

4.C.5. Funciones de BDNF

La función atribuida clásicamente a BDNF, como miembro de la familia de las neurotrofinas, ha sido la de promover la supervivencia y el mantenimiento fenotípico de poblaciones neuronales mediante el transporte retrógrado de este factor desde las células diana de estas poblaciones neuronales.

Actualmente, se le atribuyen a BDNF dos tipos de funciones, por un lado la regulación del desarrollo de sinapsis y mantenimiento de la plasticidad y modulación de éstas (revisada, entre otros, por Snider y Lichtman, 1996; Lessmann, 1998; Lu y Chow, 1999; McAllister y col., 1999; Schuman, 1999; Poo, 2001; Lu, 2003) y por otro lado, una función trófica como factor promotor de supervivencia de poblaciones neuronales tanto en el desarrollo y en el estado adulto como en la remodelación neuronal tras daño (ver revisiones de Connor y Dragunow, 1998; Siegel y Chauchan, 2000; Murer y col., 2001).

Las fuentes endógenas de BDNF para las neuronas incluyen el BDNF liberado por sus propias dendritas o las de neuronas adyacentes (bucles autocrinos/paracrinos), el que proviene de los axones de las neuronas de sus aferencias (BDNF transportado anterógradamente) o el que proviene de sus tejidos diana (BDNF transportado retrógradamente). Por ejemplo, en el complejo de los GB, la expresión tanto de ARNm y proteína de BDNF como de su receptor *trkB* en las neuronas dopaminérgicas de la SN (descrito en el apartado 4.C.1), así como el hecho de que estas neuronas respondan a BDNF, sugiere la existencia de este tipo de interacciones autocrinas/paracrinas. Asimismo, si se administra BDNF en el estriado de forma exógena éste es retrógradamente transportado a la SNPC (descrito en el apartado 4.C.3). En el caso de las neuronas del estriado, que no contienen ARNm de BDNF pero sí proteína de BDNF y *trkB*, se ha demostrado que el BDNF les llega mediante transporte anterógrado desde sus aferencias (descrito en el apartado 4.C.3).

La hipótesis de que BDNF podría tener un papel en la plasticidad de las sinapsis fue formulada basándose en dos observaciones: 1, la expresión de neurotrofinas es regulada por la actividad neuronal (desarrollado en 4.C.4); y 2, las neurotrofinas pueden modular la eficacia de la transmisión sináptica así como el crecimiento y la "supervivencia" de axones y dendritas, los elementos estructurales necesarios para la sinaptogénesis (Thoenen, 1995; Berninger y Poo, 1996; Bonhoeffer, 1996; Katz y Shatz, 1996; Lu y Figurov, 1997; Lu, 2003).

Otras observaciones que sugieren un papel de BDNF como neurotransmisor en condiciones fisiológicas normales son el transporte anterógrado de este factor, así como su distribución dentro de la célula (Altar y DiStefano, 1998; Mufson y col., 1999). Más aún, infusiones de BDNF en los cuerpos celulares de neuronas del SNC de adultos pueden aumentar la tasa de descarga de potenciales espontáneos, la descarga de neurotransmisores, y el metabolismo y expresión de enzimas biosintéticas de neurotransmisores en neuronas colinérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas o peptidérgicas (revisado por Lindsay y col., 1994; Thoenen, 1995; Snider y Lichtman, 1996). Otros efectos de BDNF son el aumento de la actividad eléctrica y de la concentración intracelular de Ca^{2+} en cultivos neuronales del hipocampo y la corteza (ver Thoenen, 1995; y Lewin y Barde, 1996 para revisión).

La función sináptica de las neurotrofinas fue descubierta por primera vez en cultivos mixtos de neuronas motoras-células musculares de anfibio. Los autores observaron que el tratamiento de estos cultivos con BDNF aumentaba la actividad eléctrica de las células musculares inervadas (Lohof y col., 1993).

BDNF facilita la LTP de forma aguda en las sinapsis de la zona CA1 del hipocampo (Korte y col., 1995; Figurov y col., 1996; Patterson y col., 1996). En la corteza visual se ha demostrado que BDNF facilita también la LTP (Akaneya y col, 1997, Huber y col., 1998; Jiang y col., 2001) y atenúa la depresión a largo plazo (LTD) en las sinapsis de las capas II/III de ratas jóvenes adultas (Akaneya y col, 1996; Huber y col, 1998; Kinoshita y col., 1999; Kumura y col., 2000).

BDNF no sólo tiene un papel en la regulación a corto plazo del desarrollo y mantenimiento de sinapsis sino que también muestra efectos reguladores a largo plazo en la plasticidad de éstas. La aplicación crónica de BDNF modula el crecimiento de axones y dendritas en el SNC, particularmente en la corteza visual (Cohen-Cory y Fraser, 1995; McAllister y col., 1995). BDNF también regula a largo plazo sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas en el SNC (Rutherford y col., 1998; Vicario-Abejón y col., 1998; Huang y col., 1999; Sherwood y Lo, 1999).

Experimentos recientes, usando un tipo de ratón que selectivamente no expresa BDNF en la corteza, han demostrado que BDNF es necesario para el mantenimiento de la morfología de las dendritas en esta estructura. De hecho, la falta de esta NT da lugar a una reducción en el tamaño celular y en la complejidad de las capas II/III de la corteza (Gorski y col., 2003b). Asimismo, la falta selectiva de *trkB* en las neuronas piramidales de la corteza cerebral da lugar a una alteración en la arborización dendrítica, observándose también compresión de las capas corticales II/III y V (Xu y col., 2000).

Se ha propuesto que los cambios en las sinapsis regulados por una acción a largo plazo de BDNF están implicados en mecanismos de aprendizaje y memoria. En este sentido, ratones heterocigóticos para el gen de BDNF mostraron dificultades de aprendizaje respecto a ratones controles con ambas copias del gen de BDNF intactas (Linnarsson y col., 1997). También se ha observado una disminución en la capacidad de aprendizaje en ratones con una mutación homocigótica del gen de *trkB* o del gen de BDNF restringida al cerebro anterior (Minichiello y col., 1999; Gorski y col., 2003a; respectivamente).

La otra función fundamental de BDNF es su papel trófico en la supervivencia y mantenimiento de poblaciones neuronales, tanto durante el desarrollo como en el estado adulto, así como su demostrada acción neuroprotectora frente a agentes citotóxicos.

Los estudios en ratones modificados genéticamente para no expresar BDNF o su receptor *trkB* han demostrado como esta NT es fundamental para la supervivencia durante el desarrollo de distintas subpoblaciones neuronales del sistema nervioso periférico (Snider, 1994). En contraste con esta situación en el SNP, el papel principal de BDNF en el SNC parece ser la regulación de la diferenciación a nivel bioquímico y morfológico, ya que no hay evidencia de que haya una reducción apreciable de neuronas en el SNC de ratones que no expresan BDNF o *trkB*, aparte de déficit en la expresión de parvalbúmina, calbindina, y neuropéptido Y, y de defectos en el cerebelo (para revisión sobre las pérdidas neuronales observadas en ratones modificados genéticamente para ser deficientes en BDNF o *trkB*, ver Huang y Reichardt, 2001). Concretamente en el estriado, la pérdida de BDNF por ablación de la corteza o por mutación del gen da lugar a una reducción en la expresión de parvalbúmina, calbindina y la fosfoproteína regulada por dopamina DARPP-32 (Jones y col., 1994; Altar y col., 1997; Ivkovic y Ehrlich, 1999).

De cualquier forma, hasta ahora ha sido imposible estudiar los efectos a largo plazo de la ausencia de BDNF en las estructuras del SNC debido a la temprana letalidad de los ratones modificados genéticamente para no expresar BDNF o su receptor. Recientemente, el uso de ratones modificados genéticamente para no expresar BDNF específicamente en la corteza ha demostrado que esta NT se requiere para la supervivencia a largo plazo de las neuronas del estriado (Baquet y col., 2004). Asimismo, tanto el volumen de la corteza como del estriado estaba reducido en estos ratones, y aunque el número de neuronas espinosas de tamaño medio del estriado era similar al del adultos jóvenes controles, éstas eran de menor tamaño y sus dendritas eran más delgadas; además, tenían menos espinas dendríticas y de menor longitud. Estos resultados demostraron la importancia de BDNF en la regulación de las conexiones sinápticas entre la corteza y el estriado, resultados en la línea del importante papel de BDNF en el mantenimiento de las sinapsis que hemos descrito previamente en este apartado.

El papel promotor de la supervivencia y de la diferenciación celular por parte de BDNF sobre distintas poblaciones neuronales, así como la posible acción neuroprotectora de esta NT frente a distintos tipos de agentes citotóxicos se ha estudiado en numerosos trabajos *in vitro*.

En este sentido, Alderson y col. (1990) demostraron que BDNF promueve la supervivencia de neuronas colinérgicas embrionarias del *septum*, una de las poblaciones neuronales afectadas en la enfermedad de Alzheimer. En este estudio, BDNF también demostró causar un aumento de la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación del neurotransmisor Ach (colinacetiltransferasa y acetilcolinesterasa, respectivamente). Estos resultados fueron confirmados en estudios posteriores (Knüsel y col., 1991; Nonomura y Hatanaka, 1992; Friedman y col., 1995; Nonomura y col., 1995; Abiru y col., 1996; Ha y col., 1996, 1999; Nonner y col., 1996; Hashimoto y col., 1999).

Los primeros estudios realizados para determinar los posibles efectos de la administración de BDNF en cultivos de neuronas del hipocampo no demostraron ningún efecto promotor de la supervivencia por parte de esta neurotrofina (Ip y col., 1993), aunque estas neuronas expresaban *trkB* y mostraban cambios fenotípicos tras la administración de BDNF (aumento de la expresión de cFos, calbindina y acetilcolinesterasa). Sin embargo, Lowenstein y Arsenault (1996) sí encontraron evidencias de que BDNF administrado de forma exógena aumentaba la supervivencia de neuronas del giro dentado del hipocampo. También fue muy interesante el trabajo de Shetty y Turner (1998) en el que demostraron que la administración de BDNF promovía la diferenciación de células madres del hipocampo en neuronas piramidales, y aumentaba la supervivencia de estas neuronas piramidales del hipocampo que acababan de diferenciarse.

BDNF también ha demostrado promover la supervivencia en cultivo de neuronas de la corteza (Ghosh y col., 1994; Catapano y col., 2001), aunque posteriormente, en contradicción con estos trabajos, se ha observado que el número de neuronas corticales no es menor en el ratón modificado genéticamente para no expresar de forma selectiva esta NT en la corteza (Gorski y col., 2003b).

La mayoría de estudios realizados para evaluar si la administración de BDNF podía proteger cultivos de neuronas del cerebro anterior, de la corteza o del hipotálamo frente a diversos tipos de daño (excitotoxinas, privación de energía, privación de factores de crecimiento, concentraciones elevadas de radicales libres, etc) han demostrado un efecto beneficioso de esta neurotrofina (Shimohama y col., 1993; Cheng y Mattson, 1994; Mattson y col., 1995; Ha et al., 1996; Nonner y col., 1996; Pringle y col., 1996; Kew y Sofroniew, 1997; Kume y col., 1997; Ahn y col., 1998; Mitchell y col., 1998; Ohgoh y col., 1998; Hetman y col., 1999; Nitta y col., 1999; Noh y col., 1999; Tremblay y col., 1999).

Los primeros trabajos *in vitro* para estudiar la acción de BDNF sobre neuronas dopaminérgicas demostraron que la administración de esta neurotrofina evitaba la muerte espontánea de neuronas en cultivos primarios del mesencéfalo de rata (Hyman y col., 1991; Knüsel y col., 1991). Este efecto fue posteriormente confirmado en subsiguientes estudios (Beck y col., 1993; Hyman y col., 1994; Studer y col., 1995; Kriegstein y col., 1996; Ostergaard y col., 1996; Hoglinger y col., 1998; Engele, 1998; Sautter y col., 1998; Feng y col., 1999; Murer y col., 1999b). Estos trabajos también demostraron que BDNF promovía la diferenciación de neuronas dopaminérgicas. De hecho, las neuronas presentes en estos cultivos mostraban un aumento en la actividad TH, en la recaptación y el contenido de DA, un aumento en el tamaño del cuerpo celular y una mayor complejidad de las neuritas (Beck y col., 1993; Hyman y col., 1994; Studer y col., 1995; Ostergaard y col., 1996; Feng y col., 1999).

Asimismo, también se ha demostrado el efecto protector de BDNF en cultivos de neuronas dopaminérgicas frente al daño causado por toxinas como 6-OHDA, MPTP y su metabolito tóxico MPP+ (Beck y col., 1992; Spina y col., 1992; Fadda y col., 1993; Akaneya y col., 1995; Son y col., 1999).

En cultivos de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de embriones humanos también se han observado estas acciones de BDNF, tanto a nivel de aumento de la supervivencia como de aumento de la diferenciación (Zhou y col., 1994; Othberg y col., 1995; Kaddis y col., 1996; Studer y col., 1996; Thajeb y col., Hoglinger y col., 1998).

El trabajo de Hyman y col. (1994) demostró que BDNF no sólo tenía efectos beneficiosos sobre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral sino también sobre las neuronas GABAérgicas. Spenger y col. (1995) demostraron también un efecto beneficioso de BDNF tanto sobre neuronas dopaminérgicas como GABAérgicas y serotoninérgicas en cultivos del mesencefalo ventral.

En cultivos de neuronas del estriado, BDNF ha demostrado no sólo un efecto promotor de la supervivencia sino también de la diferenciación de las neuronas estriatales GABAérgicas (Mizuno y col., 1994; Nakao y col., 1995; Ventimiglia y col., 1995). BDNF también protege *in vitro* las neuronas estriatales cuando éstas son sometidas a un daño excitotóxico (Nakao y col., 1995; Gratacòs y col., 2001).

4.C.6. Neuroprotección con BDNF en modelos de neurodegeneración

Teniendo en cuenta los beneficios que reporta la administración de BDNF en cultivos de neuronas, se ha estudiado el potencial efecto terapéutico de esta neurotrofina en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas.

En modelos de la enfermedad de Alzheimer, la mayoría de los estudios coinciden en que la administración de BDNF proporciona protección parcial a las neuronas colinérgicas del cerebro anterior frente al daño inducido por axotomía o por destrucción de sus células diana (Knüsel y col., 1992; Morse y col., 1993; Widmer y col., 1993; Burke y col., 1994; Koliatsos y col., 1994; Venero y col., 1994b; Williams y col., 1996). De cualquier forma, los estudios anteriormente comentados también demostraron que BDNF no era tan eficaz en la protección de neuronas colinérgicas del cerebro anterior como lo era NGF.

También se ha estudiado la implicación neurotrófica de BDNF en un modelo de crisis epilépticas inducidas por la administración intraseptal de KA (Venero y Hefti, 1998; Revuelta y col., 2001). Lo más destacable de estos experimentos es que la gran inducción de BDNF que se observa en la corteza provocada por la crisis convulsiva corresponde a células resistentes a la muerte celular inducida por la crisis, con lo que se puede deducir que la expresión de BDNF confiere a las neuronas una mayor resistencia frente al daño.

Teniendo en cuenta que esta tesis se centra en el estudio de la expresión de BDNF en el área de los ganglios basales describiremos la acción protectora de BDNF en modelos de enfermedades neurodegenerativas de vías motoras del SNC como son la enfermedad de Huntington y la de Parkinson (ver tabla 3).

4.C.6.1. Neuroprotección con BDNF en modelos de neurodegeneración de los ganglios basales

Los primeros estudios *in vivo* con roedores para comprobar si la administración de BDNF podía proteger las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del daño producido por toxinas o axotomía no demostraron ningún efecto paliativo de esta neurotrofina (Knüsel y col., 1992; Lapchak y col., 1993a; Lucidi-Phillipi y col., 1995). Sin embargo, otros estudios que comentaremos a continuación sí demostraron efectos protectores de BDNF sobre neuronas dopaminérgicas en modelos de la EP con MPTP y 6-OHDA.

Los implantes supranigrales de fibroblastos transformados para secretar BDNF han demostrado proteger las neuronas dopaminérgicas de la SN de los efectos tóxicos que produce la inyección de MPP⁺ en el estriado (Frim y col., 1994; Galpern y col., 1996). En otros estudios con MPTP, BDNF también ha demostrado proteger las neuronas dopaminérgicas (Tsukahara y col., 1995; Kirschner y col., 1996; Hung y Lee, 1996).

En modelos de neurodegeneración mediante inyecciones de 6-OHDA, BDNF no sólo atenúa la pérdida de axones dopaminérgicos, sino también previene la asimetría rotacional que se produce en este modelo (Levivier y col., 1995; Shults y col., 1995; Yoshimoto y col., 1995; Yurek y col., 1996). Un estudio sobre la acción de infusiones de BDNF en un modelo de degeneración inducido por la perfusión de 6-OHDA en el estriado demostró un incremento en el metabolismo y recambio de dopamina y una mejora en la rotación inducida por amfetamina, a pesar de no mejorar la supervivencia neuronal, ni aumentar la plasticidad de las neuronas supervivientes (Altar y col., 1994a).

En otro modelo de la EP, la infusión de BDNF cerca de la SN sirvió para rescatar parcialmente las neuronas dopaminérgicas de la muerte inducida por axotomía (Hagg y col., 1998). Estos estudios sugieren que la administración de BDNF exógeno puede aumentar la supervivencia y/o promover la recuperación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo que sufran un daño.

Aparte de promover la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, inyecciones supranigrales de BDNF han demostrado atenuar también la pérdida de neuronas GABAérgicas de la SN en un modelo de degeneración mediante múltiples inyecciones de ácido iboténico en el estriado y en el globo pálido. Como esa toxina causa destrucción excitotóxica de neuronas, estos datos sugieren que el BDNF puede disminuir los efectos excitotóxicos del glutamato en la SN (Volpe y col., 1998). Este resultado concuerda con la protección observada *in vitro* de neuronas frente a excitotoxicidad mediada por la administración de BDNF (descrito en apartado 4.C.5).

Asimismo, BDNF también ha demostrado efectos neuroprotectores sobre las neuronas GABAérgicas del estriado en modelos de la EH mediante lesiones excitotóxicas con inyecciones intraestriatales de quinolínico (Martínez-Serrano y Björklund, 1996; Bemelmans y col., 1999; Pérez-Navarro y col., 1999, 2000; Kells y col., 2004) o con kainato (Gratacòs y col., 2001).

Tabla 3. Estudios de neuroprotección con BDNF en distintos modelos de lesión de los ganglios basales

Estudio	Modelo de lesión	Estructura a proteger	Administración de BDNF	Resultado
Knüsel y col., 1992	Corte del HPM (axotomía)	SNPC	Intraventricular, en el sitio de la lesión, en la SNPC	No protege
Lapchak y col., 1993a	Corte del HPM (axotomía)	SNPC	En la SNPC	No protege
Altar y col., 1994a	6-OHDA en el estriado	Axones de las neuronas de la SNPC en el estriado	En la SNPC	No protege, pero mejora la rotación inducida por amfetamina y aumenta la cantidad de DA en el estriado
Frim y col., 1994	MPP+ en el estriado	SNPC	Cerca de la SNPC, mediante fibroblastos modificados	Protege las neuronas de la SNPC
Leviver y col., 1995	6-OHDA en el estriado	SNPC	En el estriado, mediante fibroblastos modificados	Protege parcialmente los axones dopaminérgicos en el estriado y totalmente los cuerpos neuronales de la SNPC
Lucidi-Phillipi y col., 1995	6-OHDA	SNPC y sus axones en el estriado	En la SNPC, mediante fibroblastos modificados	No protege ni mejora el comportamiento rotacional
Shults y col., 1995	6-OHDA en el estriado	Axones de las neuronas de la SNPC en el estriado	En el estriado, previa a la lesión	Protege parcialmente los axones dopaminérgicos en el estriado y mejora la rotación
Yoshimoto y col., 1995	6-OHDA en la SNPC	Axones de las neuronas de la SNPC en el estriado	En el estriado, mediante astrocitos modificados	No protege los axones pero mejora la rotación inducida por amfetamina
Kirschner y col., 1996	MPP+ en el estriado de ratas recién nacidas	Estriado	Sistémica	Neuroprotección y disminución de estrés oxidativo inducido por MPP+
Hung y Lee, 1996	MPTP	Estriado y SNPC	En la SNPC	Protección
Martínez-Serrano y Björklund, 1996	QA en el estriado	Neuronas del estriado	Células madres de neuronas modificadas para secretar BDNF	Ligera protección

Estudio	Modelo de lesión	Estructura a proteger	Administración de BDNF	Resultado
Yurek y col., 1996	6-OHDA	Pérdida de DA en el estriado	BDNF en el estriado, más un trasplante de neuronas dopaminérgicas	Aumenta la integración funcional de las neuronas transplantadas en el estriado del huésped y mejora la rotación
Hagg y col., 1998	Corte del HPM (axotomía)	SNPC	Cerca de la SNPC	Protección (mayor cuanto más cerca del sitio de infusión de BDNF)
Volpe y col., 1998	Ácido iboténico en el estriado y GP	SNPR	Cerca de la SNPR	Protección
Berrelmans y col., 1998	QA en el estriado	Neuronas del estriado	Transfección del gen a neuronas estriatales mediante adenovirus	Protección
Pérez-Navarro y col., 1999	QA en el estriado	Neuronas de proyección del estriado	Líneas celulares modificadas para producir gran cantidad de BDNF	Disminuye tanto el halo de lesión como la atrofia inducida por el QA en las neuronas supervivientes
Pérez-Navarro y col., 2000	QA en el estriado	Neuronas de proyección del estriado	Líneas celulares modificadas para producir gran cantidad de BDNF	Protección de todos los tipos de neuronas de proyección del estriado
Gratacòs y col., 2001	KA en el estriado	Neuronas del estriado	Líneas celulares modificadas para producir gran cantidad de BDNF	Protección tanto de neuronas de proyección como de interneuronas del estriado
Kells y col., 2004	QA en el estriado	Neuronas del estriado	Transfección del gen a neuronas estriatales mediante adenovirus	Protección tanto de neuronas de proyección como de interneuronas NOS-inmunitivas del estriado

Esta tabla recoge los distintos estudios que se han llevado a cabo para determinar si BDNF administrado de forma exógena podría ser un agente neuroprotector en patologías de los ganglios basales, fundamentalmente en las enfermedades de Parkinson y Huntington. Puede observarse cómo la forma de administración de BDNF ha ido variando; actualmente se ha sustituido la infusión de esta neurotrofina por implantes de células (líneas celulares, astrucitos, fibroblastos, entre otros) genéticamente modificadas para secretar BDNF. 6-OHDA: 6-hidroxi dopamina; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro; DA: dopamina; GP: globo pálido; HPM: haz prosencefálico medial; KA: ácido kaínico; MPP+: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio; SNPC: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; NOS: óxido nítrico sintasa; QA: ácido quinolínico; SNPR: substantia nigra pars compacta; SNPR: substantia nigra pars reticulata.

OBJETIVOS

El trabajo que presentamos se encuadra dentro del estudio de la regulación de la expresión del factor derivado de cerebro (BDNF) en los ganglios basales.

Hay un gran número de evidencias que sugieren que la alteración en los niveles de factores neurotróficos debido a la edad u otros factores puede contribuir a la degeneración de las neuronas. De hecho, se ha propuesto que la pérdida de soporte trófico endógeno derivado del tejido nervioso para poblaciones neuronales concretas puede ser una base etiopatológica importante en enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.

Asimismo, la terapia con factores neurotróficos ha demostrado ser una de las aproximaciones terapéuticas más efectiva para prevenir la muerte de neuronas frente a distintos tipos de daño. De hecho, numerosos estudios de neuroprotección han demostrado la eficacia de la aplicación farmacológica de FNTs en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas. Más aún, como hemos visto en la introducción, los FNTs influyen en la supervivencia y proliferación celular, permiten el mantenimiento fenotípico de poblaciones neuronales, estimulan el buen funcionamiento de las células e influyen en la plasticidad sináptica.

Estos conceptos resaltan la importancia de examinar y estudiar los patrones de expresión de los factores de crecimiento antes mencionados a nivel de ARNm y proteína en aquellas áreas cerebrales relacionadas con enfermedades neurodegenerativas tanto en condiciones normales como patológicas, ya que es posible que los cambios en la regulación de factores neurotróficos específicos estén críticamente implicados en las cascadas de degeneración neuronal, o alternativamente, dichos cambios puedan estar relacionados con papeles potenciales de dichos factores neurotróficos en la remodelación plástica inducida por daño celular.

En esta tesis nos hemos centrado en la regulación de uno de estos FNT, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), en los ganglios basales, grupo de núcleos subcorticales cuya degeneración se asocia a las enfermedades de Huntington y Parkinson. Como hemos visto en la introducción, el BDNF ha demostrado tener acción citoprotectora en modelos animales de estas enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, los objetivos de este estudio han sido:

a) Estudiar la expresión de BDNF en los ganglios basales y áreas de la corteza relacionadas con éstos en distintos modelos de la enfermedad de Huntington. Estos modelos se basan en la inyección en el estriado de toxinas (KA o QA) que provocan la muerte de las neuronas mediante excitotoxicidad. Teniendo en cuenta un estudio previo de nuestro grupo (Venero y col., 2000) que demostraba que existe una relación entre la pérdida de comunicación de la SN con sus neuronas diana en el estriado y la expresión de BDNF en la SN, centramos principalmente nuestro trabajo en el estudio de la expresión de esta neurotrofina en la corteza y la SN cuando son destruidas sus neuronas diana en el estriado.

b) El gen de BDNF es uno de los genes regulados por actividad neuronal más estudiados (West y col., 2001). Por tanto, otro objetivo de este trabajo fue estudiar el patrón de actividad neuronal en la corteza y distintos núcleos de los GB (SN y NST) tras la lesión excitotóxica del estriado. La actividad neuronal se estudió mediante el análisis de la expresión de ARNm de cFos (Mitsikostas y Sánchez del Río, 2001; Steiner y Kitai, 2001). El estudio conjunto de la expresión de ARNm de BDNF y la actividad neuronal nos ha permitido establecer en qué centros de los GB la expresión de BDNF tras la lesión del estriado no es regulada por un aumento de la actividad neuronal sino exclusivamente por pérdida de tejido inervante.

c) El (2S:,2'R:,3'R)-2-(2'3'-dicarboxiciclopropil)glicina (DCG-IV) es un agonista del grupo II de los receptores metabotrópicos de glutamato que cuando es inyectado en estriado provoca una lesión comparable a la producida por agentes excitotóxicos (Venero y col., 2002). Por tanto, tras caracterizar el patrón de expresión de ARNm de BDNF en los GB con KA o QA, hemos estudiado la regulación de BDNF cuando el compuesto inyectado en estriado era DCG-IV con objeto de establecer si podría ser una herramienta eficaz en estudios sobre la expresión de esta neurotrofina.

d) Los estudios anteriormente descritos se centran en la regulación de la expresión de BDNF tras la ablación excitotóxica del estriado; sin embargo, existe en los GB otra estructura, la substantia nigra pars reticulata (SNPR), que también recibe aferencias glutamatérgicas (desde el NST) y que, por tanto, es susceptible de muerte neuronal por excitotoxicidad. En este sentido, hemos causado lesiones excitotóxicas de la SNPR con NMDA para estudiar si aumenta la expresión de BDNF en los GB tras este daño. Los cambios en la actividad neuronal como consecuencia de esta lesión también se ha estudiado.

Como conclusión, el objetivo de esta tesis es profundizar en el estudio de la regulación de la expresión de BDNF en el área de los GB. BDNF ha demostrado tanto in vitro como in vivo ser un agente protector de fenotipos neuronales afectados en enfermedades neurodegenerativas de los GB, incluyendo las enfermedades de Huntington y Parkinson, de ahí que el estudio de la regulación de la expresión de este factor neurotrófico en modelos de degeneración pueda proporcionar claves para combatir este tipo de enfermedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/EU), la normativa española (BOE 67/8509-12, 1988) y mediante técnicas aprobadas por el Comité Científico de la Universidad de Sevilla.

En todos los experimentos realizados se utilizaron ratas de la raza Wistar de 3 meses de edad criadas en nuestro laboratorio, con libre acceso a agua y comida (dieta de mantenimiento A. 04 de Panlab S.L.), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad.

2. REACTIVOS

El agonista de los receptores NMDA de glutamato (Glu), el ácido quinolínico (QA); el agonista AMPA/kainato, ácido kaínico (KA); y el bloqueador del transporte axonal, colchicina, fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. El agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato, 2S:2'R:3'R:-2-(2'3'-dicarboxiciclopropil)glicina (DCG-IV), fue suministrado por Tocris Cookson.

En la elaboración de las ribosondas empleadas en la técnica de hibridación *in situ* el medio empleado para el desarrollo y mantenimiento de *Escherichia coli* fue la Base de Caldo Luria suministrada por Cultimed y el Agar Bacteriológico adquirido a Biolife Italiana. El antibiótico empleado fue ampicilina (Sigma Chemical Co). El ADN plasmídico se obtuvo mediante un Plasmid Midi Kit de Quiagen. Los plásmidos fueron linearizados con enzimas de restricción adecuadas a cada sonda. Tanto el fenol como el cloroformo utilizados en la precipitación de este ADN fueron suministrados por Sigma Chemical Co. Para visualizar el ADN plasmídico tras cada paso se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa) teñidos con bromuro de etidio (Merck).

En los estudios de hibridación *in situ* se usó dietilpirocarbonato de Serva como inhibidor de las ribonucleasas a lo largo de todo el ensayo. Como marcador del ARNm se usó o uridina 5'-[α -tio] [^{35}S] trifosfato (UTP) de Amersham International o digoxigenin-11-UTP (Roche Molecular Biochemicals) dependiendo del tipo de sonda de ARNm requerida para el ensayo, radiactiva, para revelar mediante emulsión autorradiográfica, o no radioactiva pero unida a digoxigenina para poder revelar mediante un método cromogénico. Para la transcripción de la sonda, dependiendo del tipo de ésta, se empleó la polimerasa de ARN T3 o T7 de Promega, así como microcolumnas ProbeQuant G-50 de Amersham International para la separación del UTP no incorporado a la sonda. Para comprobar cuanta radiactividad había incorporado la sonda se empleó como líquido de centelleo Formula-989 LSC Cocktail de New England Nuclear.

Los reactivos de uso en el ensayo de hibridación *in situ* fueron de calidad para biología molecular. Los demás solventes y reactivos fueron de alto grado de pureza, obteniéndose todos ellos de los proveedores habituales.

Para la deshidratación y montaje de las secciones se utilizó xileno de Carlo Erba y DPX de BDH.

3. OPERACIONES

Las operaciones intracerebrales realizadas se practicaron mediante trepanación del cráneo, previa anestesia con hidrato de cloral (400 mg/kg de peso) y posicionamiento del animal en un estereotáxico (Kopf Instruments), conforme al atlas de cerebro de Patxinos y Watson (1986).

Los animales fueron sacrificados por decapitación, bien seis, doce o veinticuatro horas después de las intervenciones y sus cerebros congelados hasta su posterior empleo.

3.1. Lesión excitotóxica del estriado

Los animales se colocaron en el estereotáxico y las soluciones se inyectaron en el estriado izquierdo con una jeringa Hamilton posicionada a 0,5 mm rostral, 2,8 mm lateral y 6,5 mm ventral con respecto al punto Bregma. El flujo de inyección fue de 0,5 μ l/min y el volumen total inyectado de 2 μ l. El vehículo utilizado fue solución Ringer en todos los casos con Monastral Blue al 1% usado como trazador inerte para localizar el sitio de la inyección.

Los animales utilizados en los experimentos recibieron inyecciones intraestriatales unilaterales conteniendo, según el tratamiento correspondiente, 8 nmoles de ácido kaínico, 120 nmoles de ácido quinolínico o 20 nmoles de DCG-IV.

3.2. Bloqueo del transporte en la vía nigroestriada

El bloqueo del transporte axonal en la vía nigroestriada se realizó mediante una inyección de colchicina (20 μ g en 1 μ l, Sigma Chemical Co) en el haz prosencefálico medial izquierdo en las siguientes coordenadas relativas al punto Bregma: 3,8 mm caudal, 2,4 mm lateral y 7,8 mm ventral.

3.3. Lesión excitotóxica de la substantia nigra *pars reticulata* (SNPR)

Los animales se colocaron en el estereotáxico y las soluciones se inyectaron en la SNPR izquierda con una jeringa Hamilton posicionada a 5,8 mm caudal, 2,0 mm lateral y 8,0 mm ventral con respecto al punto Bregma. El flujo de inyección fue de 0,1 μ l/min y el volumen total inyectado de 0,5 μ l. El vehículo utilizado fue solución Ringer con Monastral Blue al 1%. Los animales utilizados en los experimentos recibieron inyecciones intranigrales unilaterales conteniendo 60 nmoles de N-metil-D-aspartato (NMDA).

4. HIBRIDACIÓN *IN SITU* ISOTÓPICA

4.1. Obtención de la ribosonda

En nuestro estudio usamos diferentes clones, los cuales fueron sembrados en placa de agar con medio de crecimiento Luria (LB) y ampicilina como antibiótico (100 µg/ml) e incubados a 37° C durante 24 h para conseguir colonias aisladas. Por cada clon, se resembró una colonia, esta vez en 25 ml de LB líquido y con la misma concentración de ampicilina, incubada a 37° C y agitación de 200 r.p.m. durante 16 h. Tras todo esto, se realizó la extracción del ADN plasmídico utilizando un Plasmid Midi Kit de Quiagen. A continuación se procedió a la linearización de los distintos plásmidos, incubando cada uno de ellos a 37° C y durante dos horas con la enzima de restricción correspondiente para obtener la sonda sentido y la antisentido. Por último, el ADN linearizado fue fenolizado y precipitado con etanol absoluto frío y acetato sódico 3 M (pH 5,3) para eliminar los restos de enzimas y sales remanentes tras las manipulaciones previas. Tras esto y tras cada paso intermedio, con objeto de la visualización y cuantificación del ADN, se realizó electroforesis de alícuotas de 1 µl de cada uno de los clones en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Una vez obtenidas las sondas sentido y antisentido se procedió a la transcripción de este ADN para conseguir las ribosondas sentido y antisentido de cada uno de los ARNm que iban a ser detectados. La mezcla de reacción contenía: 20 unidades de polimerasa (T3 o T7, dependiendo de cuál fuera la indicada para cada ribosonda), el tampón proporcionado con ésta, ATP, CTP y GTP cada uno a 1 mM, 125 µCi de [³⁵S] UTP 30 µM (1300 Ci/mmol), DTT 4 mM y 7,2 U de inhibidor de ribonucleasa. La reacción de marcaje transcurrió durante 2 h a 37° C y se detuvo con EDTA 0,5 M. Seguidamente se separó el isótopo incorporado al ARNc del que no lo fue mediante columnas de Sephadex y posterior centrifugación durante 2 min a 735 x g.

Los clones empleados fueron:

- El ADNc de BDNF clonado en PGEM-4Z como un inserto de 460-bp (Promega), amablemente cedido por Genentech. Para preparar las ribosondas sentido y antisentido de BDNF, este plásmido se linearizó con *HindIII* y *EcoRI*, respectivamente, y el ADN obtenido se usó como molde por la ARN polimerasa Sp6 o T7 (Research Biochemicals).

- Plásmidos pBluescript SK, conteniendo la secuencia que codifica la enzima ácido glutámico descarboxilasa 67 (GAD₆₇) como un inserto *EcoRI* de 3,2 kb (clones 14 y 18). Fueron amablemente cedidos por el Dr. A. Tobin (UCLA, Los Angeles). El ADNc de GAD₆₇ fue aislado de una librería de ADNc 1 gt-11 preparada a partir de ARN poli (A) del cerebro adulto de rata (Erlander y col, 1991). Para preparar el transcrito antisentido de GAD₆₇, el clon 14 se digirió con *Sall* y se usó como molde por la polimerasa T3. Para preparar el transcrito sentido de GAD₆₇, el clon 18 fue digerido también con *Sall* y usado como molde por la polimerasa de ARN T3.

- El ADNc de cFos de rata clonado en PGEM-4Z amablemente proporcionado por el Dr. P. Sokoloff (INSERM, París). El fragmento corresponde a los nucleótidos 588-795 del gen cFos de la rata. Para preparar la sonda antisentido, el plásmido fue linearizado con *EcoRI* y usado como molde por la polimerasa de ARN T7.

- Una sonda de ARNc para *trkB* capaz de detectar todos los transcritos conocidos de *trkB*, amablemente cedida por el Dr. R. Klein. Esta sonda fue obtenida mediante la linearización de PFRK16 (Klein y col., 1989), un plásmido derivado de plásmidos pBluescript que contiene un inserto de 483-bp del ADNc de *trkB* de ratón. Este fragmento de ADNc codifica una porción del dominio extracelular de *trkB* gp145 y *trkB* gp 95.

4.2. Reacción de hibridación

Las secciones de 12 μm se obtuvieron en criostato disponiéndose sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Una vez descongeladas se fijaron en paraformaldehído (PAF) al 4% durante 30 min, continuándose con tres pasos de lavado de 10 min cada uno en tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS). Para disminuir la unión inespecífica se trataron con trietanolamina 0,1 M pH 8,0 (1 min) y con anhídrido acético al 0,25% en trietanolamina 0,1 M (10 min). Se continuó con un lavado de 1 min en SSC 2X, preparado a partir de uno 20X (3 M de NaCl y 0,3 M de citrato sódico). A continuación, las secciones se deshidrataron mediante paso por soluciones con cantidades crecientes de etanol (30, 60, 90 y 100%) y secadas al aire. A continuación, se procedió a la hibridación de la sonda de [^{35}S]ARNc con su secuencia complementaria; previamente, la sonda se diluyó en el tampón de hibridación y se desnaturalizó a 80° C durante 5 min.

Dicho tampón se componía de formamida al 50%, solución Denhardt 0,02%, SSC 1X, Tris-HCl 50 mM, pirofosfato sódico 0,1%, ARN de levadura 0,1 mg/ml, esperma de salmón 0,1 mg/ml, EDTA 1 mM y sal sódica de sulfato de dextrano. La hibridación se llevó a cabo durante 3 h a 50° C, enjuagándose a continuación en dos soluciones de SSC 4X, la primera con DTT 20 mM. Seguidamente se sometieron a digestión con ribonucleasa (RNasa) a 37° C (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNasa A en NaCl 0,5 M, Tris-HCl 0,01 M y EDTA 1 mM, a pH 8,0) durante 30 min.

Para aumentar el rigor de la hibridación, las secciones se pasaron por una solución de SSC 2X con β -mercaptoetanol 0,02 M a 25° C durante toda la noche, y otra solución de SSC 0,1X a 60° C durante 1 h. Finalmente las secciones se deshidrataron en etanoles (30, 60, 90 y 100%) con acetato amónico 0,3 M y secadas al aire.

4.3. Detección y cuantificación de la señal de hibridación en la película de autorradiografía

Los portaobjetos se expusieron a una película de autorradiografía Betamax (Kodak) durante 4 días en el caso de TH y 7 días en el caso de BDNF, cFos, *trkB* y GAD.

Para el estudio de la expresión del ARNm en el caso de GAD se cuantificó la densidad óptica sobre película de autorradiografía. Las neuronas GABAérgicas se caracterizan por expresar grandes cantidades de ARNm de GAD (Ácido glutámico descarboxilasa), una enzima clave en la síntesis de GABA. Las sustancias usadas en este trabajo (KA, QA y DCG-IV) son particularmente tóxicas para la población GABAérgica, y como se señaló en el apartado 1.B de la introducción la gran mayoría de neuronas del estriado son de fenotipo GABAérgico. Por tanto, para estudiar la magnitud de la lesión en el estriado tras la inyección de estas neuroexcitotoxinas cuantificamos la extensión de la pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD, ya que se asume que la pérdida de ARNm de GAD indica degeneración de neuronas GABAérgicas. Para esto, se digitalizaron autorradiografías de todo el estriado siguiendo el eje rostrocaudal (una cada 5 secciones) y se delineó la lesión con la ayuda de un programa de análisis de imagen (AnalySIS, Soft Imaging System). Para cada sección analizada, se midió el área de pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD en milímetros cuadrados. El volumen de la lesión se calculó multiplicando la suma de todas las áreas medidas por la distancia entre las secciones analizadas (0,06 mm). La extensión de la lesión estriatal producida por la inyección de KA, QA o DCG-IV fue analizada 1 día tras la inducción de la lesión, que es el máximo tiempo postlesión estudiado en cuanto a la expresión de ARNm de BDNF, *trkB* y cFos.

En este estudio también hemos causado lesiones excitotóxicas de la SNPR, estructura cuya población neuronal es fundamentalmente de fenotipo GABAérgico. Consecuentemente, también hemos usado la pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD para poner de manifiesto la neurodegeneración que se produce en esta estructura tras la inyección de 60 nmoles de NMDA.

Para la cuantificación de la expresión de ARNm de *trkB* en las secciones de cerebro, las películas de autorradiografía se analizaron mediante densitometría usando el programa de análisis de imagen AnalySIS. Este sistema identifica objetos mediante una ventana definida por el usuario y mide la densidad óptica de estos objetos basándose en una escala de densidades de gris, obteniéndose en esta cuantificación valores relativos. La señal de hibridación específica de ARNm de *trkB* se determina restándole a los valores de hibridación obtenidos con la ribosonda antisentido los valores obtenidos con la sonda sentido.

En el caso de BDNF y cFos, si observábamos en la película fotográfica que la señal de hibridación en una determinada sección era homogénea y aceptable, esa sección era procesada para emulsión autorradiográfica.

4.4. Emulsión autorradiográfica

Los portaobjetos se impregnaron de emulsión LM-1 (Amersham) diluida 1:1 con agua, manteniéndose en la oscuridad a 4° C durante tres veces el tiempo de exposición de la película de autorradiografía (Michael y Priestley, 1996).

A continuación, las secciones se revelaron durante 5 min a 15° C con revelador D-19 (Kodak) y se fijaron durante 10 min en fijador (Kodak), también a 15° C. Tras la fijación, se trataron con una solución de tiosulfato de sodio (Sigma) al 5%, para conseguir una señal más estable. Finalmente, las secciones se tiñeron con cresil violeta al 0,5%, pH 3,8, se deshidratadas y se montaron.

4.5. Cuantificación de la señal de hibridación *in situ* tras el tratamiento con la emulsión autorradiográfica

La cuantificación de la señal específica de hibridación de BDNF y de cFos se realizó a nivel celular mediante la medida de la densidad de granos de plata sobre cada célula usando un programa de análisis de imagen (AnalySYS). El sistema se calibró midiendo densidades crecientes de granos de plata. El nivel de ruido oscilaba entre 2-4 granos por célula tanto para la sonda antisentido de BDNF como de cFos, lo que no se diferenciaba de los resultados obtenidos usando la sonda sentido correspondiente. Este bajo nivel de ruido, junto con los enormes niveles de expresión de ARNm de BDNF y cFos detectados tras la lesión estriatal, aseguran la fiabilidad de la cuantificación. En algunos casos, los niveles control de ARNm estaban incluso por debajo o muy cercanos al límite de detección, como ocurre con el ARNm de BDNF en SN o los niveles de ARNm de cFos en el SNC en las condiciones de nuestro estudio. Cuando esto ocurrió, los valores control se obtuvieron mediante la medida del número de granos de plata por célula aunque el número de granos no excediese dos veces el nivel de ruido.

5. HIBRIDACIÓN *IN SITU* ISOTÓPICA Y NO ISOTÓPICA COMBINADAS

5.1. Obtención de la ribosonda

La sonda isotópica se obtuvo como se describe en el apartado anterior. La mezcla de reacción para la obtención de la sonda no radiactiva contenía: 20 unidades de polimerasa, el tampón proporcionado con ésta, ATP, CTP y GTP cada uno a 1 mM, 1 mM de digoxigenin-11-UTP (Dig-UTP), DTT 4 mM y 7,2 U de inhibidor de ribonucleasa. La reacción de marcaje transcurrió durante 2 h a 37° C y fue parada con EDTA 0,5 M. Seguidamente se separó el dig-UTP incorporado al ARNc del que no lo fue mediante columnas de Sephadex y posterior centrifugación durante 2 min a 735 x g.

El molde de ADN usado para la preparación de la ribosonda de cFos fue el mismo que se describió en el apartado de preparación de la sonda radioactiva. En el caso de la sonda de ARNm de TH se utilizó el ADNc de TH de rata clonado en PGEM-4Z como un inserto de *EcoRI-KpnI* de 380-pb, que fue amablemente proporcionado por el Dr. P. Sokoloff (INSERM, París). Para preparar la ribosonda antisentido de TH este plásmido se linearizó con *EcoRI* y se usó como molde por la ARN polimerasa T7. Para preparar la ribosonda sentido de TH, el plásmido se linearizó con *SmaI* y se usó como molde por la ARN polimerasa Sp6.

5.2. Reacción de hibridación

En este caso, la preparación de las secciones para la reacción de hibridación comenzó como se ha descrito en el apartado anterior. Tras la fijación en PAF y los tres lavados correspondientes, las secciones se trataron durante 10 minutos a 37°C con proteinasa K (1 µg/mL, Fluka, en tampón Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,05 M, pH=8). Tras este tratamiento, se hicieron dos lavados en agua cada uno de 1 minuto. Desde aquí y hasta el momento de la reacción de hibridación, el protocolo seguido fue similar al descrito en el apartado anterior.

La reacción de hibridación se realizó con las dos sondas simultáneamente. En el primer lavado tras la hibridación, la solución de SSC 4x contenía sólo 10 mM de DTT. En este caso, las secciones, una vez acabados los lavados para eliminar uniones inespecíficas de la ribosonda al ARNm, se trataron para revelar cromogénicamente la sonda no isotópica.

5.3. Revelado de la sonda no isotópica

Los portaobjetos se incubaron en tampón A (Tris-HCl 100mM, NaCl 150 mM, pH=7,5) conteniendo 2% de suero de oveja, 0,1% Tween-20 y 2% BSA durante 30 minutos para proceder al bloqueo de sitios inespecíficos de unión del anticuerpo anti-digoxigenina.

A continuación se les aplicó el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) diluido 1:250 en tampón A con 1% de suero de oveja y 0,1% de Tween-20 (2 horas a 37° C). Tras la incubación se hicieron tres lavados con agitación de 10 minutos cada uno con tampón A conteniendo 0,1% de Tween-20. Antes del revelado se hizo un lavado con tampón B (Tris-HCl 100mM, NaCl 100 mM, MgCl₂-6H₂O, pH=9,5) durante 10 minutos con agitación con objeto de acondicionar las secciones a la solución de revelado. La solución reveladora (10 mL) contenía levamisole (2,4 mg, un inhibidor de la fosfatasa alcalina endógena), nitroazul de tetrazolio (3,4 mg) y BCIP (1,7 mg). El revelado se hizo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 1-3 h.

Una vez revelada la sonda no isotópica, los portaobjetos se deshidrataron en soluciones de concentraciones crecientes de etanol y secados al aire. Tras el secado se expusieron a la película de autorradiografía como se describe en el apartado anterior. Después de la exposición se trataron con emulsión autorradiográfica tal y como se describe en el apartado anterior con objeto de visualizar las sondas marcadas con ³⁵S, con la salvedad de que una vez revelada la emulsión las secciones no se tiñeron con cresil violeta ya que esta tinción enmascararía la tinción con la sonda no isotópica.

5.4. Cuantificación de la señal en la técnica de doble hibridación *in situ*

Para el caso particular del ensayo de doble hibridación *in situ* realizado en secciones de la corteza con objeto de estudiar la expresión de ARNm de BDNF y de cFos, cuantificamos los niveles de ambos mensajeros en cada célula individual con objeto de establecer una relación entre ellos.

Como en este ensayo la ribosonda usada para localizar ARNm de BDNF estaba marcada radioactivamente, para cuantificar los niveles de BDNF medimos la densidad de granos de plata sobre cada célula tras el tratamiento con la emulsión autorradiográfica.

Como la ribosonda usada para localizar ARNm de cFos estaba marcada con digoxigenin-UTP, cuyo revelado mediante un método cromogénico descrito en el apartado anterior da lugar a un color azul, los niveles de ARNm de cFos fueron medidos mediante densitometría. Para ello, medimos la densidad de la tinción azul sobre cada célula individual, obteniendo un valor relativo de expresión de ARNm de cFos para cada célula mediante el uso de una escala calibrada de densidad de azules. Después de la cuantificación de ambos mensajeros en cada célula individual, hicimos un análisis para comprobar si ambos parámetros estaban relacionados mediante el uso del programa de análisis estadístico StatGraphic Plus 7.1.

6. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE DE LAS SECCIONES

Para la deshidratación de las secciones se utilizó un procedimiento general mediante el cual se sumergieron en cada una de las siguientes concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 85, 95, 100%) durante 5 minutos y seguidamente se mantuvieron durante 15 minutos en xileno. El medio de montaje utilizado una vez completado el proceso fue DPX.

7. ESTADÍSTICA

Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar (D.E.). Las diferencias observadas entre medias se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Scheffé usando el programa de análisis estadístico StatGraphic Plus 7.1.

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO CON KA O QA EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LA SUBSTANTIA NIGRA Y LA CORTEZA

1.A. Extensión de la lesión provocada en el estriado por la inyección de KA o QA

La lesión excitotóxica del estriado se puso de manifiesto mediante el análisis del patrón de expresión de ARNm de GAD (descrito en Materiales y métodos) ya que la expresión de este mensajero es una característica específica de neuronas GABAérgicas, fenotipo neuronal predominante en el estriado. Por tanto, se asume que la zona lesionada es aquella donde encontramos pérdida de la señal de hibridación de ARNm de GAD. La expresión de ARNm de GAD en el estriado se estudió a las 24 h tras la inyección de KA o QA, que fue el tiempo de estudio de expresión de ARNm de BDNF más posterior. El tamaño de la lesión fue de $14,0 \pm 2,8 \text{ mm}^3$ en el caso de 6 nmol de KA y $12,1 \pm 1,3 \text{ mm}^3$ en el caso de 120 nm de QA (Ver figura 1).

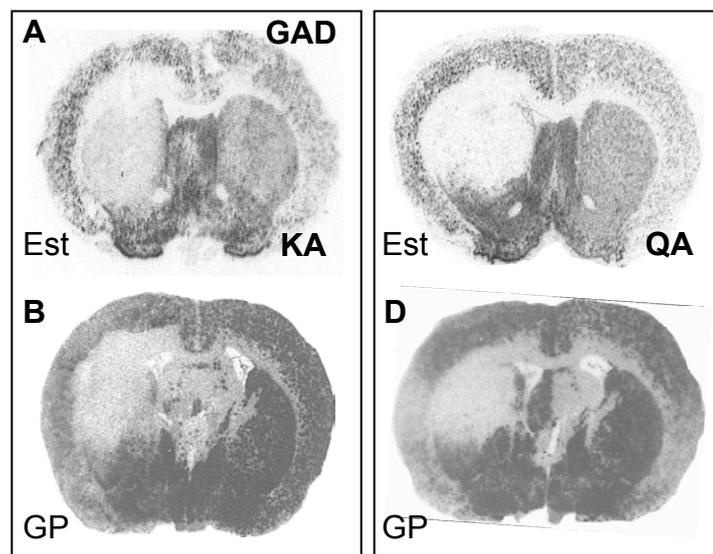


Figura 1. Autorradiografías mostrando la lesión que se produce en el estriado (Est) (A y C) y que se extiende también al globo pálido (GP) (B y D) después de una inyección de KA (A y B; respectivamente) o QA (C y D). La lesión es puesta de manifiesto mediante la pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD.

1.B. La lesión excitotóxica provocada en el estriado con KA o QA aumenta la expresión de ARNm de BDNF en la SN

Las neuronas dopaminérgicas de la SNPC proyectan sus axones sobre el estriado, de ahí que estudiásemos que es lo que ocurre en esta estructura cuando lesionamos su tejido diana. Los estudios con la técnica de hibridación *in situ* mostraron un aumento de la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC ipsilateral a la inyección intraestriatal de KA o QA.

Este aumento en la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC fue máximo 12 h después de producida la lesión en el estriado (534 ± 141 y $307 \pm 122\%$ de los valores control para KA y QA, respectivamente; $p < 0,01$). En el último tiempo tras la lesión estudiado, 24 h, los niveles de BDNF continuaban siendo superiores a los niveles control tanto en el caso de KA como en el caso de QA (477 ± 155 y $250 \pm 113\%$ de los valores control, respectivamente; $p < 0,01$) (Figuras 2 y 3).

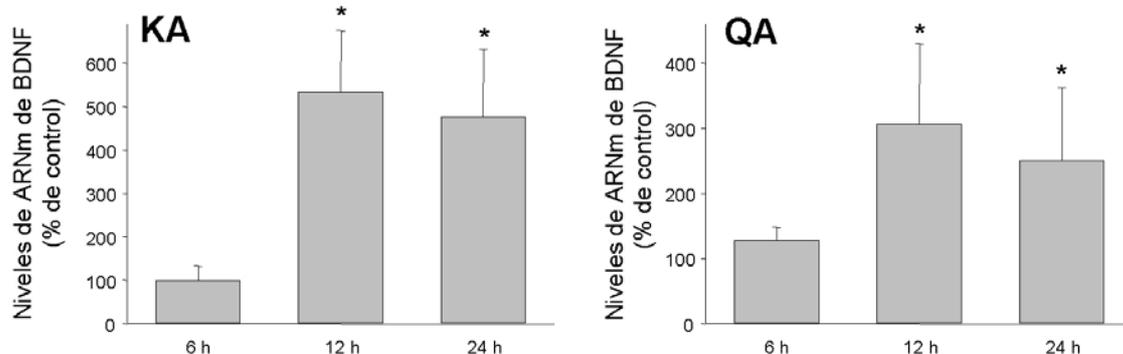


Figura 2. Histogramas representando la cuantificación de ARNm de BDNF en la SNPC tras la lesión excitotóxica con KA y QA, respectivamente. Los datos representan la media \pm D.E. y se expresan como porcentajes de los controles. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffe ($*p < 0,01$ comparado con controles).

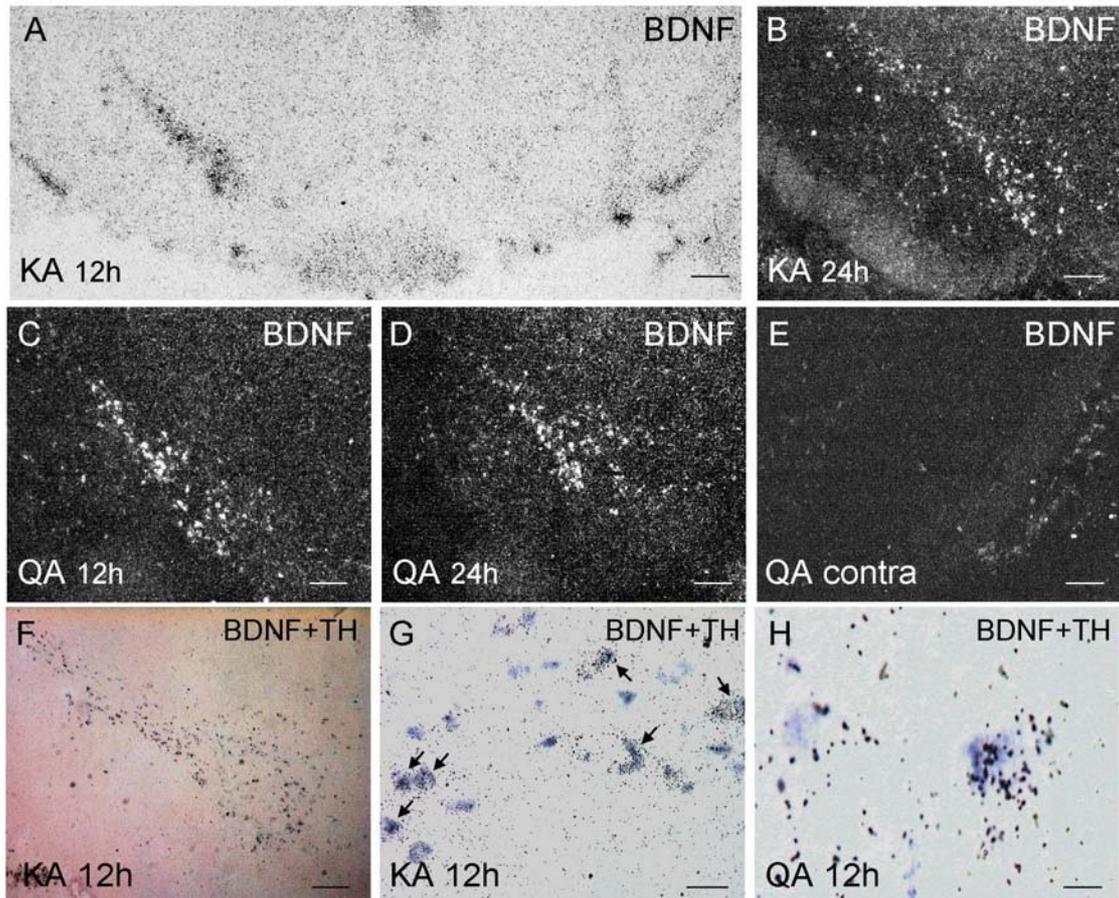


Figura 3. Las lesiones excitotóxicas del estriado con KA (A y B) o QA (C-E) incrementan los niveles de ARNm de BDNF en la SNPC ipsilateral al lado lesionado. F-H: un ensayo de doble hibridación *in situ* usando simultáneamente una sonda radioactiva para localizar ARNm de BDNF (revelado mediante emulsión autorradiográfica, granos negros) y una sonda no radioactiva para localizar ARNm de TH (revelado cromogénico, manchas azules) nos permitió demostrar que las células que expresaban ARNm de BDNF en la SNPR en respuesta a la lesión excitotóxica del estriado eran neuronas dopaminérgicas ya que todas las células que expresaban ARNm de BDNF (marcadas con granos negros) estaban también marcadas en azul, es decir, eran células que expresaban ARNm de TH, siendo la TH una enzima característica de neuronas dopaminérgicas. Barras de escala: A, 350 μm ; B-F, 200 μm ; G, 25 μm ; H, 10 μm .

1.B.1. Las células donde encontramos ARNm de BDNF en la SNPC son neuronas dopaminérgicas

Para comprobar si las células donde encontrábamos expresión de mensajero de BDNF en la SNPC eran neuronas dopaminérgicas llevamos a cabo un ensayo de hibridación *in situ* con doble marcaje donde una de las sondas (en este caso, la de BDNF) era radioactiva (marcada con ³⁵S-UTP) y fue detectada mediante emulsión autorradiográfica, y la otra ribosonda era no radioactiva (en este caso, una sonda del ARNm de la enzima TH, marcada con digoxigenin-UTP), que se detectó mediante un método cromogénico. Usamos una sonda de TH como marcador de neuronas dopaminérgicas ya que esta enzima es una de las enzimas claves en la síntesis de dopamina, y por tanto, es un marcador específico de este fenotipo neuronal.

Con esta técnica comprobamos que en los lugares donde aparecían acumulaciones de ARNm de BDNF también aparecían acumulaciones de ARNm de TH, lo que evidencia que las células que expresan ARNm de BDNF en la SNPC en respuesta a la lesión excitotóxica del estriado con KA o QA son neuronas dopaminérgicas (Fig. 3, fotos F-H). Es remarcable el hecho de que en todas las células donde encontrábamos expresión de ARNm de BDNF también encontrábamos expresión de ARNm de TH, pero no en todas las células que expresaban mensajero de TH se detectaba expresión de ARNm de BDNF, lo que concuerda con estudios previos que demostraban que sólo una subpoblación de neuronas dopaminérgicas es capaz de expresar BDNF (Seroogy y col., 1994).

1.C. La lesión excitotóxica provocada en el estriado con KA o QA aumenta la expresión de ARNm de BDNF en la corteza

Otra de las estructuras que proyecta sus axones sobre el estriado es la corteza. Los estudios con la técnica de hibridación *in situ* mostraron un aumento en los niveles de ARNm de BDNF en la corteza tras la inyección de KA o QA, aunque el patrón de expresión fue diferente para cada una de estas neurotoxinas (Fig. 4). El aumento en los niveles de ARNm de BDNF estuvo restringido a las capas II/III y V de la corteza, así como a la corteza insular y a la piriforme, siendo remarcable el hecho de que todas estas zonas proyectan axones sobre el estriado.

En el caso de la inyección con KA (Fig. 4, A-C, H, I, M, N) a las 6 h tras la lesión encontramos aumento en los valores de ARNm de BDNF en la corteza ipsilateral al estriado lesionado (incremento medio del 776% respecto a controles) (Tabla 1). Sin embargo, 12 h tras la lesión, los niveles de BDNF no sólo están elevados en la corteza ipsilateral, sino también en la corteza contralateral. En este momento es también cuando los niveles de ARNm de BDNF son máximos (Tabla 1). Después de 24 h, los valores de ARNm de BDNF son similares a los valores control en todas las áreas de la corteza examinadas, excepto en la corteza piriforme y la insular (Tabla 1).

Cuando la inyección intraestriatal fue de QA (Fig. 4, D-F, J, K, O, P) los niveles de ARNm de BDNF fueron máximos 6 h tras la lesión (incremento medio del 711% respecto a controles), pero, en este caso, en todos los tiempos tras la lesión estudiados, el aumento en la expresión de ARNm de BDNF estuvo restringido a la corteza ipsilateral al estriado lesionado (Tabla 1).

También es destacable la aparición de numerosas células expresando ARNm de BDNF en el estriado (Fig. 4).

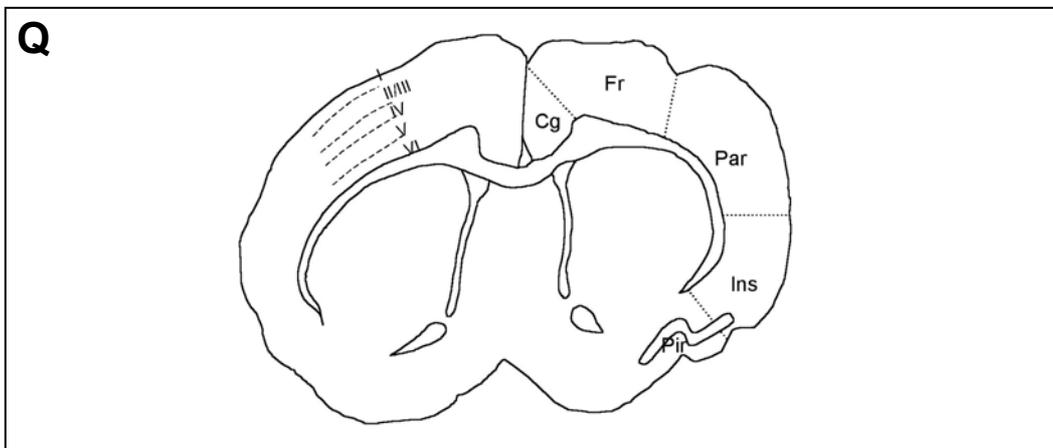
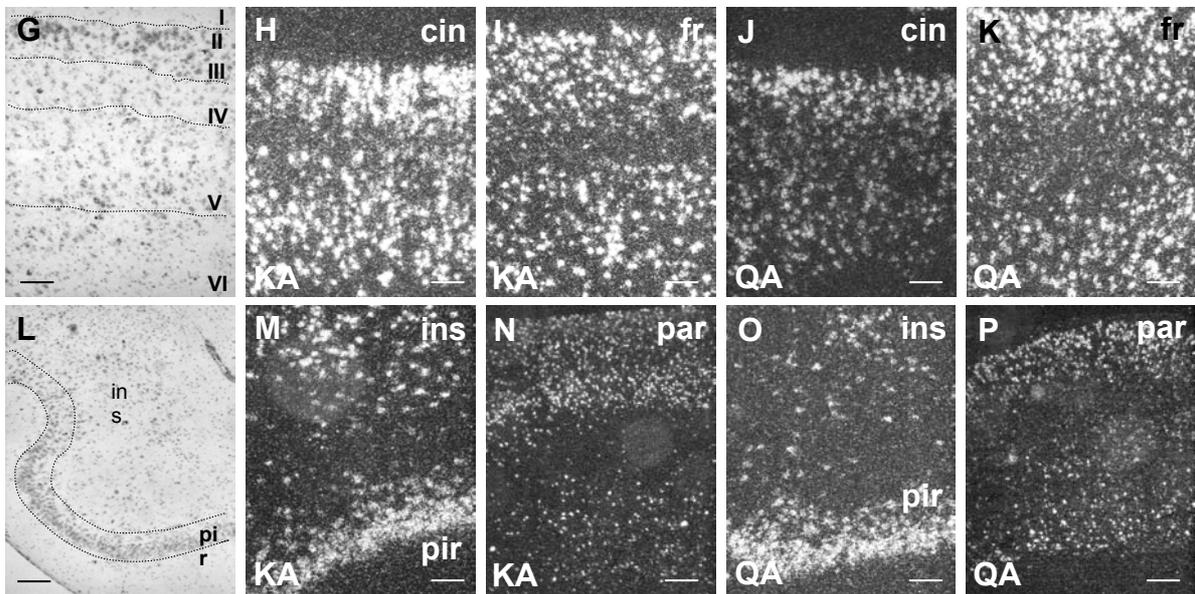
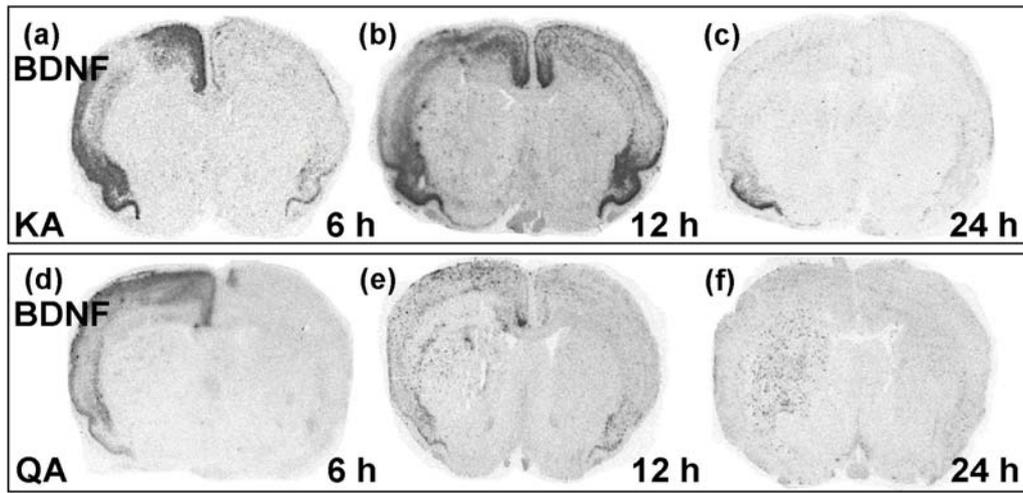


Figura 4. La lesión excitotóxica del estriado con KA o QA aumenta los niveles de ARNm de BDNF en la corteza (a-f): autorradiografías mostrando el aumento de mensajero de BDNF en la corteza 6, 12 y 24 h tras la lesión. En estas autorradiografías podemos observar como, mientras que en el caso de la inyección intrastriatal de QA la sobreexpresión de ARNm en la corteza fue estrictamente ipsilateral al estriado lesionado, en el caso de KA, la sobreexpresión de ARNm de BDNF se extendió también al hemisferio contralateral. Las lesiones estriatales también inducen expresión de ARNm de BDNF en el estriado, lo que es particularmente evidente en (f). G-P: fotografías de alta magnificación en las que pueden apreciarse los altos niveles de ARNm de BDNF en las capas II/III y V de las cortezas cingular (H y J), frontal (I y K) y parietal (N y P) y en las cortezas insular y piriforme (M y O). En G se encuentran señaladas las típicas capas de la corteza I–VI. En L se encuentran señaladas la corteza insular y la corteza piriforme. Q: esquema que representa las áreas de la corteza donde hemos realizado la cuantificación de los niveles de ARNm de BDNF. Asimismo también se representan las distintas capas de la corteza. Barras de escala: 100 μm , excepto en L, M y O, 50 μm .

Tabla 1. Niveles de ARNm de BDNF en diferentes áreas de la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado

		Corteza cingular			Corteza frontal			Corteza parietal			Corteza piforme		Corteza insular
		Capa II/III	Capa V	Capa III/III	Capa V	Capa III/III	Capa V	Capa III/III	Capa V	Capa III/III	Capa V	Capa III/III	Capa V
QA	6 h	Ipsi	970 ± 99*	760 ± 126*	638 ± 76*	627 ± 182*	676 ± 165*	607 ± 133*	688 ± 151*	725 ± 96*			
		Contra	111 ± 15	114 ± 18	117 ± 23	112 ± 18	99 ± 10	117 ± 15	114 ± 22	98 ± 23			
	12 h	Ipsi	413 ± 157*	488 ± 209*	480 ± 160*	225 ± 96*	431 ± 178*	263 ± 98*	372 ± 140*	488 ± 157*			
		Contra	95 ± 12	99 ± 15	97 ± 28	102 ± 19	105 ± 5	110 ± 17	105 ± 22	97 ± 13			
	24 h	Ipsi	108 ± 14	114 ± 8	112 ± 16	106 ± 20	98 ± 15	110 ± 12	101 ± 10	114 ± 8			
		Contra	94 ± 12	96 ± 12	105 ± 14	108 ± 18	96 ± 9	105 ± 14	106 ± 8	92 ± 14			
KA	6 h	Ipsi	879 ± 34*	540 ± 71*	813 ± 152*	768 ± 94*	710 ± 83*	505 ± 150*	1092 ± 99*	898 ± 128*			
		Contra	533 ± 92*	553 ± 78*	109 ± 12	125 ± 15	118 ± 23	112 ± 18	108 ± 5	103 ± 25			
	12 h	Ipsi	1552 ± 172*	964 ± 97*	990 ± 109*	759 ± 167*	822 ± 154*	404 ± 116*	1411 ± 121*	1083 ± 136*			
		Contra	1278 ± 178*	914 ± 172*	747 ± 140*	633 ± 198*	407 ± 83*	446 ± 110*	973 ± 73*	921 ± 111*			
	24 h	Ipsi	121 ± 19	129 ± 15	118 ± 23	122 ± 19	108 ± 8	113 ± 21	480 ± 169*	457 ± 105*			
		Contra	98 ± 12	102 ± 13	95 ± 23	99 ± 28	101 ± 14	103 ± 7	105 ± 9	90 ± 20			

Los niveles de ARNm de BDNF fueron medidos usando como parámetro la densidad de granos de plata sobre cuerpos celulares en las capas II/III y capa V de la corteza cingular, frontal, parietal y de las cortezas insular y piforme. Los resultados (media ± D.E.) están expresados como porcentaje respecto al valor medio medido en animales inyectados con solución Ringer. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffe; * $p < 0,01$ si comparamos con valores control (ver Materiales y métodos para obtener información más detallada).

2. LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL ESTRIADO CON KA O QA NO ALTERA LOS NIVELES DE ARNm DE *trkB* NI EN LA CORTEZA NI EN LA SN

Con respecto a *trkB*, el receptor tipo tirosinquinasa de alta afinidad de BDNF, no detectamos cambios en sus niveles de ARNm ni en la corteza cingular ni frontal ni parietal en los tiempos tras la lesión examinados (Tabla 2 y fig. 5). Esto mismo ocurrió cuando estudiamos el patrón de expresión de ARNm de *trkB* en la SN, donde no detectamos ningún cambio respecto a controles. Sin embargo, detectamos pérdida de mensajero del receptor de BDNF en el estriado, con un patrón que recuerda la pérdida de ARNm de GAD (Fig.5).

Tabla 2. Niveles de ARNm de *trkB* en ganglios basales y áreas relacionadas tras la lesión excitotóxica del estriado con QA o KA

	QA			KA		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
Estriado	72,0 ± 14,2*	63,2 ± 10,9*	14,6 ± 3,8*	76,2 ± 10,6*	63,5 ± 17,0*	12,5 ± 4,6*
S. nigra	93,4 ± 12,7	98,2 ± 6,7	104,2 ± 11,0	103,5 ± 13,3	105,0 ± 9,5	100,2 ± 14,9
C. cingular	107,4 ± 7,0	93,0 ± 5,4	92,1 ± 18,7	100,5 ± 3,5	99,6 ± 5,5	92,6 ± 12,6
C. frontal	102,4 ± 7,0	93,0 ± 5,4	92,1 ± 18,7	111,0 ± 4,4	100,2 ± 2,6	96,5 ± 11,8
C. parietal	94,3 ± 11,1	90,8 ± 10,2	108,2 ± 15,7	92,0 ± 6,5	92,3 ± 5,2	94,6 ± 8,4

Niveles de ARNm de *trkB* tras una inyección en el estriado de QA o KA. Los niveles de ARNm de *trkB* se midieron mediante densitometría en la película de autorradiografía en el estriado, la SN y distintas zonas de la corteza. Los resultados representan la media ± D.E. de cuatro a seis animales en cada tiempo postlesión estudiado y se expresan como el porcentaje de valores medios de animales inyectados con vehículo. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffé; * $p < 0,01$ si comparamos con valores control (ver Materiales y métodos para obtener información más detallada sobre el análisis estadístico y la cuantificación).

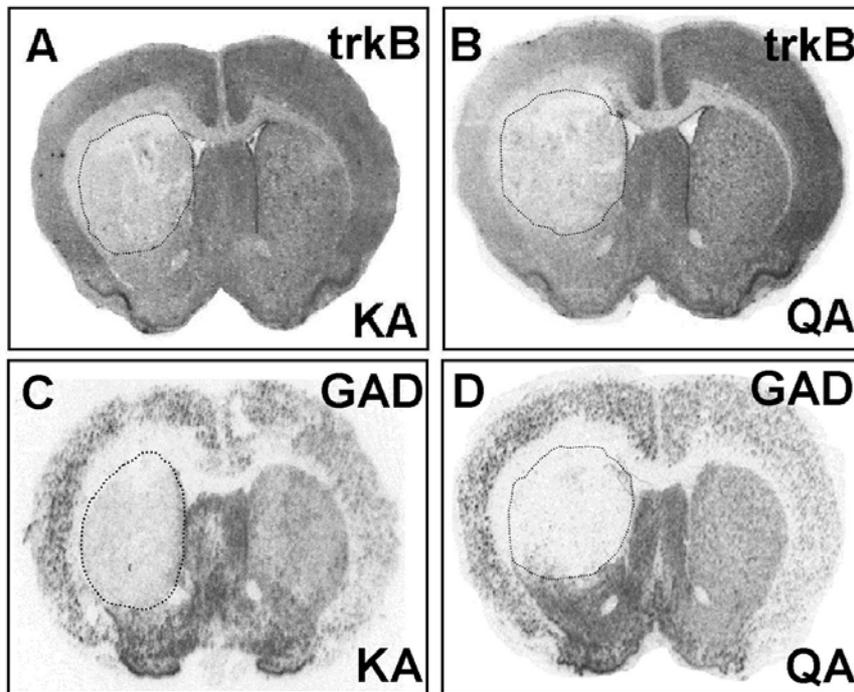


Figura 5. Pérdida de ARNm de *trkB* en el estriado tras la lesión excitotóxica con KA y QA, respectivamente. A y B: autorradiografías mostrando la pérdida de señal de hibridación *in situ* para el mensajero de *trkB* en el estriado lesionado. Si comparamos A con C y B con D puede observarse como el patrón de pérdida de ARNm de *trkB* es muy similar al patrón de pérdida de señal de hibridación de mensajero de GAD, en ambos casos las zonas de pérdida están delimitadas mediante línea de puntos.

3. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD NEURONAL EN LA SN Y EN LA CORTEZA TRAS LA INYECCIÓN EN ESTRIADO DE KA O QA

3.1. Análisis de actividad neuronal en la SN tras la inyección en estriado de KA o QA

El aumento de la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC ipsilateral al estriado lesionado con KA o QA puede deberse, o a la pérdida de sus neuronas diana en el estriado, o a un aumento de la actividad neuronal. Para intentar dilucidar el papel de ambos factores en el aumento de expresión de BDNF, hicimos un ensayo de hibridación *in situ* buscando ARNm de cFos, ya que usamos este ARNm como marcador de actividad neuronal (Mitsikostas y Sánchez del Río, 2001; Steiner y Kitai, 2001).

Este estudio mostró que había una intensa sobreexpresión de ARNm de cFos en la SNPR en respuesta al daño en el estriado (Fig. 7). Sin embargo, no encontramos esta inducción en la SNPC, por lo que deducimos que las neuronas que se activan cuando se produce una lesión excitotóxica en el estriado son las neuronas GABAérgicas de la SNPR, pero no las neuronas dopaminérgicas de la SNPC, que sin embargo, eran las neuronas en las que detectamos sobreexpresión de mensajero de BDNF.

Este aumento de la expresión de ARNm de cFos fue patente en la SNPR ipsilateral al estriado donde provocamos la lesión tan solo 6 h tras la inyección de KA ($1172 \pm 129\%$ de valores de controles; $p < 0,01$) o QA ($2621 \pm 429\%$ de valores de controles; $p < 0,01$), permaneciendo los valores por encima de valores de controles 24 h tras la lesión ($1125 \pm 187\%$ y $803 \pm 272\%$ de valores control para KA y QA, respectivamente; $p < 0,01$; ver fig. 6).

Para confirmar la naturaleza GABAérgica de las células en las que encontramos expresión de ARNm de cFos, hicimos un ensayo de doble hibridación *in situ* con una ribsonda isotópica de ARNm de GAD (revelado por emulsión autorradiográfica como granos de plata) y una ribsonda no isotópica de ARNm de cFos (revelado cromogénico en azul). Este ensayo confirmó que las células que expresaban ARNm de cFos eran neuronas GABAérgicas, que es el fenotipo neuronal predominante en la SNPR (Fig. 7, fotografía I).

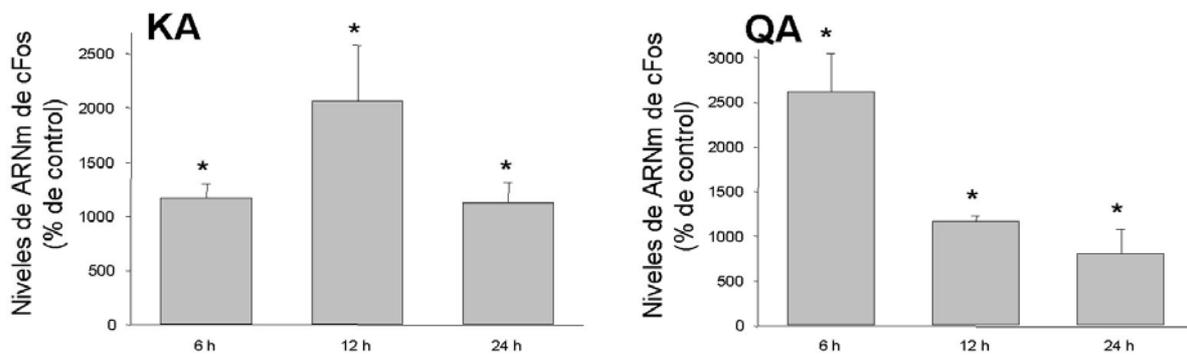


Figura 6. Histogramas representando la cuantificación de ARNm de cFos en la SNPR tras la lesión del estriado con KA o QA, respectivamente. En esta figura puede observarse como la sobreexpresión de mensajero de cFos es máxima a las 12 h tras la lesión cuando la neurotoxina inyectada es KA, sin embargo, cuando el tóxico inyectado es QA, la sobreexpresión de cFos es máxima 6 h tras la operación. Los datos representan la media \pm D.E. y se expresan como porcentajes de los controles. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffee (* $p < 0,01$ comparado con controles).

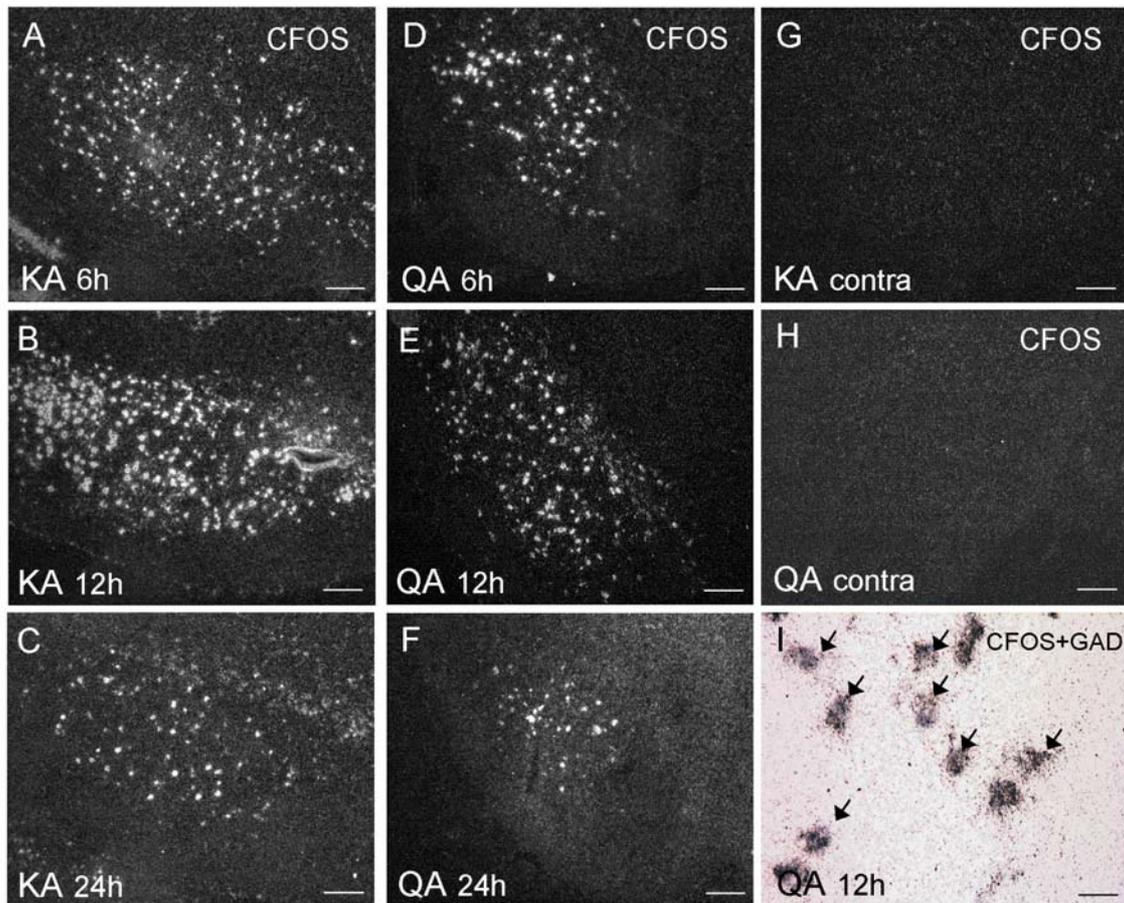


Figura 7. La lesión excitotóxica del estriado con KA o QA aumenta la actividad neuronal en términos de niveles de ARNm de cFos en la SNPR ipsilateral (A-F), pero no en la contralateral (G y H). I: fotomicrografía de alta magnificación en campo claro mostrando el resultado de la técnica de colocalización mediante doble hibridación *in situ*, en este caso la sonda no isotópica (revelada mediante detección colorimétrica en color azul) se usó para localizar ARNm de cFos, mientras que la sonda radioactiva se usó para detectar ARNm de GAD (revelado con emulsión autorradiográfica como granos negros). En esta fotografía puede observarse como todas las células que expresaban ARNm de cFos (células azules) eran de naturaleza GABAérgica, o sea, expresaban ARNm de GAD (detectado como acumulación de granos negros), siendo el fenotipo GABAérgico el predominante en la SNPR. Barras de escala: 200 μm ; excepto en I, 25 μm .

3.2. Análisis de actividad neuronal en la corteza tras la inyección en estriado de KA o QA

El análisis de la expresión de ARNm de cFos como un marcador de actividad neuronal demostró activación de toda la corteza ipsilateral en respuesta a QA, incluyendo a las cortezas cingular, frontal y parietal (Fig. 8, B). Los niveles de ARNm de cFos fueron máximos 6 horas tras la lesión con un aumento medio del 646% respecto a controles, sin embargo 24 h tras la lesión, los niveles de ARNm de cFos en la corteza eran similares a los niveles de animales controles inyectados con solución Ringer (ver tabla 3 para obtener información detallada sobre los valores de cuantificación de ARNm de cFos en distintas áreas corticales).

Con respecto a los animales inyectados con KA en el estriado, se encontraron altos niveles de ARNm de cFos tanto en la corteza ipsilateral como en la contralateral (Fig. 8, A), siendo las inducciones máximas 6 h tras la lesión (aumento medio del 752% respecto a controles). En este caso, 24 h tras la lesión aún permanecían activadas algunas áreas corticales como la corteza cingular, la insular y la piriforme, pero sólo en el lado ipsilateral.

En ambos casos es remarcable el hecho de que las partes de la corteza que expresaban niveles más altos de cFos eran aquellas que proyectan axones sobre el estriado (Tabla 3 y fig. 8).

Tabla 3. Niveles de ARNm de cFos en diferentes áreas de la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado

	Corteza cingular		Corteza frontal		Corteza parietal		Corteza pliforme	Corteza insular		
	Capa II/III	Capa V	Capa II/III	Capa V	Capa II/III	Capa V				
QA	6 h	Ipsi	623 ± 132*	610 ± 128*	686 ± 124*	700 ± 132*	688 ± 147*	782 ± 118*	293 ± 67*	788 ± 127*
		Contra	90 ± 22	95 ± 17	97 ± 25	92 ± 15	93 ± 14	96 ± 18	99 ± 22	98 ± 19
	12 h	Ipsi	304 ± 87*	285 ± 136*	302 ± 60*	320 ± 119*	193 ± 27*	190 ± 82	203 ± 57*	530 ± 165*
		Contra	110 ± 25	108 ± 22	112 ± 19	105 ± 18	115 ± 30	110 ± 23	114 ± 11	117 ± 15
	24 h	Ipsi	112 ± 18	118 ± 25	108 ± 22	106 ± 24	105 ± 14	102 ± 26	94 ± 14	102 ± 14
		Contra	96 ± 12	98 ± 16	105 ± 12	96 ± 12	102 ± 14	96 ± 14	98 ± 12	108 ± 22
KA	6 h	Ipsi	877 ± 36*	725 ± 103*	694 ± 59*	669 ± 71*	785 ± 47*	708 ± 75*	560 ± 89*	1001 ± 323*
		Contra	614 ± 86*	484 ± 99*	436 ± 113*	407 ± 94*	419 ± 131*	259 ± 82*	462 ± 87*	590 ± 104*
	12 h	Ipsi	493 ± 81*	518 ± 52*	501 ± 64*	531 ± 58*	399 ± 52*	399 ± 75*	628 ± 48*	796 ± 195*
		Contra	431 ± 33*	384 ± 61*	520 ± 94*	511 ± 97*	307 ± 82*	237 ± 57*	502 ± 22*	675 ± 32*
	24 h	Ipsi	496 ± 107*	434 ± 88*	140 ± 32	125 ± 22	139 ± 25	129 ± 27	526 ± 53*	390 ± 35*
		Contra	101 ± 12	99 ± 15	95 ± 23	112 ± 18	98 ± 5	103 ± 15	105 ± 22	90 ± 23

Niveles de ARNm de cFos en la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado. Los niveles de ARNm fueron cuantificados en las capas II/III y capa V de la corteza cingular, frontal, parietal y en las áreas insular y pliforme. Los resultados representan la media ± D.E. y están expresados como porcentaje de la media de los valores de ARNm de cFos encontrados en los animales inyectados en solución Ringer. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffe (* $p < 0,01$ al comparar con valores control).

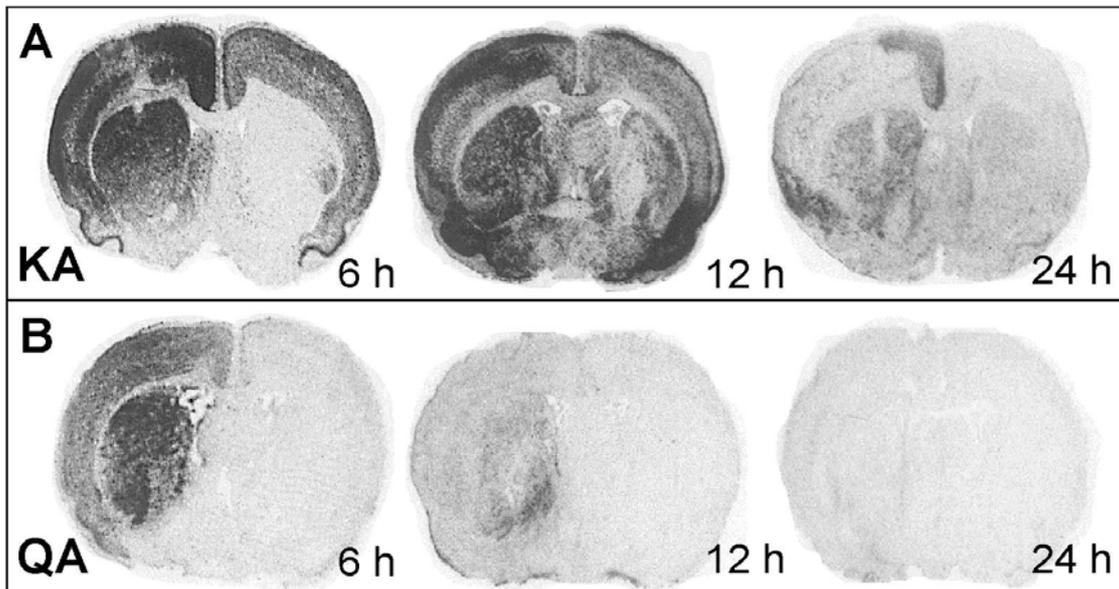


Figura 8. La lesión del estriado con KA o QA aumenta los niveles de ARNm de cFos en la corteza. El aumento de los niveles de ARNm de cFos cuando el tóxico inyectado en estriado es KA es claramente bilateral y 24 h tras la lesión algunas áreas corticales como la corteza cingular, la piriforme y la insular aún permanecen activadas. Sin embargo, cuando el tóxico inyectado es QA, el aumento de la expresión de mensajero de cFos por encima de valores control es estrictamente ipsilateral. En este caso, la sobreexpresión de cFos es máxima 6 h tras la lesión, siendo indetectable a las 24 h. Es remarcable el hecho de que las capas de la corteza donde detectamos mayor aumento de los niveles de ARNm de cFos son aquellas que tienen neuronas diana en el estriado, es decir, las capas II/III y V.

4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN EL NÚCLEO SUBTALÁMICO TRAS LA INYECCIÓN DE KA O QA EN EL ESTRIADO

4.1. La lesión excitotóxica del estriado con KA o QA aumenta la expresión de ARNm de BDNF en el núcleo subtalámico

Los ensayos de hibridación *in situ* mostraron un aumento en la expresión de ARNm de BDNF en el NST tras lesionar el estriado con ambas neurotoxinas (Fig. 10). Esta sobreexpresión de mensajero de BDNF fue encontrada en el NST ipsilateral al estriado lesionado mediante la inyección de QA 12 h tras la lesión ($228 \pm 37\%$ de los niveles control; $p < 0,01$). Sin embargo, cuando el tóxico inyectado fue KA, la sobreexpresión de ARNm de BDNF aparece en el NST ipsilateral tan pronto como 6 h tras la lesión ($355 \pm 49\%$ de los niveles control; $p < 0,01$), y a las 12 h tras la lesión la sobreexpresión de BDNF es bilateral, aunque en diferente grado según se trate del NST ipsi o contralateral ($441 \pm 5\%$ y $184 \pm 47\%$ de los niveles control, respectivamente; $p < 0,01$) (ver figura 9).

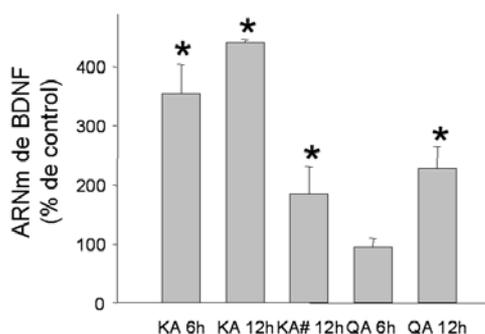


Figura 9. Histograma representando la cuantificación de ARNm de BDNF en el NST tras la inyección en estriado de KA o QA. Los resultados representan la media \pm D.E. y se expresan como porcentaje de los niveles de ARNm de BDNF en animales inyectados con Ringer. Significación estadística: análisis de

varianza de una cola seguido de test de Scheffe; $*p < 0.01$ comparado con controles (ver Materiales y métodos para más detalles sobre la cuantificación). # significa NST contralateral al estriado lesionado.

4.2. La lesión excitotóxica del estriado con KA o QA aumenta la actividad neuronal en el núcleo subtalámico

El estudio de la expresión de ARNm de cFos en secciones consecutivas a aquellas usadas para el estudio de la expresión de mensajero de BDNF demostró un patrón de expresión similar al que encontramos cuando estudiamos la expresión de ARNm de BDNF (Ver figura 10).

Tras la lesión excitotóxica del estriado con QA, los niveles de ARNm de cFos fueron máximos en el NST 6 h más tarde ($370 \pm 15\%$ de los niveles control; $p < 0,01$), para descender ligeramente 12 h tras la inyección ($194 \pm 22\%$ de los niveles control; $p < 0,01$) (Figura 11).

Con KA, altos niveles de ARNm de cFos se encontraron 6 h tras la inyección intraestriatal en el NST ipsilateral ($551 \pm 37\%$ de los niveles control; $p < 0,01$). A las 12 h tras la lesión la expresión de ARNm de cFos por encima de valores de control fue bilateral ($613 \pm 75\%$ y $471 \pm 8\%$ de los niveles control, para el NST ipsi- y contralateral, respectivamente; $p < 0,01$) (Ver figura 11).

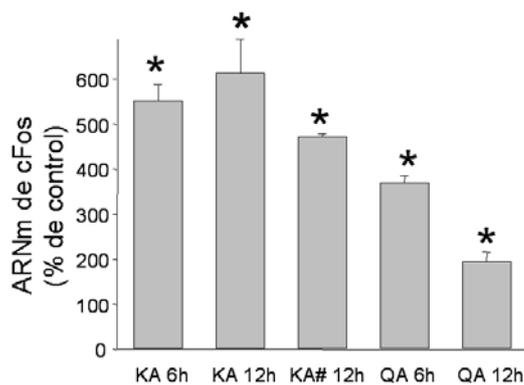


Figura 11. Histograma representando la cuantificación de ARNm de cFos en el NST tras la inyección en estriado de KA o QA. Los resultados representan la media \pm D.E. y se expresan como porcentaje de los niveles de ARNm de cFos en animales inyectados con control. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffee; $*p < 0,01$ comparado con controles). # significa NST contralateral al estriado lesionado.

cola seguido de test de Scheffee; $*p < 0,01$ comparado con controles). # significa NST contralateral al estriado lesionado.

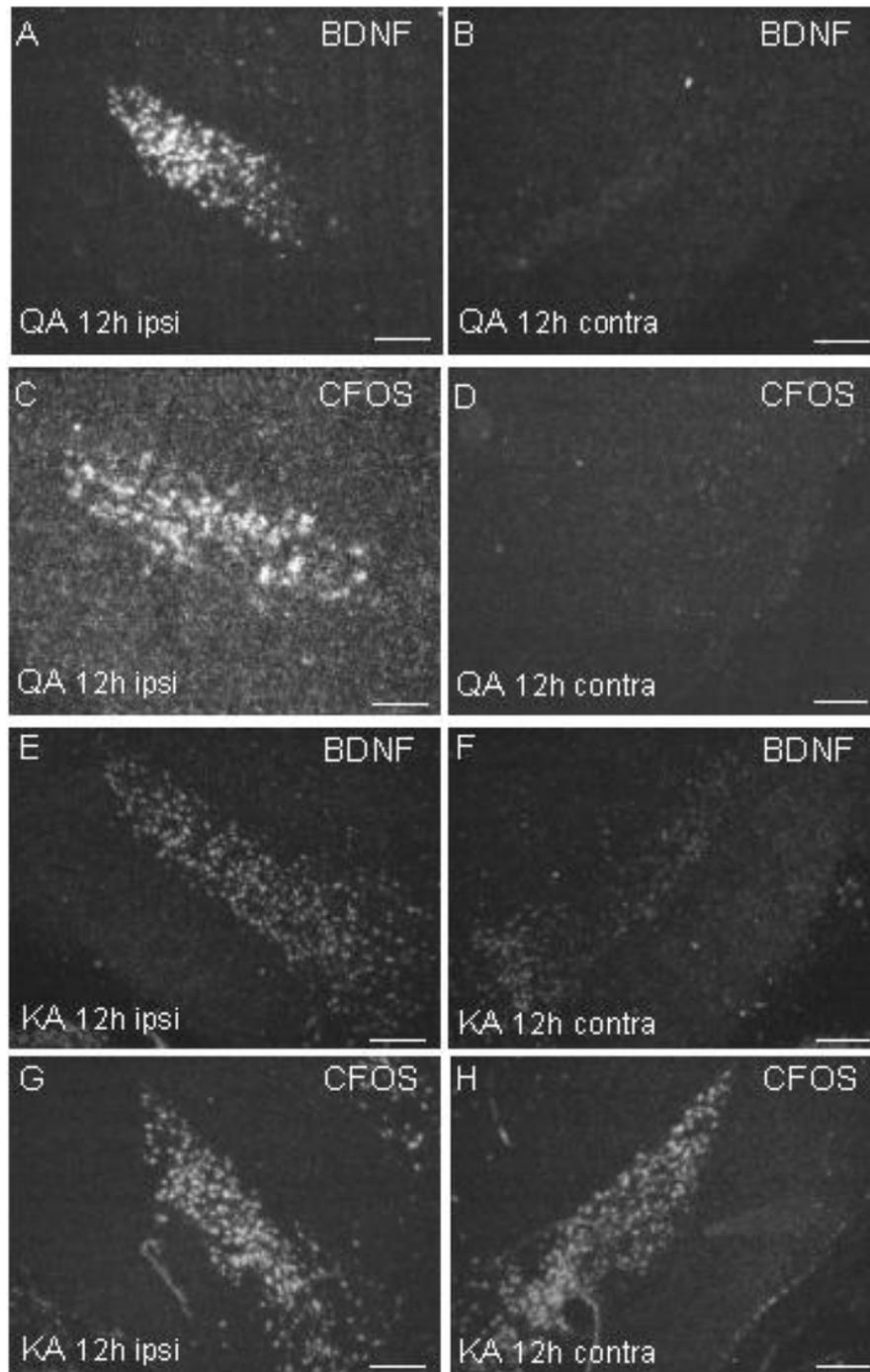


Figura 10 (Pie de figura en la siguiente página). Las lesiones excitotóxicas del estriado aumentan la expresión de ARNm de BDNF y de cFos en el NST.

Pie de figura 10. (A-D): Sobreexpresión de ARNm de BDNF (A) y de cFos (C) en el NST ipsilateral al lado lesionado con QA. Esta sobreexpresión, sin embargo, no es detectada en el NST contralateral (B para mensajero de BDNF, D para cFos). Cuando el tóxico inyectado en estriado es KA (E-H) puede observarse como 12 h tras la lesión encontramos sobreexpresión de ARNm de BDNF y cFos tanto en el NST ipsilateral (E y G para BDNF y cFos, respectivamente) como en el lado contralateral (F y H), sin embargo la expresión de mensajero es, en ambos casos, mayor en el lado ipsilateral que en el contralateral como puede observarse al comparar E con F y G con H. Barras de escala: 200 μm , excepto en A, 100 μm .

5. EFECTO DEL BLOQUEO DEL TRANSPORTE AXONAL EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES Y LA CORTEZA

5.1. Efecto del bloqueo del transporte en el HPM en la expresión de ARNm de BDNF

Con objeto de determinar si el transporte de sustancias entre la SNPC y sus neuronas diana en el estriado influye en la regulación de la expresión de ARNm de BDNF en la SN inyectamos colchicina, un agente bloqueante del transporte axoplásmico, en el HPM. Tras la inyección de colchicina observamos un aumento de la expresión de ARNm de BDNF respecto a controles en la SNPC ipsilateral al lado inyectado (Fig. 12). Este aumento de la expresión de ARNm de BDNF se produjo más tarde que la sobreexpresión de mensajero que encontramos en la SNPC cuando lesionamos el estriado con KA o QA (24 h tras la inyección, $242.6 \pm 60.2\%$ de los niveles control; $p < 0,01$).

Asimismo, el bloqueo específico del transporte axoplásmico en el HPM aumentó los niveles de ARNm de BDNF por encima de valores control no sólo en la SNPC sino también en la corteza. Esta sobreexpresión de mensajero de BDNF fue ipsilateral y se restringió a las capas II/III de la corteza cingular y parietal y a la corteza piriforme e insular (ver figura 13 y tabla 4).

Otro hecho sorprendente fue el aumento de la expresión de ARNm de BDNF en el NST ipsilateral tras la inyección de colchicina en el HPM. De hecho detectamos valores de ARNm de BDNF del $389 \pm 109\%$ de valores medios medidos en el NST de animales inyectados con Ringer en el HPM ($p < 0,01$) (Figuras 14 y 15).

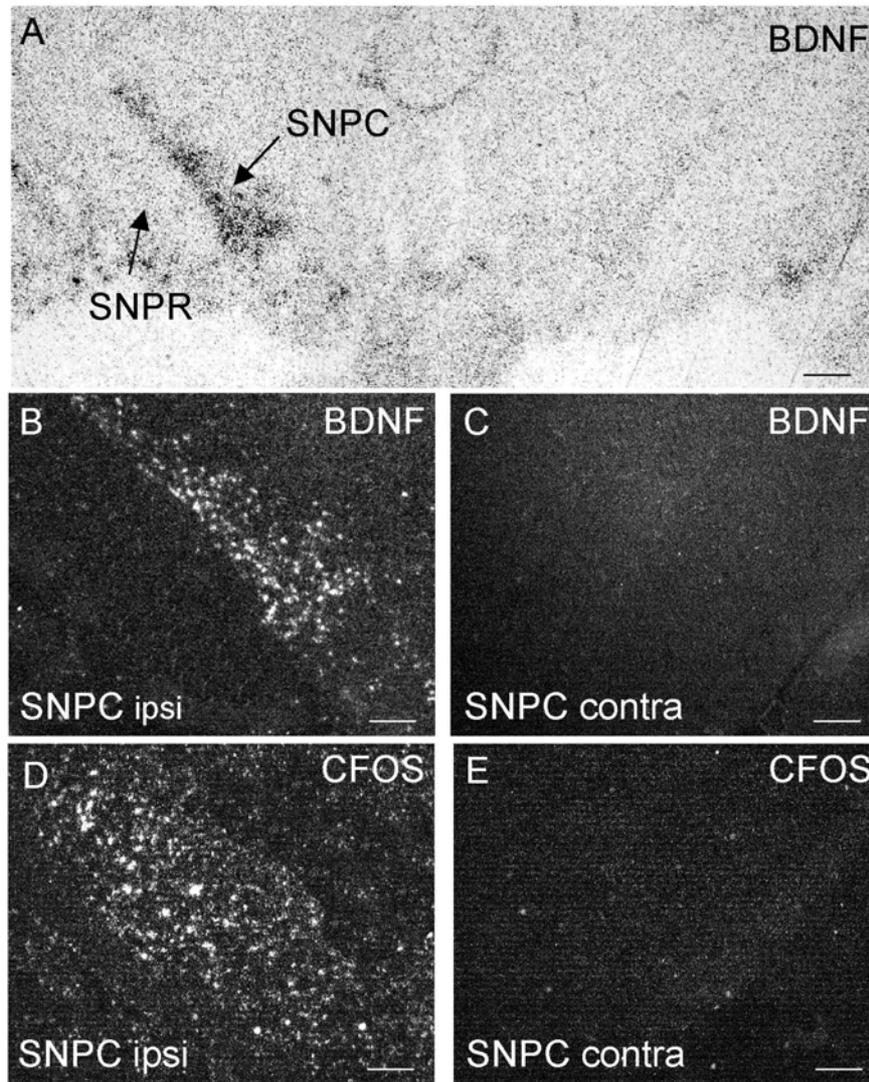


Figura 12. Expresión de ARNm de BDNF en la SNPC ipsilateral en respuesta al bloqueo específico del transporte axoplásmico en el tracto nigroestriatal (A-C). El análisis de actividad neuronal mediante hibridación *in situ* de ARNm de cFos no detectó activación en la SNPC pero sí en la SNPR (D y E). El bloqueo del transporte axoplásmico entre la SN y el estriado se consiguió administrando una inyección de colchicina en el haz prosencefálico medial. Barras de escala: A, 350 μm ; B-E, 200 μm .

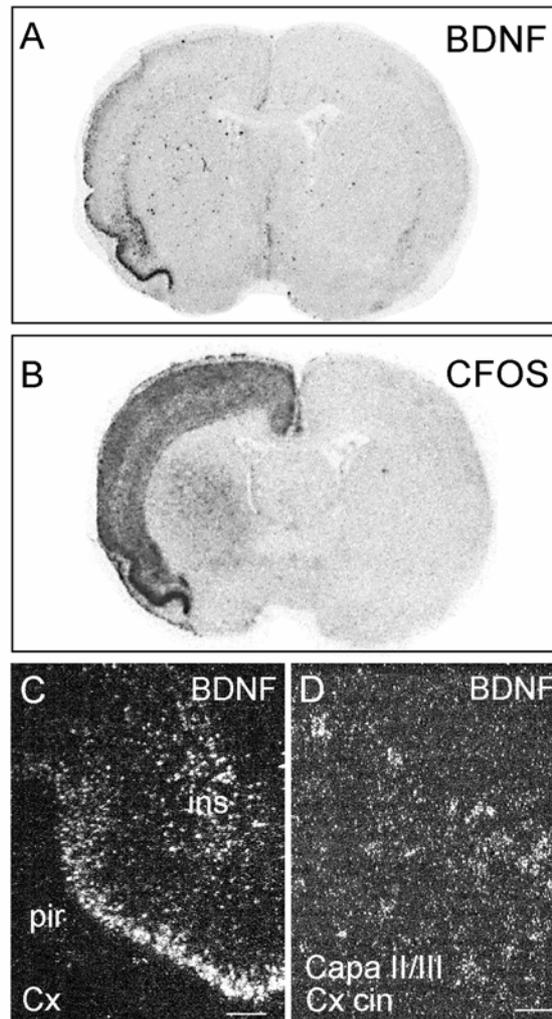


Figura 13. El bloqueo del transporte axoplásmico en el haz prosencéfalo medial aumenta la expresión de ARNm de BDNF y de cFos en la corteza ipsilateral. A y B: autorradiografías mostrando la expresión de ARNm de BDNF (A) y de cFos (B). Estas figuras muestran una elevada sobreexpresión de BDNF y cFos en la corteza ipsilateral, pero las zonas en las que detectamos esta sobreexpresión son diferentes para ambos marcadores. C y D: microfotografías de campo oscuro de alta magnificación mostrando el aumento de los niveles de ARNm de BDNF en la corteza como consecuencia de la inyección de colchicina en el HPM. Este aumento de la expresión de BDNF inducido por colchicina se restringió a las capas II/III de la corteza y a la corteza insular y piriforme (ver valores en tabla 4), lo cual contrasta con el patrón de sobreexpresión de ARNm de cFos ya que el mensajero de este marcador está sobreexpresado en toda la corteza ipsilateral. Barras de escala: C, 100 μm ; D, 50 μm .

5.2. Efecto del bloqueo del transporte en el HPM en la expresión de ARNm de cFos

El análisis de la actividad neuronal tras la administración de colchicina en la vía nigroestriatal mostró sobreexpresión de ARNm de cFos en la SNPR ipsilateral 24 horas tras la inyección ($619 \pm 40\%$; $p < 0,01$) (Fig. 12, C y D). También encontramos sobreexpresión de ARNm de cFos en toda la corteza ipsilateral, no estando restringida esta sobreexpresión a las capas II/III de la corteza y a la corteza insular y piriforme, como sí ocurría con la expresión de mensajero de BDNF (Tabla 4 y fig. 13). Asimismo, también estaba aumentada la actividad neuronal en el NST ipsilateral a la inyección de colchicina ($438 \pm 186\%$; $p < 0,01$) (Figuras 14 y 15).

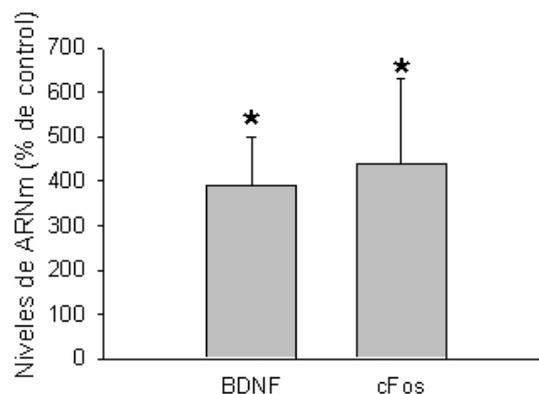


Figura 14. Histogramas representando la cuantificación de ARNm de BDNF y de cFos en el NST tras la inyección de colchicina en el HPM. Los resultados representan la media \pm D.E. y se expresan como porcentaje de los niveles de ARNm en controles. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffé; * $p < 0,01$ comparado con controles).

Figura 15 (en la siguiente página). Microfotografías que muestran como una inyección de colchicina en el HPM aumenta tanto la expresión de ARNm de BDNF (A y B) como de cFos (C y D) en el NST ipsilateral. Barras de escala: A y B, 100 μ m; C y D, 200 μ m.

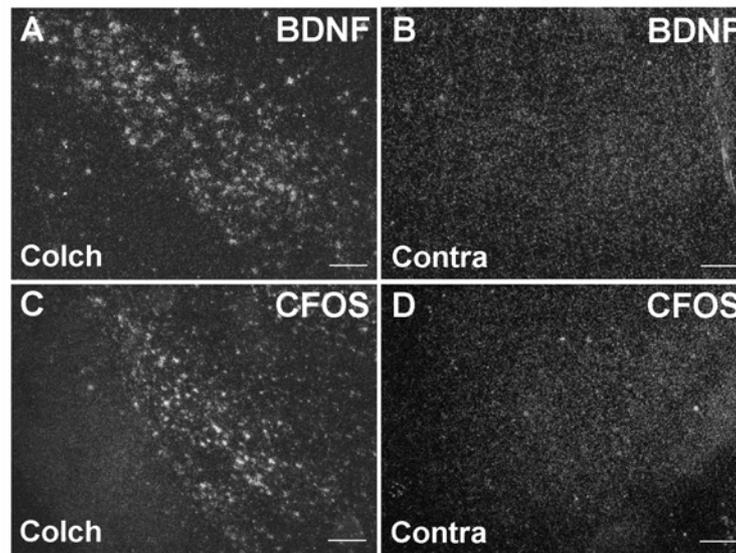


Tabla 4. Niveles de ARNm de BDNF y de cFos en diferentes áreas corticales en respuesta al bloqueo del transporte axonal en el tracto nigroestriatal.

		C. cingular		C. frontal		C. parietal		Corteza piriforme	Corteza insular
		C. II/III	Capa V	C. II/III	Capa V	C. II/III	Capa V		
BDNF	Ipsi	175 ± 29*	89 ± 17	90 ± 14	95 ± 20	176 ± 15*	88 ± 16	307 ± 29*	272 ± 58*
	Contra	85 ± 12	86 ± 19	104 ± 9	89 ± 19	87 ± 21	92 ± 19	113 ± 12	114 ± 19
cFos	Ipsi	285 ± 34*	238 ± 40*	261 ± 36*	233 ± 37*	216 ± 27*	228 ± 38*	443 ± 25*	229 ± 29*
	Contra	89 ± 15	92 ± 19	99 ± 19	102 ± 17	95 ± 12	96 ± 14	125 ± 27	122 ± 23

Niveles de ARNm de BDNF y de cFos 24 h tras una inyección de colchicina en el haz prosencefálico medial. Los niveles de ARNm de BDNF y de cFos se midieron como densidad de granos de plata sobre cada cuerpo celular en las capas II/III y V de la corteza cingular, frontal y parietal y en la corteza insular y piriforme. Los resultados representan la media ± D.E. de cuatro a seis animales y se expresan como el porcentaje de los valores medios medidos en los animales inyectados con solución Ringer. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffé; * $p < 0,01$ comparado con valores de controles (Ver Materiales y métodos para más detalles).

6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES Y LA CORTEZA TRAS LA INYECCIÓN EN ESTRIADO DE DCG-IV: COMPARACIÓN CON LA INYECCIÓN DE QA

6.A. Extensión de la lesión provocada en el estriado por la inyección de DCG-IV

Al igual que hicimos en el caso de la inyección estriatal de KA o QA, la lesión excitotóxica del estriado se puso de manifiesto mediante el análisis del patrón de expresión de ARNm de GAD. La pérdida de expresión de ARNm de GAD en el estriado se estudió a las 24 h tras la lesión, que fue el último tiempo de estudio de expresión de ARNm de BDNF. El tamaño de la lesión fue de $13,5 \pm 2,7 \text{ mm}^3$, es decir, con una dosis de 20 nm de DCG-IV en estriado se produce una lesión de extensión comparable a la que produce una dosis de 120 nm de QA (Fig. 16).

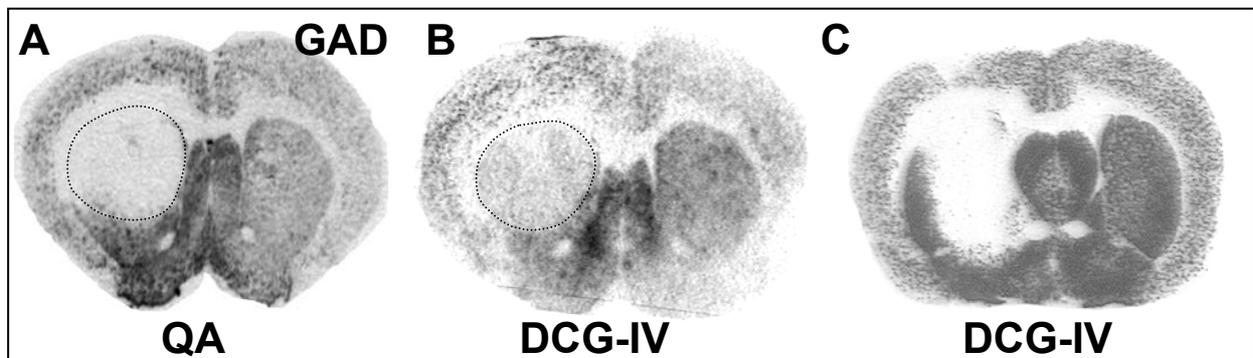


Figura 16. La inyección de DCG-IV en el estriado provoca una lesión que se puso de manifiesto mediante el estudio de la pérdida de expresión de ARNm de GAD. La lesión producida con 20 nm de DCG-IV fue comparable a la provocada cuando se inyectan 120 nm de QA en el estriado (comparar autorradiografía B con A). Debido a la difusión de DCG-IV cuando se inyecta en el cerebro, la lesión se extiende por el eje rostrocaudal hasta alcanzar también el GP (C).

6.B. La lesión excitotóxica provocada en el estriado con DCG-IV aumenta la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC y en la corteza

Tras la inyección de DCG-IV en el estriado estudiamos mediante la técnica de hibridación *in situ* la expresión de ARNm de BDNF en las principales estructuras que proyectan axones sobre éste, o sea, la SNPC y la corteza.

Cuando estudiamos la expresión de mensajero de BDNF en la SNPC observamos como el patrón de expresión fue muy similar al obtenido cuando el tóxico inyectado en el estriado era el QA, así 12 h tras la inyección de DCG-IV en el estriado, detectamos valores de ARNm de BDNF del $305 \pm 22\%$ de valores medios de animales control ($p < 0,01$). Los niveles de ARNm de BDNF en la SNPC ipsilateral al estriado lesionado seguían siendo superiores a los valores control 24 h tras la lesión con DCG-IV ($233 \pm 52\%$ de controles; $p < 0,01$) (ver figura 17).

En este caso también usamos un ensayo de hibridación *in situ* con doble marcaje para comprobar si las células donde encontrábamos expresión de mensajero de BDNF en la SN eran neuronas dopaminérgicas. Con esta técnica comprobamos que, en los lugares donde aparecían acumulaciones de ARNm de BDNF, también aparecían acumulaciones de ARNm de TH, lo que evidencia que las células que expresan ARNm de BDNF en la SN en respuesta a este tipo de lesión son neuronas dopaminérgicas (Fig. 18, A).

En la corteza los valores de ARNm de BDNF fueron también muy similares a aquellos observados cuando el tóxico inyectado fue QA (ver tabla 5), sin embargo, la sobreexpresión de BDNF en la corteza ipsilateral se mantuvo durante más tiempo, detectando a las 12 h tras la lesión valores de mensajero de BDNF bastante similares a aquellos detectados 6 h tras la inyección de DCG-IV (tabla 5 y figura 19).

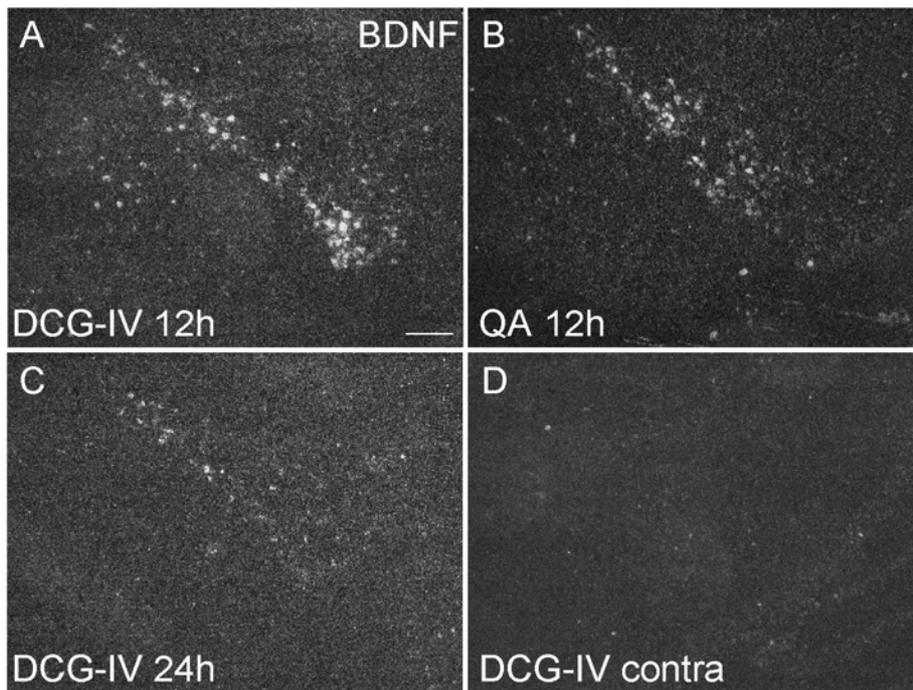


Figura 17. La inyección de DCG-IV en el estriado aumenta la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC ipsilateral. Los niveles de BDNF son máximos 12 h tras la inyección, manteniéndose por encima de valores control a las 24 h (A y C). El patrón de sobreexpresión de ARNm de BDNF fue muy similar al obtenido cuando el tóxico inyectado era QA (Comparar A con B). En el lado contralateral, en las condiciones de nuestro ensayo, no observamos expresión de ARNm de BDNF (D). Barra de escala: 200 μ m.

Tabla 5. Niveles de ARNm de BDNF en diferentes áreas de la corteza tras la lesión excitotóxica del estradiol con DCG-IV

		Corteza cingular		Corteza frontal		Corteza parietal		Corteza piriforme	Corteza insular	
		Capa III/II	Capa V	Capa III/II	Capa V	Capa III/II	Capa V			
		Ipsi	Contra	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra			
GA	6 h	Ipsi	970 ± 99*	760 ± 126*	638 ± 76*	627 ± 182*	676 ± 165*	607 ± 133*	688 ± 151*	725 ± 96*
		Contra	111 ± 15	114 ± 18	117 ± 23	112 ± 18	99 ± 10	117 ± 15	114 ± 22	98 ± 23
	12 h	Ipsi	413 ± 157*	488 ± 209*	480 ± 160*	225 ± 96*	431 ± 178*	263 ± 98*	372 ± 140*	488 ± 157*
		Contra	95 ± 12	99 ± 15	97 ± 28	102 ± 19	105 ± 5	110 ± 17	105 ± 22	97 ± 13
	24 h	Ipsi	108 ± 14	114 ± 8	112 ± 16	106 ± 20	98 ± 15	110 ± 12	101 ± 10	114 ± 8
		Contra	94 ± 12	96 ± 12	105 ± 14	108 ± 18	96 ± 9	105 ± 14	106 ± 8	92 ± 14
DCG-IV	6 h	Ipsi	518 ± 186*	528 ± 187*	531 ± 124*	494 ± 145*	490 ± 65*	317 ± 59*	674 ± 119*	417 ± 121*
		Contra	120 ± 25	118 ± 40	112 ± 12	135 ± 18	128 ± 21	122 ± 36	128 ± 25	113 ± 27
	12 h	Ipsi	589 ± 126*	446 ± 112*	599 ± 72*	438 ± 82*	517 ± 118*	243 ± 38*	586 ± 124*	315 ± 96*
		Contra	110 ± 30	91 ± 17	74 ± 44	83 ± 19	79 ± 23	97 ± 11	93 ± 32	91 ± 11
	24 h	Ipsi	117 ± 19	119 ± 15	128 ± 29	122 ± 30	100 ± 8	143 ± 51	125 ± 16	97 ± 15
		Contra	99 ± 15	97 ± 16	95 ± 28	109 ± 18	95 ± 14	103 ± 11	105 ± 9	80 ± 42

Los niveles de ARNm de BDNF fueron medidos usando como parámetro la densidad de granos de plata sobre cuerpos celulares en las capas II/III y capa V de la corteza cingular, frontal, parietal y de las cortezas insular y piriforme. Los resultados (media ± D.E.) están expresados como porcentaje respecto al valor medio medido en animales inyectados con solución Ringer. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffé; * $p < 0.01$ si comparamos con valores control (ver Materiales y métodos para obtener información más detallada). Si comparamos la expresión de mensajero de BDNF en la corteza tras la inyección en estradiol de DCG-IV o de GA, podemos observar como el GA induce una sobreexpresión más pronunciada en las primeras horas, sin embargo, con el DCG-IV, aunque el aumento de expresión de ARNm de BDNF es algo menor, los niveles se mantienen por encima de valores control durante más tiempo. Así podemos observar como 12 h tras la inyección de DCG-IV en el estradiol seguimos detectando una enorme sobreexpresión de ARNm de BDNF.

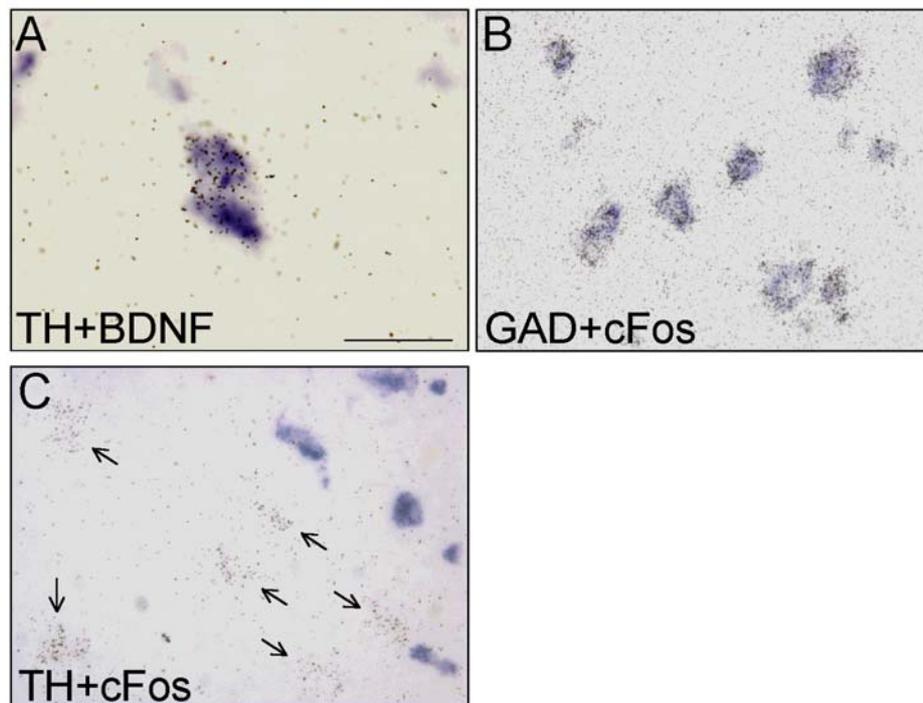


Figura 18 (Pie de figura en la siguiente página). Ensayos de doble hibridación *in situ*. El propósito de estos experimentos fue determinar el fenotipo de las células que expresaban BDNF en la SN tras la inyección de DCG-IV en estriado. Asimismo, se determinó también el fenotipo de las células de la SN que resultaban activadas tras este mismo tipo de tratamiento.

Pie de figura 18. Microfotografía A: al igual que observamos en el caso de QA, las células que expresaban ARNm de BDNF en la SNPC (granos negros después de un tratamiento de emulsión autorradiográfica) tras la lesión en estriado contenían también ARNm de TH (marcador de neuronas dopaminérgicas, revelado cromogénico en azul) en un ensayo de doble ISH. B: ensayo de doble marcaje para dilucidar el fenotipo de las células que se activaban en la SN tras la inyección en estriado de DCG-IV. Este ensayo demostró que las células que expresaban ARNm de cFos (en este caso, reveladas en azul) también se marcaban cuando la sonda usada era contra ARNm de GAD (puntos negros) lo que puso de manifiesto que las células activadas en la SN tras la lesión con DCG-IV eran neuronas GABAérgicas, o sea, neuronas de la parte reticulada de la SN. C: microfotografía que muestra el resultado de un ensayo de doble ISH para comprobar si las células que expresaban ARNm de TH (considerado como un marcador de neuronas dopaminérgicas, marcadas en color azul) en la SNPC estaban o no activadas tras la inyección en el estriado de DCG-IV tomando como marcador de actividad neuronal la expresión de ARNm de cFos. Este ensayo demostró que las células que estaban activadas, es decir, aquellas que expresaban ARNm de cFos (visualizadas como acumulaciones de puntos negros, señaladas con flechas) no expresaban ARNm de TH (visualizado mediante manchas azules), y al contrario, ninguna neurona dopaminérgica expresaba ARNm de cFos tras la inyección de DCG-IV en el estriado. Barra de escala: A, 20 μm ; B y C, 50 μm .

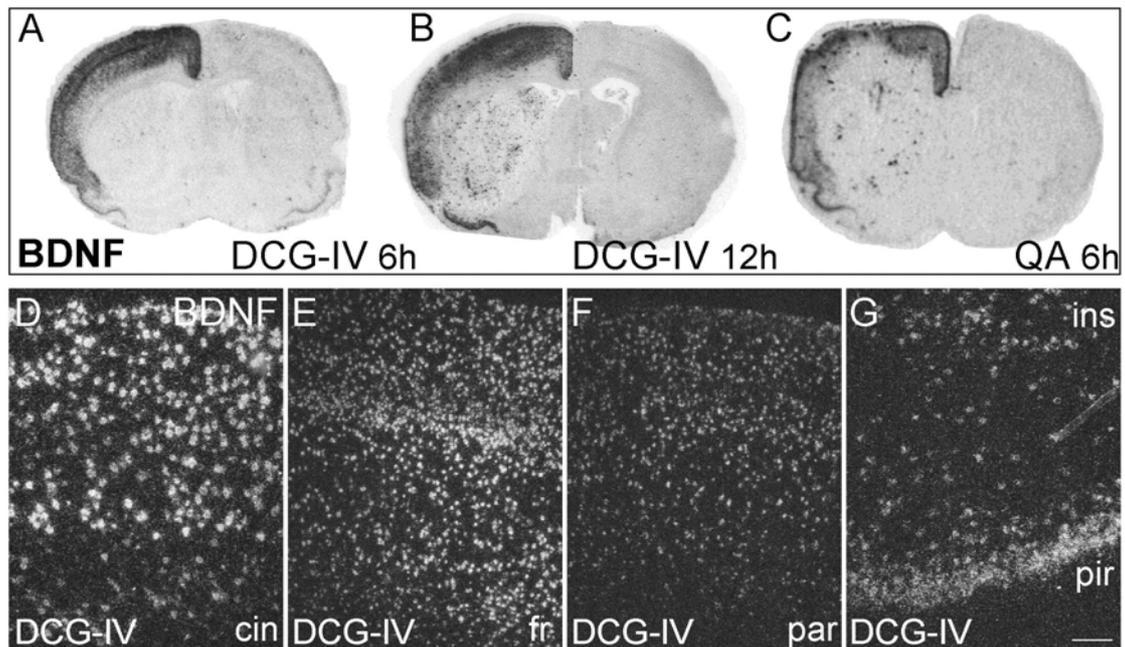


Figura 19. Sobreexpresión de ARNm de BDNF en la corteza ipsilateral tras la inyección en estriado de DCG-IV. A-C: autorradiografías que muestran el aumento de la expresión de ARNm de BDNF en la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado. Es destacable el hecho de que, si bien al cuantificar los niveles de BDNF con DCG-IV los valores son muy similares o incluso menores a los cuantificados con QA, la sobreexpresión de BDNF en la corteza tras la inyección de DCG-IV se prolonga durante más tiempo (comparar con la figura 8). Las lesiones excitotóxicas también aumentan la expresión de mensajero de BDNF en el estriado 12 h tras la lesión como puede observarse en B. D-G: microfotografías de alta magnificación en campo oscuro que muestran la enorme expresión de ARNm de BDNF en las capas II/III y capa V de la corteza cingular (D), frontal (E) y parietal (F) y en las cortezas insular y piriforme (G) tras la inyección de DCG-IV en estriado. Barra de escala: D y G, 50 μm ; E y F, 100 μm .

6.C. La lesión excitotóxica del estriado con DCG-IV no altera los niveles de ARNm de *trkB* ni en la corteza ni en la SN

Al igual que ocurría con la inyección en estriado de QA, cuando examinamos el patrón de expresión de ARNm de *trkB* no detectamos ningún cambio respecto a controles ni en la SN ni en la corteza en los tiempos tras la lesión examinados. Sin embargo, al igual que vimos con QA, detectamos pérdida de expresión de ARNm del receptor de BDNF en el estriado, siendo los valores medidos de este mensajero del $73,5 \pm 15,6\%$, $60,8 \pm 14,3\%$ y $15,2 \pm 4,0\%$ de valores control ($p < 0,01$) a las 6, 12 y 24 h tras la inyección de DCG-IV. El patrón de pérdida, también en este caso, recuerda la pérdida de ARNm de GAD (Fig. 20).

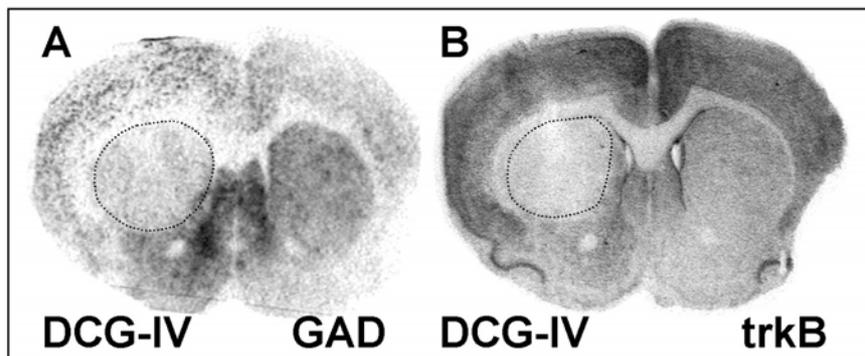


Figura 20. Autorradiografía mostrando la pérdida de señal de hibridación de ARNm de *trkB* en el estriado tras la inyección de DCG-IV (B). El patrón de pérdida de expresión de ARNm de *trkB* en el estriado es muy similar a la pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD (Comparar B con A). La zona de pérdida se delimita en ambos casos mediante línea de puntos.

6.D. Análisis de actividad neuronal en la SN y en la corteza tras la inyección en estriado de DCG-IV

Cuando estudiamos el patrón de expresión de ARNm de cFos, usando este parámetro como marcador de actividad neuronal, observamos como, al igual que ocurría tras la inyección de QA, se observa un enorme aumento de actividad neuronal tanto en la corteza como en la SN.

Tras la cuantificación de la expresión de ARNm de cFos en la SN observamos que, con la inyección en estriado de DCG-IV, los niveles de ARNm de cFos medidos eran similares a los que medíamos cuando era QA el tóxico inyectado ($659 \pm 147\%$, $520 \pm 30\%$, $434 \pm 14\%$ de controles, valores de ARNm de cFos detectados 6, 12 y 24 h tras la inyección de DCG-IV, respectivamente; $p < 0,01$) (Figura 22).

Por su localización en la sección, las células que expresaban ARNm de cFos parecían ser células de la SNPR, por lo que realizamos un ensayo de doble hibridación *in situ* para comprobar si estas células que estaban activadas en la SN tras la inyección de DCG-IV eran neuronas GABAérgicas, fenotipo neuronal predominante en la SNPR. Usando una sonda no isotópica (revelado en color azul) para localizar ARNm de cFos y una sonda isotópica (revelado como puntos negros) para localizar ARNm de GAD, comprobamos como todas las células que estaban activadas (áquellas que expresaban ARNm de cFos), expresaban también ARNm de GAD (marcador de neuronas GABAérgicas) (ver figura 18, B).

Por tanto, nuestros resultados sugerían que si bien tras la inyección intraestriatal de DCG-IV aumentaba la expresión de ARNm de BDNF en las neuronas dopaminérgicas de la SNPC, eran sin embargo, neuronas de la SNPR las que estaban activadas. Para descartar que estuviesen activadas las neuronas dopaminérgicas de la SNPC tras la lesión con DCG-IV, realizamos otro ensayo de doble ISH, en este caso usando ribosondas para localizar ARNm de cFos (como marcador de actividad neuronal) y ARNm de TH (como marcador de neuronas dopaminérgicas).

Este ensayo nos permitió demostrar que las neuronas dopaminérgicas de la SNPC (positivas para ARNm de TH, revelado en azul) no estaban activadas (positivas para ARNm de cFos, revelado como puntos negros tras un tratamiento con una emulsión autorradiográfica). Así, en las secciones donde observábamos células que expresaban ARNm de cFos éstas no eran positivas para ARNm de TH, y al contrario, las células que eran positivas para ARNm de TH no expresaban ARNm de cFos (Figura 18, C).

Cuando la estructura estudiada fue la corteza, el análisis de la expresión de ARNm de cFos demostró activación de toda la corteza ipsilateral en respuesta a DCG-IV, incluyendo a las cortezas cingular, frontal y parietal y a las cortezas insular y piriforme (Fig. 21). Los niveles de ARNm de cFos fueron máximos 6 h tras la lesión, con un aumento medio superior al observado cuando usamos QA para provocar la lesión en estriado (Ver tabla 6 y fig. 21).

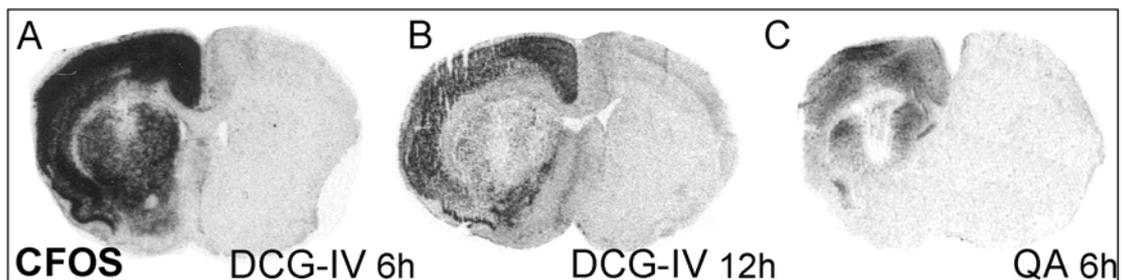


Figura 21. Aumento de la expresión de ARNm de cFos en la corteza tras la inyección en estriado de DCG-IV. Al comparar las autorradiografías puede observarse como hay un mayor aumento en la expresión de ARNm de cFos cuando inyectamos en estriado DCG-IV en vez de QA. Es destacable el hecho de que, aunque hay un enorme aumento en la expresión de mensajero de cFos, este aumento respecto a valores de control está completamente limitado a la corteza ipsilateral al estriado lesionado.

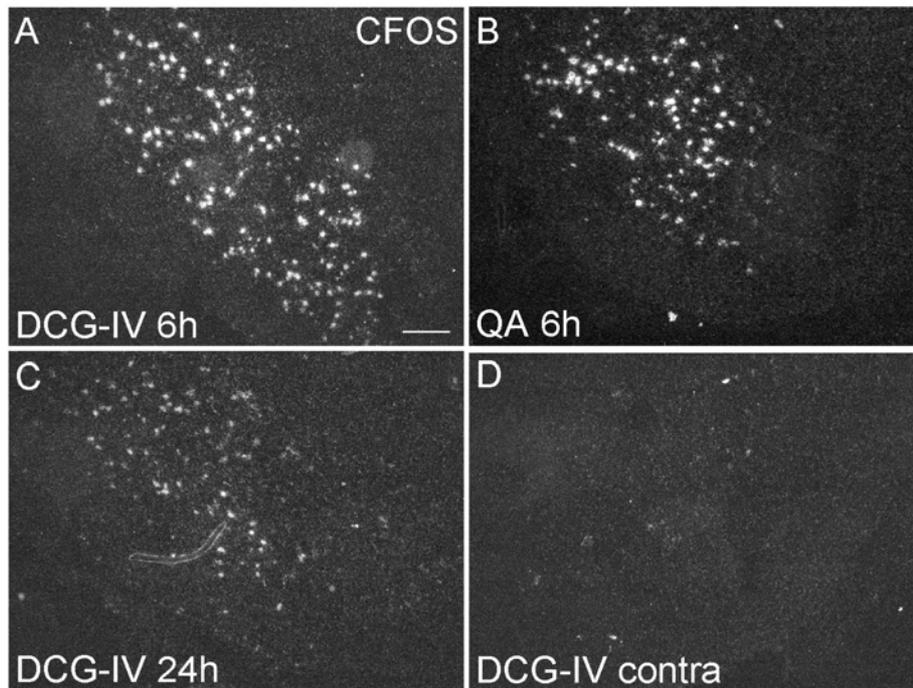


Figura 22. La inyección de DCG-IV en el estriado aumentó la expresión de ARNm de cFos en la SNPR ipsilateral (Microfotografías A y C), pero no en el lado contralateral (D). Los niveles de ARNm de cFos fueron máximos en las primeras horas tras la inyección estriatal de DCG-IV, y disminuyeron conforme aumentaba el tiempo postlesión estudiado. El patrón de expresión de ARNm de cFos en la parte reticulada de la SN fue muy similar al observado cuando el tóxico inyectado en estriado era QA (comparar con B). Barra de escala: 200 μ m.

Tabla 6. Niveles de ARNm de cFos en diferentes áreas de la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado con DCG-IV

	Corteza cingular		Corteza frontal			Corteza parietal		Corteza piriforme	Corteza insular
	Capa I/III	Capa V	Capa I/III	Capa V	Capa I/III	Capa V			
6 h	Ipsi	623 ± 132*	610 ± 128*	686 ± 124*	700 ± 132*	688 ± 147*	782 ± 118*	293 ± 67*	788 ± 127*
	Contra	90 ± 22	95 ± 17	97 ± 25	92 ± 15	93 ± 14	96 ± 18	99 ± 22	98 ± 19
12 h	Ipsi	304 ± 87*	285 ± 136*	302 ± 60*	320 ± 119*	193 ± 27*	190 ± 82	203 ± 57*	530 ± 165*
	Contra	110 ± 25	108 ± 22	112 ± 19	105 ± 18	115 ± 30	110 ± 23	114 ± 11	117 ± 15
24 h	Ipsi	112 ± 18	118 ± 25	108 ± 22	106 ± 24	105 ± 14	102 ± 26	94 ± 14	102 ± 14
	Contra	96 ± 12	98 ± 16	105 ± 12	96 ± 12	102 ± 14	96 ± 14	98 ± 12	108 ± 22
6 h	Ipsi	946 ± 196*	770 ± 228*	712 ± 227*	342 ± 144*	702 ± 192*	484 ± 159*	1217 ± 167*	783 ± 256*
	Contra	81 ± 35	84 ± 22	96 ± 11	107 ± 21	98 ± 13	90 ± 18	64 ± 46	90 ± 14
12 h	Ipsi	592 ± 297*	392 ± 152*	500 ± 222*	449 ± 238*	340 ± 149*	381 ± 205*	622 ± 277*	374 ± 159*
	Contra	101 ± 12	84 ± 19	89 ± 16	71 ± 19	95 ± 21	79 ± 37	81 ± 33	86 ± 32
24 h	Ipsi	254 ± 175	61 ± 52	98 ± 45	385 ± 220*	81 ± 16	265 ± 130	456 ± 224*	124 ± 45
	Contra	101 ± 12	99 ± 15	85 ± 32	92 ± 18	98 ± 5	103 ± 15	101 ± 12	90 ± 23

Los niveles de ARNm de cFos fueron medidos usando como parámetro la densidad de granos de plata sobre cuerpos celulares en las capas I/III y capa V de la corteza cingular, frontal, parietal y de las cortezas insular y piriforme. Los resultados (media ± D.E.) están expresados como porcentaje respecto al valor medio medido en animales control. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffe; * $p < 0,01$ si comparamos con valores control (ver Materiales y métodos para obtener información más detallada). Si comparamos la expresión de mensajero de cFos en la corteza tras la inyección de DCG-IV o de QA podemos observar como el DCG-IV produce un aumento de actividad neuronal en la corteza mayor que el que produce la inyección intrastriatal de QA. Esta diferencia es particularmente patente en las primeras horas tras la operación.

6.D.1. El aumento de la expresión de ARNm de BDNF en la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado es dependiente de actividad neuronal

Como en todas las áreas de la corteza donde la expresión de ARNm de BDNF estaba por encima de valores de control también detectamos un aumento en la expresión de ARNm de cFos, realizamos un ensayo de doble ISH para dilucidar si las células de la corteza que expresaban este ARNm de BDNF estaban activadas. En este caso usamos una ribosonda marcada con ³⁵S para localizar ARNm de BDNF (el revelado da como resultado puntos negros tras un tratamiento con emulsión autorradiográfica), mientras que para localizar ARNm de cFos usamos una sonda marcada con digoxigenina (revelado mediante un método cromogénico como manchas de color azul).

Este ensayo claramente demostró que la expresión de ARNm de cFos estaba por encima de valores de control en todas las células en las que se detectaba un aumento de la expresión de ARNm de BDNF tras la lesión excitotóxica del estriado con DCG-IV (Fig. 23, microfotografía A). Más aún, la cuantificación de los niveles de ARNm de BDNF y de cFos en este área demostró que existe una moderadamente fuerte relación lineal positiva entre la expresión de ambos mensajeros, es decir, cuanta más activada se encuentra una neurona de la corteza en este modelo de lesión excitotóxica del estriado, mayores niveles de ARNm de BDNF expresa ($r^2=0,657$; $p<0,001$, ver figura 23, C).

Tras la obtención de este resultado con DCG-IV, también realizamos el ensayo de doble ISH para localizar ARNm de cFos y de BDNF en cortes de corteza de los animales en los que se había inyectado QA en el estriado. En este caso también colocalizaban estos dos mensajeros en las mismas células (Fig. 23, fotografía B).

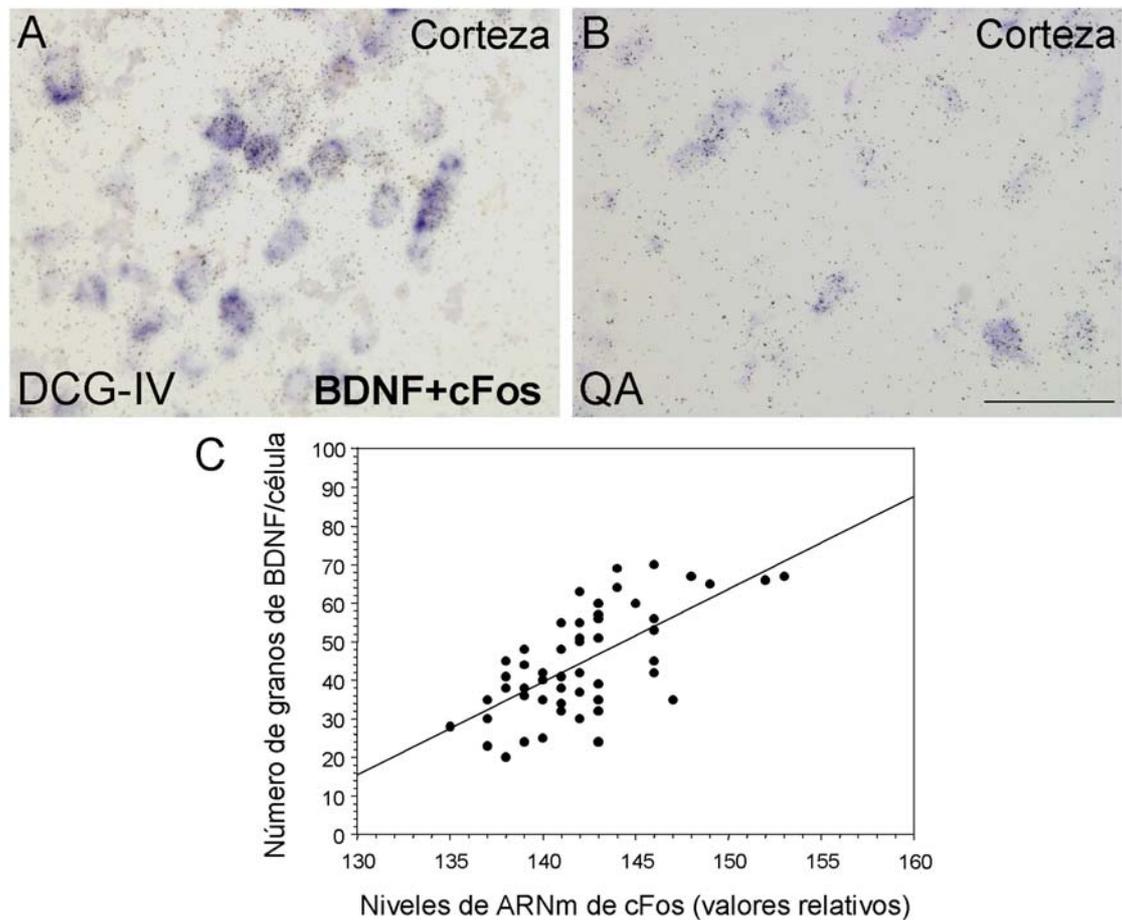


Figura 23. El aumento de expresión de ARNm de BDNF detectado en la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado es dependiente de aumento de la actividad neuronal. A y B: un ensayo de doble ISH demostró que las células que expresaban ARNm de BDNF en la corteza en respuesta a la inyección intraestriatal de DCG-IV (A) o QA (B) (acumulaciones de granos negros) estaban activadas, es decir, expresaban también ARNm de cFos (tinción azul). Gráfica C: la cuantificación de los niveles de ARNm de BDNF y cFos (como se describe en Materiales y métodos) demostró que había una moderada pero significativamente fuerte relación lineal positiva entre ambos parámetros ($r^2=0,657$; $p<0,001$). Barra de escala: 50 μ m.

6.E. Efecto de la inyección en el estriado de DCG-IV en la expresión de ARNm de BDNF y de cFos en el núcleo subtalámico

Los ensayos de hibridación *in situ* mostraron un aumento en la expresión de ARNm de BDNF en el NST tras lesionar el estriado con DCG-IV (Fig. 26). Esta sobreexpresión de mensajero de BDNF fue encontrada en el NST ipsilateral al estriado lesionado tan pronto como 6 horas tras la lesión ($296 \pm 98\%$ de los niveles control; $p < 0,01$), hecho que no observamos en el caso de QA. A las 12 h tras la inyección de DCG-IV, los niveles de ARNm de BDNF eran del $334 \pm 82\%$ de valores control ($p < 0,01$).

Por tanto, si comparamos los resultados observados en la expresión de ARNm de BDNF cuando inyectamos en el estriado QA o DCG-IV, vemos como DCG-IV induce una mayor sobreexpresión de este ARNm en el NST (Ver figura 24). También con DCG-IV, los valores de ARNm de BDNF en el NST ipsilateral son similares a los valores control 24 h tras la inyección en estriado ($147 \pm 30\%$ de controles).

En cuanto a la expresión de ARNm de cFos, los ensayos de hibridación *in situ* demostraron un patrón de expresión muy similar al que encontramos cuando estudiamos la expresión de ARNm de BDNF (Ver figura 26). Los niveles de ARNm de cFos en el NST fueron máximos 6 h tras la inyección de DCG-IV en el estriado ($698 \pm 109\%$ de los niveles control; $p < 0,01$). Al igual que ocurría con QA, 12 h tras la lesión la sobreexpresión de cFos era ya algo menor ($372 \pm 93\%$ de controles; $p < 0,01$) e inexistente a las 24 h ($130 \pm 44\%$ de controles).

Al igual que ocurría con la expresión de ARNm de BDNF, la sobreexpresión de mensajero de cFos estuvo restringida al NST ipsilateral y los valores medidos en el modelo de la inyección de DCG-IV fueron superiores a los que medíamos en el NST tras la inyección en estriado de QA (Ver figuras 25 y 26).

De forma similar a lo que ocurría cuando la estructura estudiada era la corteza, el patrón de aumento de la expresión de ARNm de cFos en el NST era muy similar al de BDNF. Consecuentemente, en este caso también realizamos un ensayo de doble ISH que demostró que todas las células del NST que expresaban niveles de ARNm de BDNF por encima de valores control estaban activadas, es decir, expresaban altos niveles de ARNm de cFos (Figura 26, microfotografía E).

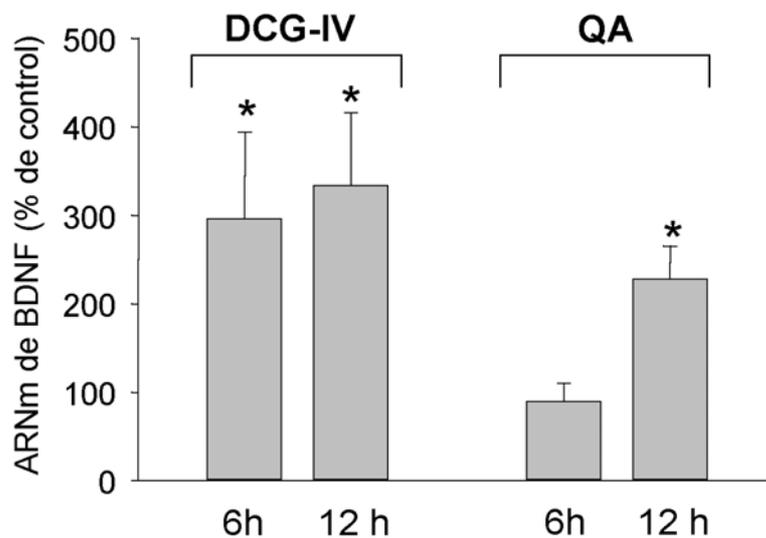


Figura 24. Histogramas representando la cuantificación de ARNm de BDNF en el NST tras la inyección en el estriado de DCG-IV y comparación de estos resultados con los obtenidos cuando se inyectó en estriado QA. Los resultados representan la media \pm D.E. y se expresan como porcentaje de los niveles de ARNm de BDNF medidos en animales inyectados con Ringer. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffé; $*p < 0,01$ comparado con controles (ver Materiales y métodos para más detalles sobre la cuantificación).

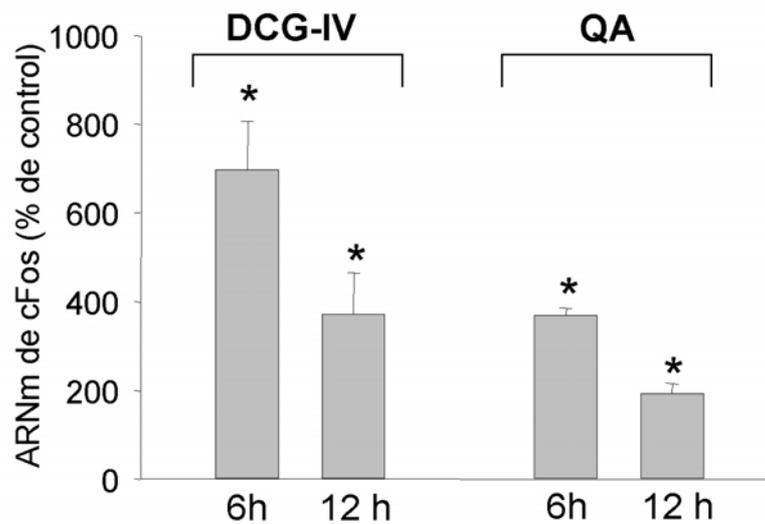


Figura 25. Histogramas representando la cuantificación de ARNm de cFos en el NST tras la inyección en el estriado de DCG-IV y QA. En este gráfico podemos observar como la inyección de DCG-IV en estriado induce una mayor sobreexpresión de ARNm de cFos en el NST que la inyección en las mismas condiciones de QA. Los resultados representan la media \pm D.E. y se expresan como porcentaje de los niveles de ARNm de cFos en animales inyectados con control. Significación estadística: análisis de varianza de una cola seguido de test de Scheffee; * $p < 0,01$ comparado con controles.

Figura 26 (en la siguiente página). Aumento de la expresión de ARNm de BDNF y de cFos en el NST ipsilateral al estriado lesionado con DCG-IV. A y B: microfotografías de campo oscuro que muestran como la inyección de DCG-IV en el estriado induce sobreexpresión de mensajero de BDNF en el NST ipsilateral pero no en el lado contralateral. C y D: microfotografías de campo oscuro en secciones consecutivas a áquellas usadas para el análisis de la expresión de BDNF que muestran los altos niveles de ARNm de cFos detectados en el NST ipsilateral tras la inyección de DCG-IV. E: un ensayo de doble ISH mostró, al igual que observamos en la corteza, que las células que expresaban ARNm de BDNF (puntos negros) estaban activadas, es decir, expresaban también ARNm de cFos (tinción azul). Barras de escala: A- D, 200 μ m; E, 50 μ m.

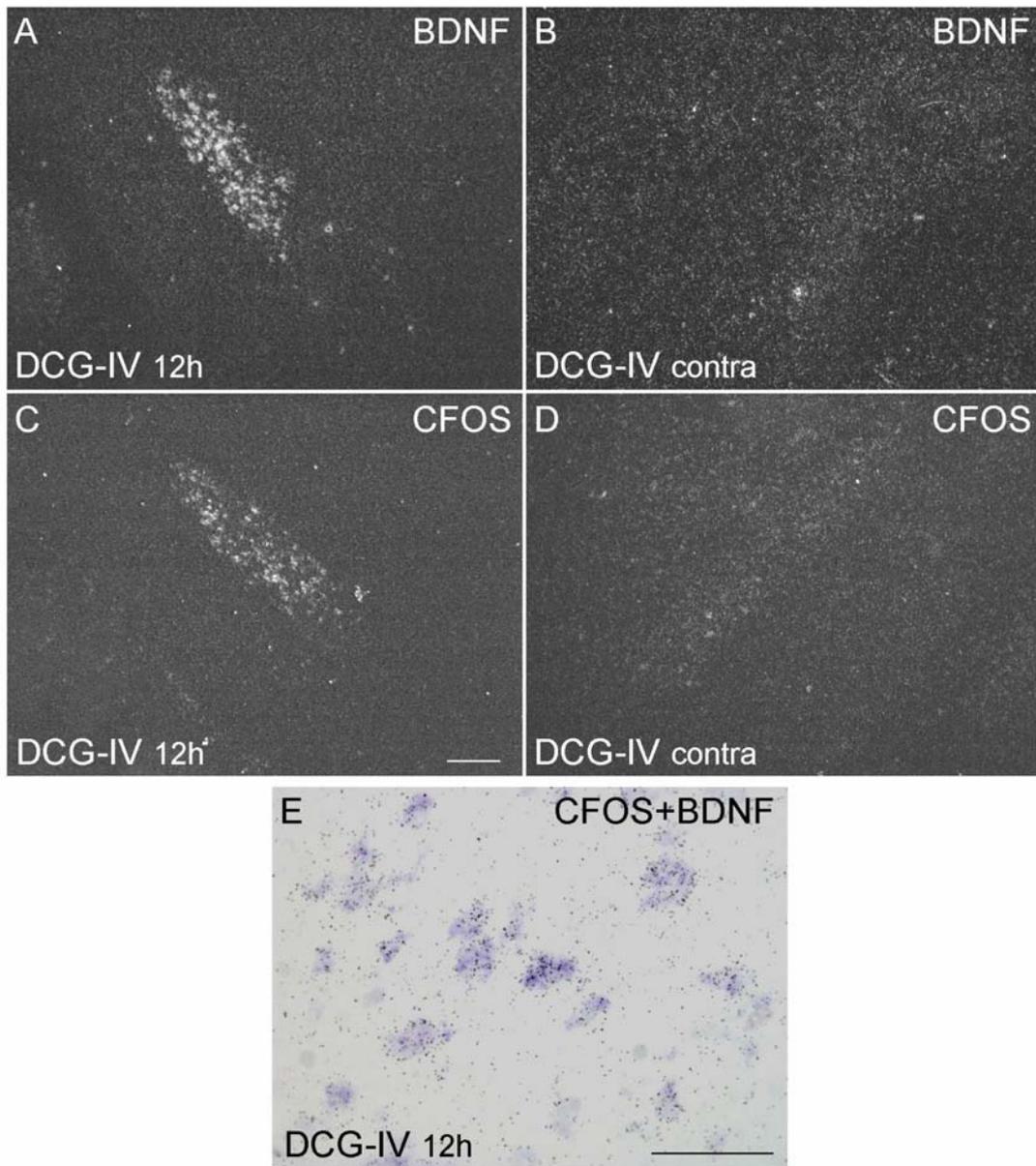


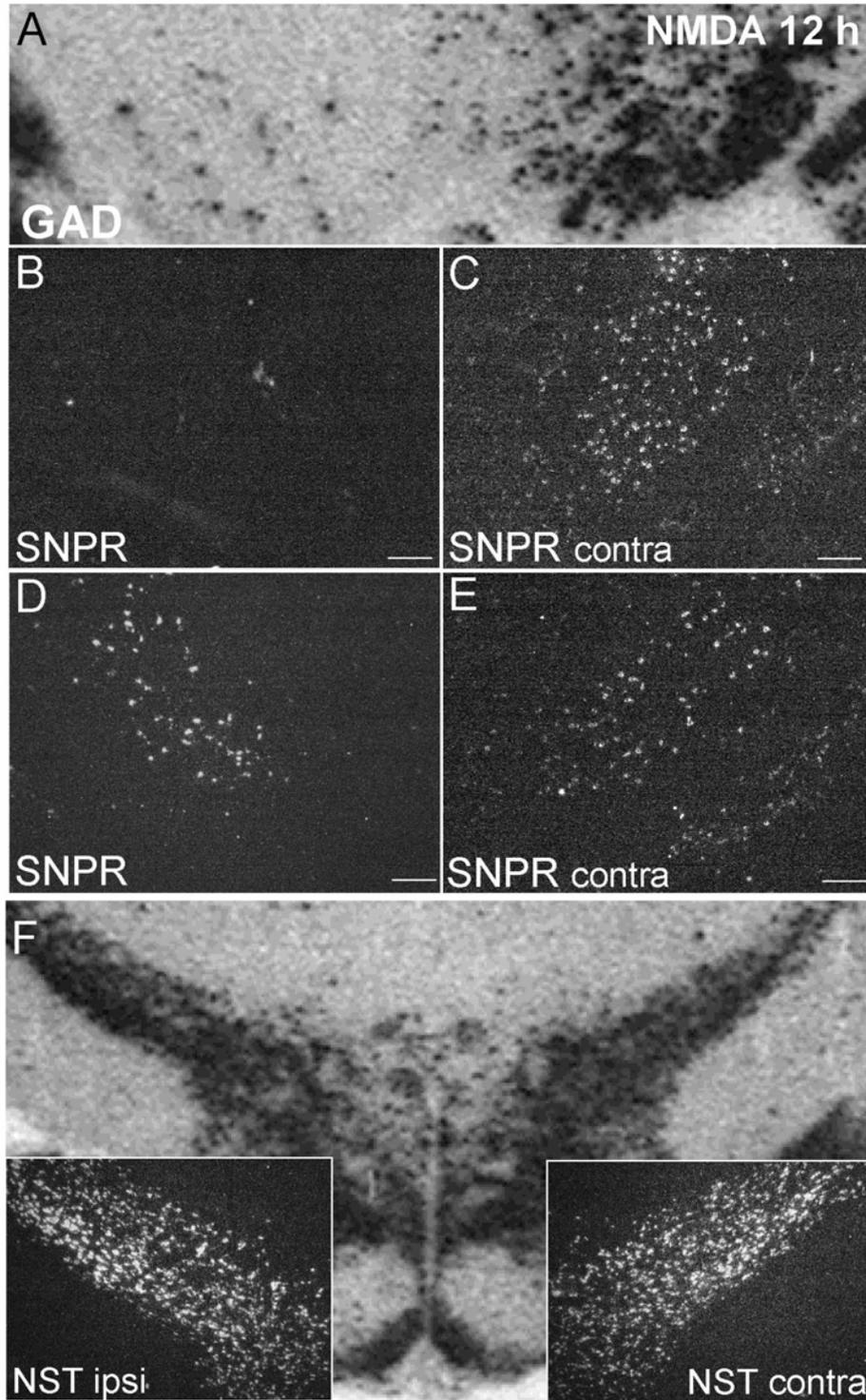
Figura 26. Una inyección de DCG-IV en el estriado aumenta la expresión de ARNm de BDNF y de cFos en el NST ipsilateral.

7. EFECTO DE LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DE LA SNPR EN LA EXPRESION DE ARNm DE BDNF EN LOS GANGLIOS BASALES

7.A. Estudio de la lesión provocada en la SNPR por la inyección de NMDA

El fenotipo neuronal predominante en la SNPR es el fenotipo GABAérgico, por tanto, como hemos señalado en Materiales y métodos, para poner de manifiesto la lesión provocada en esta estructura mediante la inyección de 60 nm de NMDA, estudiamos la expresión de ARNm de GAD mediante un ensayo de ISH. En aquellas zonas donde encontramos pérdida de ARNm de GAD (pérdida de señal de hibridación) asumimos que esta pérdida se debe a la muerte de las neuronas GABAérgicas (Figura 27). La pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD en la SNPR se examinó a las 12 h tras la inyección de NMDA, que fue el tiempo de estudio de expresión de ARNm de BDNF y de cFos más posterior. El tamaño de la lesión fue de $1,22 \pm 0,27 \text{ mm}^3$.

Figura 27 (siguiente página). La inyección de NMDA en la SNPR causa una lesión que es puesta de manifiesto por la pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD. Como nuestro objetivo, fundamentalmente, era el estudio de la regulación de la expresión de ARNm de BDNF en el NST tras la lesión excitotóxica de la SNPR, la inyección de NMDA se realizó en unas coordenadas lo suficientemente distales como para que la lesión en ningún caso alcanzase el NST. En este sentido, las figuras B, D, y F muestran como conforme las coordenadas en el eje rostrocaudal son menos distales, la lesión va siendo menor, no encontrando ningún signo de lesión a nivel de NST. A: autorradiografía en la que se observa la completa pérdida de señal de hibridación de ARNm de GAD en la zona de la SNPR donde se realiza la inyección de NMDA. B y C: detalle de la pérdida de ARNm de GAD en la SNPR ipsilateral. D-F: la lesión es menor a medida que nos alejamos del sitio de inyección de NMDA, siendo inexistente a nivel de NST (Fig. F). Barras de escala: 200 μm . El tiempo de estudio de la pérdida de ARNm de GAD fue 12 h, ya que éste fue el último tiempo postlesión estudiado.



7.B. Estudio de la expresión de ARNm de BDNF en el NST y otros núcleos de los GB tras la lesión excitotóxica de la SNPR

En los apartados anteriores hemos demostrado como las lesiones excitotóxicas del estriado aumentan la expresión de ARNm de BDNF a corto plazo en la SNPC y en la corteza, que son las principales estructuras a partir de las cuales llegan aferencias al estriado. Por tanto, para continuar nuestro estudio sobre la influencia de la pérdida de neuronas diana en la regulación de la expresión de ARNm de BDNF, hemos observado si hay algún cambio en la expresión de esta neurotrofina en el estriado o en el NST cuando se causa una lesión excitotóxica en la SNPR, que es la estructura sobre la cual proyectan sus axones.

Nuestros experimentos mostraron como la lesión excitotóxica de la SNPR mediante una inyección de NMDA no es capaz de inducir la expresión de ARNm de BDNF, ni en el NST ni en el estriado a ninguno de los dos tiempos postlesion estudiados: 6 y 12 h (Figura 28).

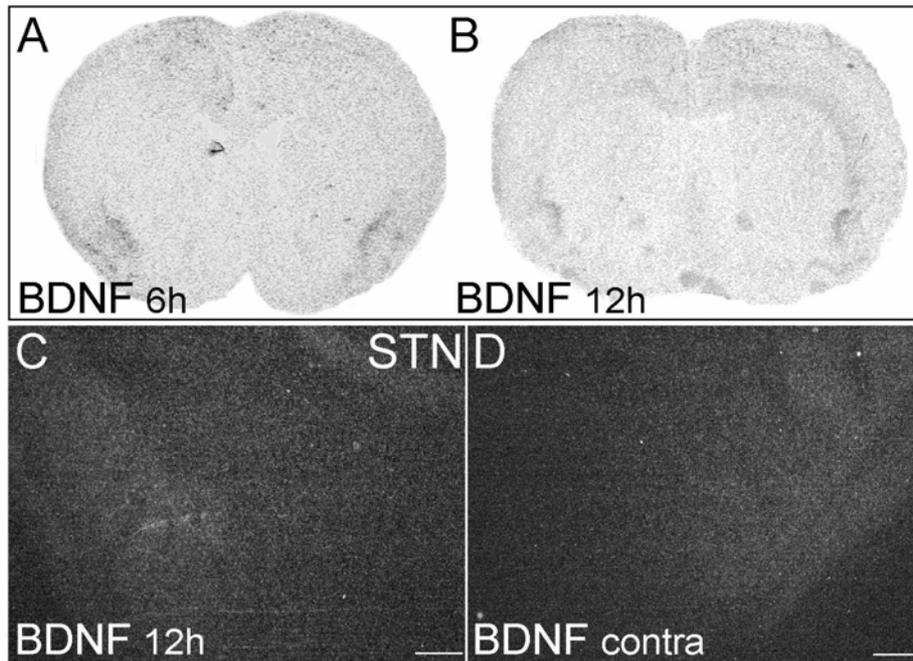


Figura 28. La lesión excitotóxica de la SNPR mediante una inyección de 60 nmoles de NMDA no modifica la expresión de ARNm de BDNF ni en el NST, ni en el estriado ipsilateral, por tanto, la pérdida de las neuronas diana de estas dos estructuras en la SNPR no causa una sobreexpresión de mensajero de BDNF en ellas, como sí ocurría en la corteza y la SNPC cuando sus neuronas diana en el estriado eran lesionadas. A y B: autorradiografías donde puede observarse que la lesión excitotóxica de la SNPR no produce expresión de ARNm de BDNF en el estriado. C y D: microfotografías de campo oscuro a nivel del NST que muestran como la lesión de la SNPR tampoco induce la expresión de ARNm de BDNF en este centro. Barra de escala: 200 μm .

7.C. Estudio de la expresión de ARNm de cFos en el NST y en el estriado tras la lesión excitotóxica de la SNPR

Tras la lesión excitotóxica de la SNPR con NMDA estudiamos la actividad neuronal mediante el análisis con la técnica de hibridación *in situ* de la expresión de ARNm de cFos. Nos centramos en el estudio de la expresión de mensajero de cFos en el NST y en el estriado porque son las estructuras que proyectan axones sobre la SNPR. Además, estudiamos la actividad neuronal en la misma SNPR.

Nuestros estudios demostraron como 6 h tras la lesión se detecta expresión de ARNm de cFos en el estriado (Fig. 29), en el NST (Fig. 30) y en la SNPR (Fig. 31), con valores de $267 \pm 89\%$, $357 \pm 64\%$ y $281 \pm 102\%$ de control, respectivamente ($p < 0,05$). A las 12 h sólo detectamos activación en el NST ($281 \pm 81\%$ de valores control; $p < 0,05$).

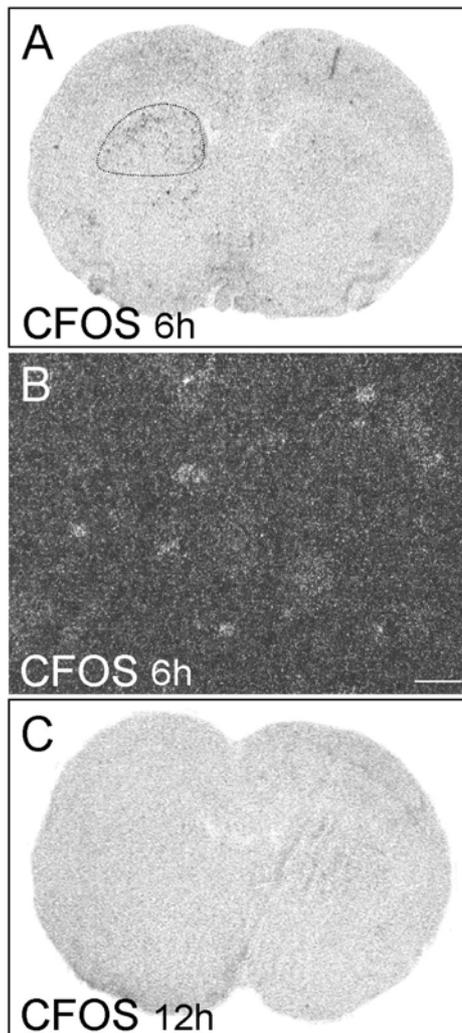


Figura 29. La lesión excitotóxica de la SNPR mediante una inyección de NMDA aumenta la actividad neuronal en el estriado. La técnica de hibridación *in situ* demostró como en el estriado ipsilateral aparece expresión de ARNm de cFos 6 h después de la inyección de NMDA en la SNPR. Es destacable el hecho de que las neuronas activadas se localizen en el área dorsal del estriado (indicado mediante línea de puntos). A y C: autorradiografías que muestran como a las 6 h tras la inyección de NMDA aparece expresión de mensajero de cFos en el estriado, pero sin embargo, no detectamos ya este ARNm 6 h más tarde (12 h tras la lesión). B: microfotografía de campo oscuro a alto aumento que muestra células expresando ARNm de cFos en el estriado. Barra de escala: 50 μ m.

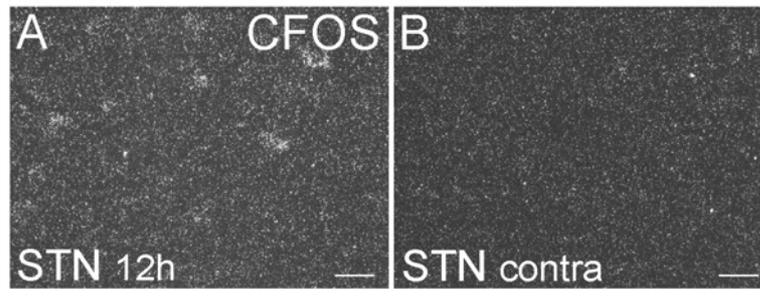


Figura 30. Expresión de ARNm de cFos en el NST tras la lesión de la SNPR con NMDA. Tras la inyección de NMDA en la SNPR se detecta sobreexpresión de ARNm de cFos en el NST ipsilateral en los dos tiempos postlesión estudiados: 6 y 12 h. A y B: microfotografías de campo oscuro y alta magnificación tras el tratamiento de emulsión autorradiográfica donde pueden observarse células que expresan altos niveles de ARNm de cFos en el STN a las 12 h tras la lesión de la SNPR con NMDA. Barras de escala: 50 μ m.

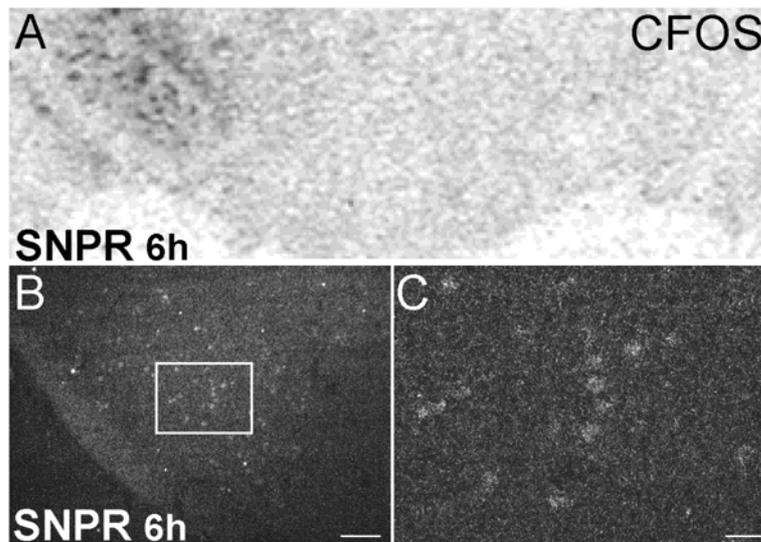


Figura 31. Expresión de ARNm de cFos en la SNPR tras la lesión de esta estructura con NMDA. A: autorradiografía que muestra la enorme inducción de ARNm de cFos que detectamos en la SNPR ipsilateral 6 h tras la inyección de NMDA. B: microfotografía de campo oscuro de la sección de la figura A tras el tratamiento de emulsión autorradiográfica donde pueden observarse las células que expresan altos niveles de ARNm de cFos. El recuadro muestra la zona fotografiada a mayor aumento en C. Barras de escala: B, 200 μ m; C, 50 μ m.

DISCUSIÓN

1. Regulación de la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC tras la lesión excitotóxica del estriado

En esta tesis hemos estudiado los cambios en la expresión de BDNF que tienen lugar en la substantia nigra pars compacta tras la lesión excitotóxica de sus neuronas diana en el estriado con objeto de profundizar en los mecanismos que regulan la expresión de esta neurotrofina en el complejo de los ganglios basales. La lesión excitotóxica del estriado se causó con ácido kaínico, con ácido quinolínico o con DCG-IV, siendo cada una de estas excitotoxinas específica de un tipo de receptor de glutamato: AMPA/kainato, NMDA o metabotrópico, respectivamente. Mediante la técnica de hibridación *in situ* hemos estudiado el patrón de expresión de ARNm de BDNF en la SN a las 6, 12 y 24 horas tras la inyección en el estriado de KA, QA o DCG-IV. La pérdida de las neuronas GABAérgicas del estriado tras la inyección de estas neurotoxinas se puso de manifiesto mediante el análisis del patrón de expresión de ARNm de GAD (Acido glutámico descarboxilasa), enzima característica de este fenotipo neuronal.

En un trabajo previo, nuestro grupo demostró que el corte de los axones de las neuronas de la SNPC que envían eferencias al estriado aumenta la expresión de ARNm de BDNF en los cuerpos celulares de estas neuronas (Venero y col., 2000). Este tipo de lesión no sólo interrumpe el transporte axonal entre la SNPC y el estriado, sino que también causa la muerte de las neuronas de la SNPC (Venero y col., 1997), lo que sugería un papel protector de BDNF sobre las neuronas dopaminérgicas dañadas. Este concepto resaltaba la importancia de estudiar la regulación de la expresión de ARNm de BDNF en la SN en respuesta a la pérdida de sus neuronas diana en el estriado.

Nuestro estudio ha demostrado que la destrucción de las neuronas de proyección del estriado mediante la inyección de KA o QA aumenta la expresión de ARNm de BDNF en las neuronas de la SN cuyas fibras lo inervan. Los niveles de BDNF en la SN fueron máximos 12 horas tras la lesión, encontrándose valores ligeramente inferiores 24 h tras la inyección de ambas excitotoxinas. Un ensayo de doble hibridación *in situ* para localizar ARNm de BDNF y TH demostró que todas las células que expresaban ARNm de BDNF

también contenían ARNm de TH (Tirosina hidroxilasa), enzima característica de neuronas dopaminérgicas.

El siguiente paso en nuestro trabajo fue determinar si este aumento de la expresión de ARNm de BDNF detectado en las neuronas dopaminérgicas de la SN estaba o no regulado en algún grado por actividad neuronal ya que BDNF es un típico ejemplo de gen cuya expresión se puede inducir por un aumento de la actividad neuronal (West y col., 2001). Con este objeto, en primer lugar, realizamos un ensayo de hibridación *in situ* para localizar ARNm de cFos en secciones consecutivas a aquellas que habíamos procesado para estudiar la expresión de ARNm de BDNF. Este ensayo demostró un enorme aumento de los niveles de ARNm de cFos, pero este aumento parecía estar restringido a la parte reticulada de la SN. Un ensayo de doble hibridación *in situ* para localizar ARNm de cFos y GAD (marcador de neuronas GABAérgicas, fenotipo predominante en SNPR) confirmó la naturaleza GABAérgica de todas las células que expresaban ARNm de cFos tras la inyección en el estriado de KA, QA o DCG-IV.

Un segundo ensayo de doble ISH, en este caso para localizar ARNm de cFos y de TH en la SN, demostró que ninguna de las neuronas dopaminérgicas de la SN resultaba activada tras lesionar mediante excitotoxicidad el estriado. Este resultado definitivamente establece que la expresión de ARNm de BDNF que se detecta en la SNPC tras una lesión excitotóxica del estriado está regulada por la pérdida de su tejido diana y es completamente independiente de un aumento de actividad neuronal.

2. Sentido biológico del aumento de expresión de BDNF en la SNPC tras la lesión del estriado

Como vimos en la introducción de esta tesis, BDNF ha demostrado atenuar, al menos parcialmente, la muerte de neuronas del estriado provocada por excitotoxinas, tanto *in vitro* (Nakao y col., 1995; Gratacòs y col., 2001), como *in vivo* (Martínez-Serrano y Björklund, 1996; Bemelmans y col., 1999; Pérez-Navarro y col., 1999, 2000; Gratacòs y col., 2001, Kells y col., 2004; ver tabla 3 de la introducción para una breve descripción de cada uno de estos trabajos).

El papel neuroprotector de BDNF en la supervivencia y la diferenciación de las neuronas espinosas de proyección de tamaño medio del estriado podría estar mediado por las cascadas de señalización que activa cuando se une a su receptor *trkB* (Kaplan y col., 1994; Drake y col., 1999). Adicionalmente, BDNF podría proporcionar neuroprotección aumentando la síntesis de proteínas fijadoras de calcio (Ventimiglia y col., 1995; Mizuno y col., 1994; Nakao y col., 1995), aumentando de esta manera la capacidad de defensa de las neuronas frente a agentes excitotóxicos (Mattson y col., 1991).

En los ratones genéticamente modificados para no expresar BDNF se ha observado una reducción en marcadores neuronales como son la parvalbúmina, la calbindina, y la fosfoproteína regulada por dopamina DARPP-32 específicamente en el estriado (Jones y col., 1994; Altar y col., 1997; Ivkovic y Ehrlich, 1999), por tanto, el estriado es una de las estructuras más severamente afectadas en ratones que carecen completamente de la proteína de BDNF.

Fusco y col. (2003) han observado que prácticamente todas la interneuronas colinérgicas del estriado contienen la proteína de BDNF, y que la cantidad de BDNF es mayor en estas neuronas que en las neuronas espinosas de tamaño medio que contienen calbindina. Más aún, cuando se lesiona el estriado con QA, en las neuronas colinérgicas que sobreviven se observa una cantidad moderada de BDNF. Curiosamente, las neuronas colinérgicas del estriado comienzan a sufrir degeneración en estadios muy avanzados de la EH, y aún en este momento, la degeneración no es tan severa como en otras

poblaciones neuronales presentes en el estriado (Ferrante y col., 1987a, 1987b; Albin y col., 1990a, 1990b). Este mismo fenómeno se observa cuando se lesiona el estriado con QA (Figueredo-Cardenas y col., 1998). Por tanto, el contenido en BDNF de las interneuronas colinérgicas del estriado podría estar relacionado con el mecanismo que hace a estas neuronas más resistentes a la muerte frente a excitotoxicidad y en la EH.

El trabajo de Altar y col. (1997) demostró como BDNF era anterógradamente transportado desde los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas de la SN hasta las terminales dopaminérgicas en el estriado. Estudios de localización subcelular de BDNF han demostrado que esta neurotrofina es almacenada en vesículas cerca de las terminales sinápticas o que forma parte de la fracción de las vesículas sinápticas (Fawcett y col., 1997; Hausenbank y col., 1998; Moller y col., 1998), y de hecho, las neurotrofinas son liberadas al espacio sináptico tras la despolarización de las neuronas en el SNC (Bloch y Thoenen, 1995, 1996; Goodman, 1996). Más aún, el BDNF anterógradamente transportado ha demostrado aumentar la supervivencia de las neuronas post-sinápticas (Caleo y col., 2000; Fawcett y col., 2000; von Bartheld y col., 2001).

Recientemente, un estudio usando un ratón modificado genéticamente para no expresar BDNF de forma específica en la corteza (Baquet y col., 2004, comentado más detalladamente en el siguiente apartado de esta discusión) ha demostrado las importantes acciones que ejerce BDNF sobre las neuronas de proyección del estriado. Este ratón muestra menor desarrollo dendrítico, menor tamaño del cuerpo celular y menor número de neuronas espinosas de tamaño medio del estriado, este último efecto sólo evidente cuando los ratones estudiados son de mediana edad, rasgos característicos de la enfermedad de Huntington. De acuerdo con estos resultados de Baquet y col., el tratamiento de cultivos de neuronas del estriado con BDNF no sólo aumenta el número de neuronas que contienen la proteína calbindina (rasgo característico de madurez de las neuronas de proyección del estriado) sino que aumenta el tamaño del cuerpo celular, la longitud de los axones y el desarrollo dendrítico de éstas (Gavalda y col., 2004).

Este conjunto de datos sugiere un importante papel trófico de BDNF sobre las neuronas del estriado. De hecho, los enfermos de EH muestran una reducción en la transcripción del gen de BDNF en la corteza y unos niveles menores de la proteína de BDNF tanto en la corteza como en el estriado (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001).

Alternativamente, existen también numerosas evidencias del papel trófico que ejerce BDNF sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN. En este sentido se ha demostrado que una subpoblación de neuronas dopaminérgicas de la SNPC transporta retrógradamente BDNF cuando éste se inyecta en el estriado (Mufson y col., 1994), los cultivos de neuronas del mesencéfalo responden a BDNF (Hyman y col., 1991; Knüsel y col., 1991), y esta neurotrofina ha demostrado ser un agente neuroprotector del sistema dopaminérgico nigroestriatal en diferentes modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Frim y col., 1994; Levivier y col., 1995; Shults y col., 1995; Galpern y col., 1996; Hung y Lee, 1996; entre otros, ampliamente revisado en la introducción).

Sin embargo, Venero y col. (2000) observaron que la axotomía del HPM no producía cambios en la expresión del receptor de BDNF, trkB, en la SN pero sí en el estriado a pesar de que, como hemos descrito anteriormente, esta lesión aumentaba la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC. En este sentido, la aplicación de BDNF en la SNPC o en el mismo sitio de la lesión no evita la muerte de las neuronas dopaminérgicas tras el corte de sus axones (Knüsel y col., 1992; Lapchak y col., 1993a), y es particularmente remarcable el hecho de en la mayoría de los estudios que muestran una acción neuroprotectora de BDNF en distintos modelos animales de la EP, éste es aplicado en el estriado (Levivier y col., 1995; Shults y col., 1995; Yurek y col., 1996).

Más aún, la inyección de excitotoxinas en el estriado causa la muerte de las neuronas de esta estructura, pero deja intactos los axones que a ella llegan desde otras estructuras, como por ejemplo, los axones dopaminérgicos que llegan desde la SNPC, un rasgo típico de las llamadas “neurotoxinas que no dañan axones” (Schwarcz y col., 1983, 1984). Consecuentemente, el aumento de expresión de ARNm de BDNF que se produce en la SN tras la lesión del

estriado sugiere un papel trófico del BDNF sintetizado en esta estructura sobre sus neuronas diana en el estriado.

De hecho, la transfección con el gen de BDNF de las neuronas dopaminérgicas de la SN mediante adenovirus ha demostrado ser una estrategia eficaz para aumentar la cantidad de proteína de BDNF en el estriado, aunque este BDNF no fue capaz de proteger las neuronas del estriado de la muerte inducida por accidente cerebrovascular (Gustafsson y col., 2003).

3. Regulación de la expresión de ARNm de BDNF en la corteza tras la lesión excitotóxica del estriado

El BDNF que se encuentra en el estriado proviene mayormente de la corteza (Altar y col., 1997; Altar y DiStefano, 1998; Mufson y col., 1999; von Bartheld y col., 2001), de ahí que estudiásemos que ocurre con la expresión de BDNF en esta estructura después de la inyección intrastriatal de KA, QA o DCG-IV. Al igual que observamos en la SNPC, la lesión excitotóxica del estriado aumenta la expresión de ARNm de BDNF en la corteza. Asimismo, cuando estudiamos el patrón de expresión de ARNm de cFos en secciones consecutivas a aquellas procesadas para el estudio de la expresión de ARNm de BDNF, observamos que la inyección de cualquiera de estas neurotoxinas en estriado produce un aumento de cFos en la corteza.

Como el patrón de aumento de expresión de ARNm de cFos en la corteza era muy similar al que observábamos con BDNF realizamos un ensayo de doble ISH para estudiar si las neuronas de la corteza que expresaban BDNF como respuesta a la lesión estriatal estaban o no sobreactivadas. Este ensayo demostró que las células corticales que expresaban altos niveles de BDNF expresaban también altos niveles de mensajero de cFos, una clara indicación de aumento de la actividad neuronal (Mitsikostas y Sánchez del Río, 2001; Steiner y Kitai, 2001).

Estos experimentos demuestran que el mecanismo de regulación de la expresión de BDNF en la SNPC y la corteza es distinto. El aumento de la expresión de BDNF que se detecta en la SNPC es causado únicamente por la

pérdida de sus neuronas diana en el estriado, pero no ocurre así en el caso de la corteza, donde el aumento de la expresión de BDNF está regulado por un aumento de la actividad neuronal, lo que no necesariamente excluye la posibilidad de que sea también dependiente de la pérdida de su tejido diana. De hecho, el aumento de expresión de ARNm de BDNF en la corteza como respuesta a la lesión excitotóxica del estriado se restringió a las capas II/III y a la capa V, así como a las áreas insular y piriforme. Ya que todas ellas envían proyecciones al estriado, se podría establecer una relación directa entre expresión de mensajero de BDNF en la corteza e integridad de sus neuronas diana en el estriado (Canals y col., 2001).

Por tanto, la inducción de la expresión de BDNF en la corteza como respuesta a la lesión excitotóxica del estriado podría ser debida a una acción trófica de esta neurotrofina tanto sobre las mismas neuronas de la corteza como sobre las neuronas espinosas de proyección de tamaño medio del estriado. De hecho, en enfermos de Huntington también se ha detectado degeneración de las neuronas piramidales de proyección de la corteza (Cudkowicz y Kowall, 1990; Rubinsztein, 2002).

Ya hemos comentado previamente en esta discusión las importantes acciones tróficas que BDNF ejerce sobre las neuronas del estriado, deducidas a partir de estudios con ratones modificados para no expresar el gen de esta neurotrofina y de estudios de neuroprotección. Por tanto, a continuación discutiremos los posibles efectos de BDNF sobre las neuronas de la corteza.

Estudios *in vitro* han demostrado que BDNF es capaz de promover la supervivencia de neuronas de la corteza (Ghosh y col., 1994; Catapano y col., 2001) a través de un mecanismo dependiente de calcio (Finkbeiner, 2000). En cortes de tejido en cultivo, BDNF promueve la formación y el aumento de la complejidad de neuritas de, al menos, neuronas piramidales de las capas II/III de la corteza (Horch y col., 1999; Niblock y col., 2000).

Aparte de estos efectos en la supervivencia y terminaciones sinápticas de las neuronas corticales, BDNF a través de su receptor *trkB*, modula la formación y el mantenimiento de sinapsis, y tanto la expresión como la secreción de BDNF están reguladas por actividad neuronal, lo que sugiere posibles funciones de esta neurotrofina en la plasticidad y homeostasis de los

circuitos de la corteza (Poo, 2001). De hecho, la expresión de ARNm de BDNF dependiente de actividad neuronal en la corteza está asociada a regulación de la plasticidad sináptica (Castrén y col., 1992; Schoups y col., 1995; Rocamora y col., 1996; Pollock y col., 2001). Más aún, la despolarización y subsiguiente flujo de calcio promueve la supervivencia de neuronas de la corteza en cultivos y también aumenta la transcripción de ARNm de BDNF (Ghosh y col., 1994).

Especialmente interesantes han sido los experimentos llevados a cabo recientemente utilizando un ratón modificado para no expresar BDNF de forma específica en la corteza. Estos estudios han permitido elucidar las acciones del BDNF sintetizado en la corteza sobre las neuronas de esta estructura (Gorski y col., 2003b) y sobre las neuronas estriatales (Baquet y col., 2004), ya que como previamente hemos comentado, la mayor parte del BDNF que llega a estriado es transportado anterógradamente desde la corteza (Altar y col., 1997). En este ratón se observa disminución del tamaño celular y de la complejidad de las neuronas corticales de la capa II/III (Gorski y col., 2003b), y disminución del volumen de la corteza (Baquet y col., 2004). Aparte de los efectos descritos anteriormente en el apartado 2 de esta discusión, en este ratón, el estriado tiene también un menor volumen, y las neuronas espinosas de tamaño medio no sólo tienen un menor número de dendritas, sino que las que poseen están menos ramificadas. Por tanto, estos estudios demuestran que la pérdida de BDNF en la corteza lleva a una disminución de la conectividad sináptica entre esta estructura y sus neuronas diana en el estriado.

Consecuentemente, nosotros concluimos que la pérdida de neuronas diana del estriado causa un aumento de la expresión de ARNm de BDNF dependiente de actividad neuronal en las neuronas de la corteza que inervan el tejido estriatal. Este fenómeno fuertemente sugiere una actividad neurotrófica multipotente de BDNF procedente de neuronas de la corteza tanto sobre sus neuronas postsinápticas en el estriado como sobre ellas mismas, todo ello en condiciones patológicas muy similares a las observadas en la enfermedad de Huntington.

4. Efecto de la interrupción del transporte entre el estriado y la SN en la regulación de la expresión de BDNF

Con objeto de determinar si la comunicación axonal entre la SNPC y sus neuronas diana en el estriado estaba implicada en el aumento de expresión de ARNm de BDNF que observamos en la SN, inyectamos colchicina en el haz prosencefálico medial. Este tratamiento interrumpe el transporte axonal entre el estriado y la SN (Ceccatelli y col., 1991), sin causar ni degeneración neuronal ni excitotoxicidad. Nosotros encontramos como, tras una única inyección de colchicina en el HPM, se producía un enorme aumento de los niveles de ARNm de BDNF en la SNPC ipsilateral. El análisis de la actividad neuronal en respuesta al tratamiento con colchicina demostró un enorme aumento de la expresión de ARNm de cFos en la SNPR, pero no en la SNPC. Por tanto, los cambios en la expresión de ARNm de BDNF y de cFos en la SN eran similares a los que se producían tras la lesión excitotóxica del estriado. El experimento con la colchicina proporciona una nueva evidencia de que la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC es estrictamente dependiente del tejido diana.

La inducción de la expresión de BDNF en la SN en respuesta a la muerte de sus neuronas diana en el estriado o la interrupción del transporte axonal entre la SN y el estriado fuertemente apoya la hipótesis de que el BDNF sintetizado en la SN tiene importantes acciones tróficas sobre la población GABAérgica del estriado. Si las neuronas diana del estriado controlan la expresión de BDNF en la SNPC, entonces debe existir un factor difusible actualmente desconocido que sea secretado por las neuronas GABAérgicas del estriado, captado por las terminales dopaminérgicas y retrógradamente transportado a los cuerpos celulares de la SNPC donde reprime la transcripción de BDNF.

Esta hipótesis concuerda con la existencia en el gen de BDNF de una secuencia palindrómica que es un elemento silenciador restrictivo de neuronas (NRSEBDNF), la cual está implicada en la correcta regulación de la síntesis de BDNF en respuesta a los cambios en la actividad neuronal (Timmusk y col., 1999). NSRE es un elemento regulador negativo que reprime la expresión de genes neuronales (Timmusk y col., 1999).

El experimento con la colchicina arrojó resultados inesperados ya que la inhibición del transporte entre el estriado y la SN aumentó los niveles de ARNm de BDNF en la corteza ipsilateral, aunque este aumento estaba restringido a las capas II/III de la corteza cingular y parietal y a las regiones insular y piriforme. Es importante recalcar que una de las dos principales aferencias que llegan al estriado desde la corteza parte de las capas II/III (Gerfen, 1992a, b). Interesantemente, las neuronas estriatales que contienen parvalbúmina reciben BDNF transportado anterógradamente específicamente desde las neuronas corticales de la capa II, y son uno de los fenotipos neuronales más severamente afectados en los ratones modificados genéticamente para no expresar BDNF (Altar y col., 1997; Altar y DiStefano, 1998).

El análisis de la actividad neuronal en la corteza en respuesta a la inyección de colchicina en el HPM demostró un enorme aumento de la expresión de ARNm de cFos en toda la corteza, aunque la sobreexpresión de ARNm de BDNF estaba restringida sólo a determinadas áreas de ésta. Este experimento demostró como el aumento de la actividad neuronal en la capa V de la corteza no es suficiente para activar la transcripción del gen de BDNF. Por tanto, parece ser que la expresión de BDNF en las neuronas de las capas II/III de la corteza está finamente regulada. Estas neuronas de la corteza inervan las neuronas del estriado que contienen parvalbúmina, que como antes hemos señalado, es uno de los fenotipos neuronales más sensibles a las acciones tróficas de BDNF.

5. ¿Cuál excitotoxina, KA o QA, es mejor herramienta para el estudio de la regulación de BDNF?

Tanto la inyección de KA como de QA en el estriado a determinadas dosis provoca la muerte de las neuronas de esta estructura por excitotoxicidad. Ambas excitotoxinas producen un patrón de aumento de expresión de ARNm de BDNF en la SN y en la corteza similar pero no idéntica. Las diferencias fueron particularmente evidentes en la corteza ya que, mientras que el QA provocaba una intensa sobreexpresión de BDNF restringida al lado ipsilateral, la sobreexpresión de BDNF provocada por KA se extendía también al hemisferio contralateral. Al igual que en la corteza, la expresión de ARNm de BDNF en el NST tras la inyección en estriado de KA fue bilateral.

En el caso del ARNm de cFos también se observó que cuando el tóxico inyectado en estriado era QA la inducción en la expresión de este mensajero era ipsilateral tanto en la corteza como en el NST, mientras que con KA el patrón de aumento de expresión de cFos era bilateral, como ocurría con BDNF.

Consecuentemente, estos resultados sugieren que la inyección de QA es un modelo más válido para estudiar la regulación de la expresión de factores neurotróficos y sus receptores en respuesta a la pérdida de neuronas diana en el estriado. De hecho, ha sido ampliamente demostrado como los agonistas del receptor NMDA tales como QA dan lugar a un patrón de degeneración más similar al que se produce en la enfermedad de Huntington que los agonistas de los receptores AMPA/Kainato. Las lesiones producidas por estos últimos provocan la muerte de las interneuronas colinérgicas y NADPHd, que sin embargo, no son afectadas por la inyección intraestriatal de agonistas de receptores NMDA, y que sólo sufren degeneración en estadios avanzados de la enfermedad de Huntington (Revisado por Alexi y col., 2000).

De cualquier forma, el aumento de expresión de BDNF que encontramos en la SNPC cuando se produce la lesión del estriado con KA no parece estar relacionada con ningún efecto convulsivo. En primer lugar, la inducción es estrictamente ipsilateral. En segundo lugar, tal inducción no es dependiente de un aumento de la actividad neuronal, que es el factor clave que regula la expresión de ARNm de BDNF en las crisis epilépticas (Zafra y col., 1990). En

tercer lugar, la inyección sistémica de KA causa una disminución de la expresión de BDNF en la SN (Aliaga y col., 1999).

6. DCG-IV como modelo para estudiar la expresión de BDNF en los GB.

DCG-IV es un agonista del grupo II de los receptores metabotrópicos del glutamato (Conn y Pin, 1997) que ha demostrado ser tóxico para la población GABAérgica del estriado cuando se inyecta a determinadas dosis en esta estructura (Matarredona y col., 2001; Venero y col., 2002). Al igual que ocurre con KA o QA, la inyección intrastriatal de DCG-IV no daña las terminales dopaminérgicas que llegan desde la SNPC. Se ha propuesto que la muerte de neuronas del estriado provocada por DCG-IV está mediada por excitotoxicidad (Venero y col., 2002), ya que este agonista de los receptores metabotrópicos de Glu es capaz de activar los receptores ionotrópicos tipo NMDA de Glu cuando alcanza concentraciones mayores de 3 μM (Hayashi y col., 1993; Wilsch y col., 1994; Conn y Pin, 1997; Uyama y col., 1997).

Ya que la inyección estriatal de QA (agonista de los receptores ionotrópicos de Glu tipo NMDA) había resultado ser mejor herramienta que la inyección de KA para estudiar la regulación de la expresión de ARNm de BDNF en la corteza y los GB tras la lesión excitotóxica del estriado, decidimos probar si DCG-IV podría ser una herramienta adecuada para el estudio de la expresión de BDNF en los GB. Con sólo una inyección de 20 nmoles de DCG-IV en el estriado la magnitud de la sobreexpresión de BDNF detectada en corteza, SNPC y NST fue similar, o incluso mayor, que la observada tras la inyección de 120 nmoles de QA.

Asimismo, es destacable el hecho de que el aumento de expresión de BDNF y el aumento de actividad neuronal estuvieron restringidos al lado ipsilateral en todos los tiempos post-lesión y estructuras estudiados. Por tanto, DCG-IV ha demostrado ser una valiosa herramienta para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de factores de crecimiento en los ganglios basales y áreas relacionadas en condiciones de degeneración del estriado.

7. Expresión de BDNF en el estriado tras la lesión excitotóxica

La lesión excitotóxica del estriado provoca un aumento de la expresión de ARNm de BDNF en células presentes en esta estructura. Nuestro resultado concuerda con estudios previos de Canals y col. (1998) donde los autores describían que la inyección en el estriado de KA aumentaba la expresión de ARNm de BDNF, aunque ellos no detectaban aumento de la expresión de esta neurotrofina cuando el tóxico inyectado era QA.

Aunque no hemos realizado ensayos de colocalización para determinar el fenotipo de estas células que expresan ARNm de BDNF, y considerando que numerosos estudios han descartado la expresión de esta neurotrofina en los cuerpos neuronales del estriado en condiciones normales (Hofer y col., 1990; Maisonpierre y col., 1990; Wetmore y col., 1990; Ceccatelli y col., 1991; Castrén y col., 1995; Schmidt-Kastner y col., 1996; Altar y col., 1997; Conner y col., 1997), es razonable asumir el origen glial de este mensajero.

La inyección en el estriado de KA o QA provoca astrogliosis (Alexi y col., 2000), por tanto, el ARNm de BDNF que detectamos en estas condiciones podría estar expresado por la astroglia del estriado. De hecho, en trabajos muy recientes se ha demostrado la expresión de BDNF en la astroglia bajo diferentes estímulos tanto *in vitro* (Toyomoto y col., 2004; Wu y col., 2004) como *in vivo* (Koyama y col., 2003) aunque los primeros estudios sobre este tema establecieron que los astrocitos no expresaban ARNm de BDNF (Rudge y col., 1992; Condorelli y col., 1994).

Venero y col. (2002) demostraron que la inyección de DCG-IV en el estriado aumentaba la expresión de ARNm de BDNF en esta estructura. Sin embargo, cuando los autores llevaron a cabo estudios de colocalización observaron que este BDNF era expresado por la microglía pero no por la astroglia del estriado. De hecho, en 1996, Elkabes y col. observaron que la microglía de roedores expresaba ARNm de BDNF *in vitro* y estudios posteriores han demostrado que la expresión y la secreción de neurotrofinas en células microgliales puede ser regulada en el SNC por diferentes tipos de daño (Miwa y col., 1997; Elkabes y col., 1998). Concretamente en el estriado, varios estudios han demostrado la expresión a largo plazo de BDNF en células de

microglía tras diversos tipos de lesión (Batchelor y col., 1999; Matarredona y col., 2001; Batchelor y col., 2002; Venero y col., 2002). Por tanto, parece ser que la expresión de ARNm de BDNF que observamos en el estriado podría estar involucrada en procesos de reparación y regeneración de terminales sinápticas tras la lesión y es de origen microglial.

8. Expresión de ARNm de *trkB* en los GB tras la lesión excitotóxica del estriado

En este estudio hemos descrito como tras la lesión excitotóxica del estriado se observa la pérdida de transcritos de *trkB* en esta estructura. El patrón de pérdida de señal de hibridación de ARNm de *trkB* fue similar al patrón de pérdida de ARNm de GAD, de acuerdo con un posible papel post-sináptico de BDNF en el estriado. Por ejemplo, el BDNF anterógradamente transportado aumenta la tasa de supervivencia de las neuronas post-sinápticas (von Bartheld y col., 1996; Caleo y col., 2000; Fawcett y col., 2000). Hemos usado una sonda que reconoce todos los transcritos de *trkB*, tanto los que dan lugar a las formas catalíticas como los que codifican las truncadas (Klein y col., 1989).

Esta pérdida precoz de la expresión de *trkB* podría limitar el posible papel reparador de BDNF en el estriado lesionado. Además, la pérdida de neuronas diana no produjo ningún cambio en la expresión de ARNm de *trkB* ni en las neuronas de la corteza ni en la SN, lo que refuerza la idea de que el aumento de la expresión de BDNF en la corteza y la SN tras la lesión del estriado tendría como fin el transporte anterógrado de esta neurotrofina al estriado como respuesta a la lesión.

9. Aumento de la expresión de BDNF y de la actividad neuronal en el NST

En los últimos años, un gran número de trabajos han puesto de manifiesto la importancia del NST dentro del conjunto de los ganglios basales, de hecho, varios autores han propuesto al NST como un núcleo de entrada de información a los GB, como lo es el estriado (Nambu y col., 2000). Nuestro estudio también demostró que tras la lesión excitotóxica del estriado se produce un aumento significativo de la actividad neuronal en el NST, puesto de manifiesto por el aumento de la expresión de ARNm de cFos. El aumento de expresión de cFos fue ipsilateral en todos los casos, excepto a las 12 h tras la inyección de KA en el estriado, donde esta sobreexpresión fue claramente bilateral, aunque los valores de mensajero de cFos eran menores en el lado contralateral que en el ipsilateral. Este aumento de actividad neuronal iba acompañado de un enorme aumento en la expresión de ARNm de BDNF, siendo el patrón de aumento de la expresión de BDNF muy similar al de cFos.

BDNF ha demostrado promover la supervivencia y el crecimiento de axones y dendritas de neuronas GABAérgicas del mesencéfalo ventral *in vitro*, y administrado de forma exógena previene la muerte de neuronas de la SNPR que se produce en un modelo de lesión excitotóxica mediante la inyección de ácido iboténico en el estriado y el globo pálido (Volpe y col., 1998). Consecuentemente, el aumento de la expresión de BDNF que se detecta en el NST tras la lesión excitotóxica del estriado podría estar relacionado con un posible papel neuroprotector de BDNF sobre la población neuronal de la SNPR. Por tanto, la lesión del estriado aumentaría la expresión de BDNF en el NST, desde donde sería transportado anterògradamente a la SNPR. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que la proteína de BDNF ha sido detectada en las fibras del NST, pero no en los cuerpos neuronales de esta estructura (Murer y col., 1999a).

Sin embargo, la lesión excitotóxica de la SNPR con NMDA, como hemos descrito en los resultados de esta tesis, no aumenta la expresión de ARNm de BDNF en el NST, por tanto, la sobreexpresión de BDNF tras la lesión excitotóxica del estriado debe ser debida a una posible acción trófica de BDNF mediante mecanismos autocrinos/paracrinos sobre las mismas neuronas del

NST, o bien, mediante transporte retrógrado sobre las neuronas de la corteza, que podría resultar dañadas por la pérdida de sus dianas en el estriado.

Los modelos “clásicos” de circuitos de los GB (Albin y col., 1989; Alexander y Crutcher, 1990; DeLong, 1990) predicen la inhibición del NST cuando se dañan las neuronas del estriado que proyectan al segmento externo del GP. Sorprendentemente, nuestros experimentos demostraron un aumento de la actividad neuronal del NST tras la lesión del estriado. Más aún, el patrón de expresión tanto de ARNm de cFos como de BDNF en el NST en respuesta a la lesión excitotóxica era muy similar al observado en la corteza.

En la rata, el NST recibe una aferencia excitatoria desde la corteza (Bevan y col., 1995; Levy y col., 1997; Herdenson y Dunnett, 1998; Orioux y col., 2002), fundamentalmente desde la corteza motora pero también contribuyen a esta aferencia la corteza prefrontal y premotora (Smith y col., 1998). En el trabajo de Orioux y col. (2002) en ratas, los autores observaron mediante el uso de un trazador retrógrado inyectado en NST neuronas marcadas en distintas zonas de la corteza, no sólo en las áreas cingular y motora, confirmando estudios previos, sino también en la corteza insular dorsal y en la frontal asociativa.

Esta conexión corticosubtalámica de tipo glutamatérgico (Bevan y col., 1995) podría explicar las inducciones en la expresión de cFos y BDNF que encontramos en el NST, ya que la activación de la corteza provocaría la activación del NST. De hecho, se ha sugerido que la hiperactividad del NST que se detecta en la enfermedad de Parkinson es causada, o por un aumento de la actividad de la vía corticosubtalámica o por pérdida de la DA que llega a este núcleo desde la SNPC, pero en ningún caso por una disminución de la actividad inhibitoria del segmento externo del GP (Levy y col., 1997). Todo este conjunto de datos fuertemente sugiere que la expresión de BDNF detectada en el NST tras la inyección en el estriado de KA, QA o DCG-IV estaría regulada por un aumento de la actividad neuronal.

10. La pérdida de tejido diana no siempre aumenta la expresión de BDNF: lesión excitotóxica de la SNPR

Nuestro trabajo ha demostrado como la lesión excitotóxica del estriado con cualquiera de las excitotoxinas usadas, KA, QA o DCG-IV, aumenta la expresión de BDNF en las dos principales aferencias del estriado, la corteza y la SNPC. Ya que la población GABAérgica del mesencéfalo ventral ha demostrado responder a la administración de BDNF (Hyman y col., 1994; Volpe y col., 1998), decidimos investigar que ocurría cuando la estructura lesionada era la SNPR. Como hemos señalado en el apartado anterior de la discusión, la pérdida de sus neuronas diana en la SNPR no aumentó la expresión de BDNF en el NST, ni tampoco en el estriado.

En el caso del estriado, este resultado es completamente razonable ya que numerosos estudios han establecido que no hay expresión del gen de BDNF en las neuronas de esta estructura (Castrén y col., 1995; Schmidt-Kastner y col., 1996; Conner y col., 1997) y que la proteína de BDNF que allí se encuentra procede de la corteza o de la SNPC (Altar y col., 1997; Conner y col., 1997).

Sin embargo, teniendo en cuenta que la lesión del estriado si aumentaba la expresión de BDNF en el NST, y que esta expresión parecía ser debida a un posible papel trófico de BDNF sobre la SNPR, es relativamente sorprendente que la lesión excitotóxica de la SNPR no aumente la expresión de BDNF en el NST. Sin embargo, como hemos comentado antes, este resultado puede ser debido a que el aumento en los niveles de BDNF en el NST tras la lesión excitotóxica del estriado sea debido a una posible acción trófica de esta neurotrofina sobre las mismas neuronas del NST o sobre las neuronas de la corteza mediante transporte retrógrado. De hecho, en cerebros de enfermos de Huntington se ha observado en exámenes anatómicos post-mortem degeneración tanto de la corteza como del NST (Vonsattel y DiFiglia, 1998).

Este resultado también sugiere que el estriado es capaz de regular la expresión de BDNF de forma exquisita. Apoya esta hipótesis el hecho de que la estructura más severamente afectada en el SNC en los ratones genéticamente modificados para no expresar BDNF sea el estriado (Jones y col., 1994; Altar y

col., 1997; Ivkovic y Ehrlich, 1999). Así, igual que NGF ha demostrado ser la neurotrofina más eficaz en prevenir la degeneración de las neuronas del cerebro anterior cuya muerte está relacionada con la enfermedad de Alzheimer (Murer y col., 2001), BDNF sería la neurotrofina con un papel trófico más destacado sobre las neuronas del estriado. De hecho, se ha demostrado que la transcripción del gen de BDNF en la corteza está regulada por la huntingtina (Zuccato y col., 2001), que es la proteína que resulta mutada en la enfermedad de Huntington.

La lesión excitotóxica de la SNPR aumenta la actividad neuronal tanto en el estriado, fundamentalmente en la parte dorsal, como en el NST y en la misma SNPR. Este aumento de actividad neuronal puede explicarse por la sobreexcitación de los receptores ionotrópicos de Glu que se produce cuando se inyecta una elevada dosis de su agonista NMDA.

11. Posible aplicación clínica

En esta tesis hemos usado diferentes modelos de la enfermedad de Huntington para estudiar la regulación de BDNF en el conjunto de los ganglios basales, un grupo de núcleos subcorticales cuya degeneración se asocia a enfermedades en las que se pierde el control del movimiento, como la misma enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson. BDNF es un miembro de la familia de las neurotrofinas que ha demostrado tener importantes acciones beneficiosas, tanto a nivel de aumento de supervivencia, como de diferenciación y plasticidad sináptica sobre las poblaciones neuronales cuya muerte está relacionada con las enfermedades neurodegenerativas anteriormente nombradas.

La EH se caracteriza por degeneración de las neuronas de proyección espinosas de tamaño medio del estriado, pero a medida que la enfermedad progresa se produce la muerte del resto de neuronas del estriado, e incluso, de neuronas de la corteza y del NST (Vonsattel y DiFligia, 1998). BDNF ha demostrado ser de capital importancia para la supervivencia a largo plazo de las neuronas de proyección del estriado, y su falta hace que disminuya la

conectividad sináptica entre la corteza y el estriado (Baquet y col., 2004), que es la principal vía de entrada de información al bucle subcortical de los GB.

La huntingtina, proteína cuya mutación ha demostrado ser responsable de la EH (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), promueve la transcripción de BDNF en la corteza (Zuccato y col., 2001), y de hecho la cantidad de proteína de BDNF está disminuída en enfermos de Huntington tanto en corteza como estriado (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001). Htt no sólo es capaz de regular la transcripción de BDNF sino que también estimula el transporte en vesículas de esta neurotrofina a lo largo de los axones (Gauthier y col., 2004).

En un trabajo muy reciente, Ryu y col. (2004) han logrado proteger las neuronas del estriado en un modelo animal de la EH (administración sistémica de 3-NP) mediante el trasplante de células madres de neuronas. Teniendo en cuenta que pocas de las células madres transplantadas habían dado lugar a neuronas y que BDNF es abundantemente expresado y sintetizado en estas células madres, los autores proponen que el mecanismo por el cual este tipo de trasplante es neuroprotector es por la secreción de BDNF. Este mismo mecanismo de protección ha sido propuesto por McBride y col. (2004). Este grupo ha logrado mejorar la sintomatología motora de ratas tras la lesión excitotóxica del estriado con QA mediante el trasplante de células madres humanas. En este caso, los autores tampoco observaron que las células transplantadas se hubieran diferenciada dentro del tejido huésped.

Todo este conjunto de trabajos ha servido para establecer las importantes acciones de BDNF sobre las neuronas de proyección estriatales. BDNF le llega al estriado transportado anterógradamente desde la corteza y la SN, de ahí la importancia de estudiar la regulación de la expresión de esta neurotrofina en el conjunto de los GB cuando se produce una lesión en esta estructura, que ha sido el principal objetivo de esta tesis. En concreto, entre otros resultados, hemos puesto de manifiesto el enorme aumento de la expresión de BDNF que se detecta en la SNPC como respuesta a la lesión excitotóxica del estriado, con un posible papel trófico de este BDNF expresado en SN sobre sus neuronas diana dañadas.

Asimismo, en este trabajo hemos observado que en condiciones de degeneración estriatal la expresión de BDNF en la corteza está regulada por un aumento de actividad neuronal. Por tanto, la estimulación de la corteza podría servir para aumentar la biodisponibilidad de BDNF en el estriado de enfermos de Huntington. En este sentido, se ha comprobado que la estimulación magnética aumenta los niveles de BDNF en la corteza cerebral y en el plasma (Muller y col., 2000; Angelucci y col., 2004).

Por tanto, la administración tanto de BDNF como de terapias que aumenten su expresión podría resultar un tratamiento eficaz en la enfermedad de Huntington. De hecho, una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para "rescatar" neuronas de la degeneración ha sido el tratamiento con factores neurotróficos (Alexi y col., 2000).

CONCLUSIONES

1. La lesión excitotóxica del estriado con KA, QA o DCG-IV aumenta la expresión de ARNm de BDNF en la SNPC, siendo el aumento de expresión de BDNF estrictamente dependiente de la pérdida de neuronas diana en el estriado y completamente independiente de un aumento de la actividad neuronal.
2. La sobreexpresión de ARNm de BDNF detectada en corteza está regulada por la pérdida de sus neuronas diana en el estriado y es dependiente del aumento de actividad neuronal que se produce tras la lesión del estriado con KA, QA o DCG-IV.
3. El bloqueo del transporte axoplásmico entre la SN y el estriado aumenta la expresión de mensajero de BDNF tanto en la SNPR como en las capas II/III de la corteza y en la corteza insular y piriforme, por tanto, la pérdida de comunicación entre el estriado y su tejido inervante aumenta la expresión de BDNF en éste. Este resultado confirma que la pérdida del tejido diana es capaz de regular la expresión de BDNF en las estructuras que envían aferencias al estriado.
4. DCG-IV, un agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato, es una herramienta adecuada para el estudio de la regulación de BDNF en el conjunto de los ganglios basales.
5. La lesión excitotóxica del estriado con KA, QA o DCG-IV, o el bloqueo del transporte axoplásmico entre la SN y el estriado, aumenta la expresión de ARNm de BDNF en el NST. Este aumento de BDNF va acompañado de un aumento de la actividad neuronal.
6. La lesión excitotóxica de la SNPR con NMDA no aumenta la expresión de mensajero de BDNF en el NST, por tanto, el estriado regula la expresión de BDNF en su tejido inervante de una forma diferente a como lo hace la SNPR.

BIBLIOGRAFÍA

Abiru Y., Nishio C., Hatanaka H. (1996) The survival of striatal cholinergic neurons cultured from postnatal 2-week-old rats is promoted by neurotrophins. *Dev. Brain Res.* 91: 260–267.

Adlard P.A., Cotman C.W. (2004) Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience* 124: 985-992.

Ahn Y.H., Kim Y.H., Hong S.H., Koh J.Y. (1998) Depletion of intracellular zinc induces protein synthesis-dependent neuronal apoptosis in mouse cortical culture. *Exp. Neurol.* 154: 47-56.

Akaneya Y., Takahashi M., Hatanaka H. (1995) Selective acid vulnerability of dopaminergic neurons and its recovery by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 704: 175-183.

Akaneya Y., Tsumoto T., Hatanaka H. (1996) Brain-derived neurotrophic factor blocks long-term depression in rat visual cortex. *J. Neurophysiol.* 76: 4198-4201.

Akaneya Y., Tsumoto T., Kinoshita S., Hatanaka H. (1997) Brain-derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex. *J. Neurosci.* 17: 6707-6716.

Albin R.L., Young A.B., Penney J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12: 366-375.

Albin R.L., Young A.B., Penney J.B., Handelin B., Balfour R., Anderson K.D., Markel D.S., Tourtellotte W.W., Reiner A. (1990a) Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *N. Engl. J. Med.* 322: 1293-1298.

Albin R.L., Reiner A., Anderson K.D., Penney J.B., Young A.B. (1990b) Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia. *Ann. Neurol.* 27: 357-365.

Alderson R.F., Alterman A.L., Barde Y.-A., Lindsay R.M. (1990) Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5: 297-306.

Alexander G.E., Crutcher M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13: 266-271.

Alexi T., Hefti F. (1996) Neurotrophin-4/5 selectively protects nigral calbindin-containing neurons in rats with medial forebrain bundle transections. *Neuroscience* 72: 911-921.

Alexi T., Hughes P.E., Faull R.L.M., Williams C.E. (1998) 3-nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport* 9: R57-R64.

Alexi T., Borlongan C.V., Faull R.L., Williams C.E., Clark R.G., Gluckman P.D., Hughes P.E. (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol.* 60: 409-470.

Aliaga E., Rage F., Tapia-Arancibia L., Bustos G. (1999) Negative regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA expression by kainic acid in substantia nigra. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71: 341-344.

Aliaga E., Carcamo C., Abarca J., Tapia-Arancibia L., Bustos G. (2000) Transient increase of brain derived neurotrophic factor mRNA expression in substantia nigra reticulata after partial lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 79: 150-155.

Allendoerfer K.L., Cabelli R.J., Escandón E., Kaplan D.R., Nikolics K., Shatz C.J. (1994) Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. *J. Neurosci.* 14: 1795–1811.

Altar C.A., Boylan C.B., Fritsche M., Jones B.E., Jackson C., Wiegand S.J., Lindsay R.M., Hyman C. (1994a) Efficacy of brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions. *J. Neurochem.* 63: 1021-1032.

Altar C.A., Siuciak J.A., Wright P., Ip N.Y., Lindsay R.M., Wiegand S.J. (1994b) In situ hybridization of trkB and trkC receptor mRNA in rat forebrain and association with high-affinity binding of [125I]BDNF, [125I]NT-4/5 and [125I]NT-3. *Eur. J. Neurosci.* 6: 1389-1405.

Altar C.A., Boylan C.B., Fritsche M., Hyman C., Jackson C., Lindsay R.M. (1994c) The neurotrophins-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviourally effective infusions to the substantia nigra. *Exp. Neurol.* 30: 31-40.

Altar C.A., Cai N., Bliven T., Juhasz M., Conner J.M., Acheson A.L., Lindsay R.M., Wiegand S.J. (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389: 856-860.

Altar C.A., DiStefano P.S. (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci.* 21: 433-437.

Altar C.A. (1999) Neurotrophins and depression. *Trends. Pharmacol. Sci.* 20: 59–61.

Anderson K.D., Alderson R.F., Altar C.A., DiStefano P.S., Corcoran T.L., Lindsay R.M., Wiegand S.J. (1995) Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors. *J. Comp. Neurol.* 357: 296-317.

Angelucci F., Oliviero A., Pilato F., Saturno E., Dileone M., Versace V., Musumeci G., Batocchi A.P., Tonali P.A., Di Lazzaro V. (2004) Transcranial magnetic stimulation and BDNF plasma levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 15: 717-720.

Armanini M.P., McMahon S.B., Sutherland J., Shelton D.L., Philips H.S. (1995) Truncated and catalytic isoforms of TrkB are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1403–1409.

Ballarin M., Ernfors P., Lindefors N., Persson H. (1991) Hippocampal damage and kainic acid injection induce a rapid increase in mRNA for BDNF and NGF in the rat brain. *Exp. Neurol.* 114: 35-43.

Baloh R.H., Tansey M.G., Lampe P.A., Fahrner T.J., Enomoto H., Simburger K.S., Leitner M.L., Araki T., Johnson Jr. E.M., Midbrandt J. (1998) Artemin, a novel member of the GDNF-ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GRFalpha-3-RET receptor complex. *Neuron* 21: 1291-1302.

Bamji S.X., Majdan M., Pozniak C.D., Belliveau D.J., Aloyz R., Kohn J., Causing C.G., Miller F.D. (1998) The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J. Cell. Biol.* 140: 911–923.

Baquet Z.C., Gorski J.A., Jones K.R. (2004) Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 24: 4250–4258.

Barbacid M. (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25: 1386–1403.

Barbacid M. (1995) Structural and functional properties of the Trk family of neurotrophin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766: 442–458.

Barde Y.-A., Edgar D., Thoenen H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1: 549–553.

Batchelor P.E., Liberatore G.T., Wong J.Y., Porritt M.J., Frerichs F., Donnan G.A., Howells D.W. (1999) Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 19: 1708–1716.

Batchelor P.E., Porritt M.J., Martinello P., Parish C.L., Liberatore G.T., Donnan G.A., Howells D.W. (2002) Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol. Cell. Neurosci.* 21: 436–453.

Beal M.F., Kowall N.W., Ellison D.W., Mazurek M.F., Swartz K.J., Martin J.B. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168–171.

Beck K.D., Knüsel B., Winslow J.W., Rosenthal A., Burton L.E., Nikolics K., Hefti F. (1992) Pretreatment of dopaminergic neurons in culture with brain-derived neurotrophic factor attenuates toxicity of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium. *Neurodegeneration* 1: 27–36.

Beck K.D., Knüsel B., Hefti F. (1993) The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 52: 855–866.

Beck K.D., Valverde J., Alexi T., Poulsen K., Moffat B., Vandlen R.A., Rosenthal A., Hefti F. (1995) GDNF protects mesencephalic dopaminergic neurons from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373: 339–341.

Beckman J.S., Ye Y.Z., Anderson P.G., Chen J., Accavitti M.A., Tarpey M.M., White C. R. (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375: 81–88.

Beckstead R.M., Domesick V.B., Nauta W.J.H. (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* 175: 191–217.

Bemelmans A.P., Horellou P., Pradier L., Brunet I., Colin P., Mallet J. (1999) Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 10: 2987-2997.

Bennett B.D., Bolam J.P. (1993) Two populations of calbindin D_{28k}-immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Brain Res.* 610: 305-310.

Berchtold N.C., Oliff H.S., Isackson P., Cotman C.W. (1999) Hippocampal BDNF mRNA shows a diurnal regulation, primarily in the exon III transcript. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71: 11-22.

Berchtold N.C., Kesslak J.P., Pike C.J., Adlard P.A., Cotman C.W. (2001) Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1992-2002.

Bergman H., Feingold A., Nini A., Raz A., Slovin H., Abeles M., Vaadia E. (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci.* 21: 32-38.

Berninger B., Poo M.M. (1996) Fast actions of neurotrophic factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 324-330.

Bevan M.D., Francis C.M., Bolam J.P. (1995) The glutamate-enriched cortical and thalamic input to neurons in the subthalamic nucleus of the rat: convergence with GABA-positive terminals. *J. Comp. Neurol.* 361: 491-511.

Blesch A., Grill R.J., Tuszynski M.H. (1998) Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration. *Progress in Brain Research*, 117: 473-484.

Bliss T.V., Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.

Bloch I., Thoenen H. (1995) Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1220-1228.

Bloch I., Thoenen H. (1996) Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 173-190.

Bonhoeffer T. (1996) Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 119-126.

Bothwell M. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 223-253.

Boulter J., Bettler B., Dingledine R., Edgebjerg J., Hartley M., Hermans-Borgmeyer I., Hollmann M., Hume R.I., Rogers S., Heinemann S. (1992) Molecular biology of the glutamate receptors. *Clin. Neuropharmacol.* 15 Suppl 1 Pt A:60A-61A.

Bova R., Micheli M.R., Qualadrucci P., Zucconi G.G. (1998) BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light-dark cycle. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57: 321-324.

Bozzi Y., Pizzorusso T., Cremisi F., Rossi F.M., Barsacchi G., Maffei L. (1995) Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex. *Neuroscience* 69: 1133-1144.

Bredt D.S., Snyder S.H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9030-9033.

Bruno V., Battaglia G., Copani A., D'Onofrio M., Di Iorio P., De Blasi A., Melchiorri D., Flor P.J., Nicoletti F. (2001) Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9: 1013-1033.

Burke M.A., Mobley W.C., Cho J., Wiegand S.J., Lindsay R.M., Mufson E.J., Kordower J.H. (1994) Loss of developing cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic lesions of the hippocampus: rescue by neurotrophins. *Exp. Neurol.* 130: 178-195.

Caleo M., Menna E., Chierzi S., Cenni M.C., Maffei L. (2000) Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. *Curr. Biol.* 10: 1155-1161.

Canals J.M., Marco S., Checa N., Michels A., Perez-Navarro E., Arenas E., Alberch J. (1998) Differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 after excitotoxicity in a rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 5: 357-364.

Canals J.M., Checa N., Marco S., Akerud P., Michels A., Perez-Navarro E., Tolosa E., Arenas E., Alberch J. (2001) Expression of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons is regulated by striatal target area. *J. Neurosci.* 21: 117-124.

Carter B.D., Lewin G.R. (1997) Neurotrophins live or let die: does p75^{NTR} decide?. *Neuron* 18: 187-190.

Castilho R.F., Hansson O., Ward M.W., Budd S.L., Nicholls D.G. (1998) Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 18: 10277-10286.

Castrén E., Zafra F., Thoenen H., Lindholm D. (1992) Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9444-9448.

Castrén E., Pitkanen M., Sirvio J., Parsadanian A., Lindholm D., Thoenen H., Riekkinen P.J. (1993) The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. *Neuroreport* 4: 895-898.

Castrén E., Thoenen H., Lindholm D. (1995) Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Neuroscience* 64: 71-80.

Castrén E., Berninger B., Leingartner A., Lindholm D. (1998) Regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in hippocampus by neuronal activity. *Prog. Brain Res.* 117: 57-64.

Catapano L.A., Arnold M.W., Perez F.A., Macklis J.D. (2001) Specific neurotrophic factors support the survival of cortical projection neurons at distinct stages of development. *J. Neurosci.* 21: 8863-8872.

Ceccatelli S., Ernfors P., Villar M., Persson H., Hokfelt T. (1991) Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat brain after colchicine treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10352–10356.

Celio M.R. (1990) Calbindin D_{28k} and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35: 375–475.

Chao M.V. (1994) The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 25: 1373–1385.

Chao M.V., Hempstead B.L. (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18: 321–326.

Chao H.M., Sakai R.R., Ma L.Y., McEwen B.S. (1998) Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology* 139: 3112–3118.

Cheng B., Mattson M.P. (1994) NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res.* 640: 56-67.

Chesselet M.F., Delfs J.M. (1996) Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci.* 19: 417–422.

Choi D. W., Rothman S. M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* 13: 171–182.

Choi D. W. (1992) Bench to bedside: the glutamate connection. *Science* 258: 241–243.

Cirelli C., Tononi G. (2000) Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J. Neurosci.* 20: 9187-9194.

Cohen G., Heikkila R.E. (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.* 249: 2447–2452.

Condorelli D.F., Dell'Albani P., Mudo G., Timmusk T., Belluardo N. (1994) Expression of neurotrophins and their receptors in primary astroglial cultures: induction by cyclic AMP-elevating agents. *J. Neurochem.* 63: 509-516.

Conn P.J., Pin J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 205-237.

Conner J.M., Varon S. (1996) Maintenance of sympathetic innervation into the hippocampal formation requires a continuous local availability of nerve growth factor. *Neuroscience* 72: 933-945.

Conner J.M., Lauterborn J.C., Yan Q., Gall C.M., Varon S. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.* 17: 2295-2313.

Connor B., Young D., Yan Q., Faull R.L.M., Synek B., Dragunow M. (1997) Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Mol. Brain Res.* 49: 71-81.

Connor B., Dragunow M. (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 27: 1-39.

Cooper J.D., Skepper J.N., Da Penha Berzaghi M., Lindholm D., Sofroniew M.V. (1996) Delayed death of septal cholinergic neurons after excitotoxic ablation of hippocampal neurons during early postnatal development in the rat. *Exp. Neurol.* 139: 143-155.

Coyle J.T., Schwarcz R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263: 244-246.

Cudkovicz M., Kowall N.W. (1990) Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Ann. Neurol.* 27: 200-204.

Dechant G., Rodriguez-Tébar A., Barde Y.-A. (1994) Neurotrophin receptors. *Prog. Neurobiol.* 42: 347-352.

Dechant G., Barde Y.-A. (1997) Signalling through the neurotrophin receptor p75^{NTR}. *Curr. Op. Neurobiol.* 7: 413-418.

DeLong M.R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13: 281-285.

Deutch A.Y., Goldstein M., Roth R.H. (1986) The ascending projections of the dopaminergic neurons of the substantia nigra, zona reticulata: a combined retrograde tracer-immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 71: 257-263.

DiFiglia M., Christakos S., Aronin N. (1989) Ultrastructural localization of immunoreactive Calbindin D_{28k} in the rat and monkey basal ganglia, including subcellular distribution with colloidal gold labeling. *J. Comp. Neurol.* 279: 653-665.

DiStefano P.S., Friedman B., Radziejewski C., Alexander C., Boland P., Schickm C.M., Lindsay R.M., Wiegand S.J. (1992) The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8: 983-993.

Dragunow M., Beilharz E., Mason B., Lawlor P., Abraham W., Gluckman P. (1993) Brain-derived neurotrophic factor expression after long-term potentiation. *Neurosci Lett.* 160: 232-236.

Drake C.T., Milner T.A., Patterson S.L. (1999) Ultrastructural localization of full-length TrkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 19: 8009-8026.

Dugich-Djordjevic M.M., Tocco G., Willoughby D.A., Najm I., Pasinetti G., Thompson R.F., Baudry M., Lapchak P., Hefti F. (1992) BDNF mRNA expression in the developing rata brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neuron* 8: 1127-1138.

Ebadi M., Bashir R.M., Heidrick M.L., Hamada F.M., Refaey H.E., Hamed A., Helal G., Baxi M.D., Cerutis D.R., Lassi N.K. (1997) Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int.* 30: 347-374.

Elkabes S., DiCicco-Bloom E.M., Black I.B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* 16: 2508–2521.

Elkabes S., Peng L., Black I.B. (1998) Lipopolisacchiride differentially regulates microglial Trk receptor and neurotrophin expression. *J. Neurosci. Res.* 54: 117–122.

Engle J. (1998) Changing responsiveness of developing midbrain dopaminergic neurons for extracelular growth factors. *J. Neurosci. Res.* 51: 508–516.

Ernfors P., Ibáñez C.F., Ebendal T., Olson L., Persson H. (1990a) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5454-5458.

Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Persson H. (1990b) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5: 511-526.

Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Persson H., Lindvall O. (1991) Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7:165-176.

Escandón E., Soppet D., Rosenthal A., Mendoza-Ramirez J.L., Szönyi E., Burton L.E., Henderson C.E., Parada L.F., Nikolics K. (1994) Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* 14: 2054–2068.

Fadda E., Negro A., Facci L., Skaper S.D. (1993) Ganglioside GM1 cooperates with brain-derived neurotrophic factor to protect dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-induced degeneration. *Neurosci. Lett.* 159: 147–150.

Fallon J.H. (1981) Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum and frontal cortex. *J. Neurosci.* 1: 1361–1368.

Fallon J.H., Hicks R., Loughlin S.E. (1983) The origin of cholecystokinin terminals in the basal forebrain of the rat: evidence from immunofluorescence and retrograde tracing. *Neurosci. Lett.* 37: 29–35.

Fallon J.H., Seroogy K.B. (1985) The distribution and some connections of cholecystokinin neurons in the rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 448: 121–132.

Faull R.L.M., Mehler W.R. (1978) The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic, and nigrostriatal projections in the rat. *Neuroscience* 3: 989–1002.

Fawcett J.P., Aloyz R., McLean J.H., Pareek S., Miller F.D., McPherson P.S., Murphy R.A. (1997) Detection of brain-derived neurotrophic factor in a vesicular fraction of brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 272: 8837-8840.

Fawcett J.P., Alonso-Vanegas M.A., Morris S.J., Miller F.D., Sadikot A.F., Murphy R.A. (2000) Evidence that brain-derived neurotrophic factor from presynaptic nerve terminals regulates the phenotype of calbindin-containing neurons in the lateral septum. *J. Neurosci.* 20: 274-282.

Feng L., Wang C.Y., Jiang H., Oho C., Mizuno K., Dugich-Djordjevic M., Lu B. (1999) Differential effects of GDNF and BDNF on cultured ventral mesencephalic neurons. *Mol. Brain Res.* 66: 62-70.

Ferrante R.J., Kowall N.W., Beal M.F., Martin J.B., Bird E.D., Richardson E.P. Jr. (1987a) Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46: 12-27.

Ferrante R.J., Beal M.F., Kowall N.W., Richardson E.P. Jr., Martin J.B. (1987b) Sparring of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Res.* 411: 162-6.

Ferrante R.J., Kowall N.W., Cipolloni P.B., Storey E., Beal M.F. (1993) Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp. Neurol.* 119: 46-71.

Ferrer I., Marin C., Rey M.J., Ribalta T., Goutan E., Blanco R., Tolosa E., Mart E. (1999) BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer's disease. Implications in therapeutic strategies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 729-739.

Ferrer I., Goutan E., Marin C., Rey M.J., Ribalta T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res.* 866: 257-261.

Figueredo-Cardenas G., Harris C.L., Anderson K.D, Reiner A. (1998) Relative resistance of striatal neurons containing calbindin or parvalbumin to quinolinic acid-mediated excitotoxicity compared to other striatal neuron types. *Exp. Neurol.* 149: 356-372.

Finkbeiner S. (2000) Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 394-401.

Flaherty A.W., Graybiel A.M. (1993) Output architecture of the primate putamen. *J. Neurosci.* 13: 3222-3237.

Frade J.M., Barde Y.-A. (1999) Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126: 683-690.

French S.J., Humby T., Horner C.H., Sofroniew M.V., Rattray M. (1999) Hippocampal neurotrophin and Trk receptor mRNA levels are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpine. *Mol. Brain Res.* 67: 124-136.

Friedman W.J. (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J. Neurosci.* 20: 6340-6346.

Friedman W.J., Black I.B., Persson H., Ibáñez C.F. (1995) Synergistic trophic actions on rat basal forebrain neurons revealed by a synthetic NGF/BDNF chimaeric molecule. *Eur. J. Neurosci.* 7: 656–662.

Frim D.M., Uhler T.A., Galpern W.R., Beal M.F. (1994) Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5104-5108.

Furukawa S., Sugihara Y., Iwasaki F., Fukumitsu H., Nitta A., Nomoto H., Furukawa Y. (1998) Brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the adult rat nervous system predominantly distributed in neurons with substantial amounts of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA or responsiveness to brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 82: 653-670.

Fusco F.R., Zuccato C., Tartari M., Martorana A., De March Z., Giampa C., Cattaneo E., Bernardi G. (2003) Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 18: 1093-1102.

Gall C., Lauterborn J., Bundman M., Murray K., Isackson P. (1991) Seizures and the regulation of neurotrophic factor and neuropeptide gene expression in brain. *Epilepsy Res. Suppl.* 4: 225-245.

Gall C.M., Gold P.J., Isackson P.J., Seroogy K.B. (1992) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs are expressed in ventral midbrain regions containing dopaminergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 3: 56-63.

Galpern W.R., Frim D.M., Tatter S.B., Altar C.A., Beal M.F., Isacson O. (1996) Cell-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor enhances dopamine levels in an MPP+ rat model of substantia nigra degeneration. *Cell Transplant.* 5: 225-232.

Garthwaite J., Southam E., Anderson M. (1989) A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J. Neurochem.* 53: 1952–1954.

Gauthier L.R., Charrin B.C., Borrell-Pages M., Dompierre J.P., Rangone H., Cordelieres F.P., De Mey J., MacDonald M.E., Lessmann V., Humbert S., Saudou F. (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118: 127-138.

Gavaldà N., Perez-Navarro E., Gratacòs E., Comella J.X., Alberch J. (2004) Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and p42/p44 mitogen activated protein kinase pathways in brain-derived neurotrophic factor-induced trophic effects on cultured striatal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 25: 460-468.

Gerfen C.R., Baimbridge K.G., Miller J.J. (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8780–8784.

Gerfen C.R., Young W.S. 3rd. (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460: 161-167.

Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F.J. Jr., Sibley D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1432.

Gerfen C.R. (1992a) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15: 133–138.

Gerfen C.R. (1992b) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Ann. Rev. Neurosci.* 15: 285-320.

Ghosh A., Carnahan J., Greenberg M.E. (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263: 1618-1623.

Gibbs R.B. (1999) Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res.* 844: 20–27.

Giehl K.M., Schütte A., Mestres P., Yan Q. (1998) The survival promoting effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on axotomized corticospinal neurons in vivo is mediated by an endogenous brain-derived neurotrophic factor mechanism. *J. Neurosci.* 18: 7351-7360.

Giovanni A., Sieber B-A., Heikkila R.E., Sonsalla P.K. (1994) Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part I: systemic administration. *J. Pharmacol. Ther. Exp.* 270: 1000–1007.

Giulian D., Vaca K., Noonan C.A. (1990) Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* 250: 1593–1596.

Goodman L.J., Valverde J., Lim F., Geschwind M.D., Federoff H.J., Geller A.I., Hefti F. (1996) Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 222-238.

Gorba T., Klostermann O., Wahle P. (1999) Development of neuronal activity and activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in organotypic cultures of rat visual cortex. *Cereb. Cortex.* 9: 864-877.

Gorski J.A., Balogh S.A., Wehner J.M., Jones K.R. (2003a) Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neuroscience* 121: 341-354.

Gorski J.A., Zeiler S.R., Tamowski S., Jones K.R. (2003b) Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J. Neurosci.* 23: 6856-6865.

Gratacòs E., Perez-Navarro E., Tolosa E., Arenas E., Alberch J. (2001) Neuroprotection of striatal neurons against kainate excitotoxicity by neurotrophins and GDNF family members. *J. Neurochem.* 78: 1287-1296.

Graybiel A.M., Aosaki T., Flaherty A.W., Kimura M. (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265: 1826-1831.

Greene J.G., Greenamyre J.T. (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.* 48: 613–634.

Griesbach G.S., Hovda D.A., Molteni R., Wu A., Gomez-Pinilla F. (2004) Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience* 125: 129-139.

Grimes M.L., Zhou J., Beattie E.C., Yuen E.C., Hall D.E., Valletta J.S., Topp K.S., laVail J.H., Bunnett N.W., Mobley W.C. (1996) Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* 16: 7950-7964.

Grundy P.L., Patel N., Harbuz M.S., Lightman S.L., Sharples P.M. (2000) Glucocorticoids modulate BDNF mRNA expression in the rat hippocampus after traumatic brain injury. *Neuroreport* 11: 3381-3384.

Gustafsson E., Andsberg G., Darsalia V., Mohapel P., Mandel R.J., Kirik D., Lindvall O., Kokaia Z. (2003) Anterograde delivery of brain-derived neurotrophic factor to striatum via nigral transduction of recombinant adeno-associated virus increases neuronal death but promotes neurogenic response following stroke. *Eur. J. Neurosci.* 17: 2667-2678.

Ha D.H., Robertson R.T., Ribak C.E., Weiss J.H. (1996) Cultured basal forebrain cholinergic neurons in contact with cortical cells display synapses, enhanced morphological features, and decreased dependence on nerve growth factor. *J. Comp. Neurol.* 373: 451–465.

Ha D.H., Robertson R.T., Roshanaei M., Weiss J.H. (1999) Enhanced survival and morphological features of basal forebrain cholinergic neurons in vitro: role of neurotrophins and other potential cortically derived cholinergic trophic factors. *J. Comp. Neurol.* 406: 156–170.

Hagg T. (1998) Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo. *Exp. Neurol.* 149: 183–192.

Hall J., Thomas K.L., Everitt B.J. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature Neurosci.* 3: 533-535.

Hantraye P., Riche D., Maziere M., Isacson O. (1990) A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate–putamen in the baboon. *Exp. Neurol.* 108: 91–104.

Haque N.S.K., Borghesani P., Isacson O. (1997) Therapeutic strategies for Huntington's disease based on a molecular understanding of the disorder. *Molec. Med. Today* 3: 175–183.

Hashimoto Y., Abiru Y., Nishio C., Hatanaka H. (1999) Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal 2-week-old rats. *Dev. Brain Res.* 115: 25–32.

Haubensak W., Narz F., Heumann R., Lessmann V. (1998) BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *J. Cell. Sci.* 111: 1483-1493.

Hayashi Y., Momiyama A., Takahashi T., Ohishi H., Ogawa-Meguro R., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S. (1993) Role of a metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature* 366: 687-690.

Hefti F., Melamed E., Wurtman R.J. (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.* 195: 123-137.

Heikkila R.E., Hess A., Duvoisin R.C. (1984) Dopaminergic neurotoxicity of MPTP in mice. *Science* 224: 1451-1453.

Heikkila R.E., Nicklas W.J., Duvoisin R.C. (1985a) Dopaminergic toxicity after the stereotaxic administration of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) to rats. *Neurosci. Letts* 59: 135-140.

Heikkila R.E., Nicklas W.J., Vyas I., Duvoisin R.C. (1985b) Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci. Letts* 62: 389-394.

Henderson C.E. (1996) Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 64-70.

Henderson J.M., Dunnett S.B. (1998) Targeting the subthalamic nucleus in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res. Bull.* 46: 467-474.

Hetman M., Kanning K., Cavanaugh J.E., Xia Z. (1999) Neuroprotection by BDNF is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 22569-22580.

Hofer M., Pagliusi S.R., Hohn A., Leibrock J., Barde Y.-A. (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9: 2459-2464.

Hoglinger G.U., Sautter J., Meyer M., Spenger C., Seiler R.W., Oertel W.H., Widmer H.R. (1998) Rat fetal ventral mesencephalon grown as solid tissue cultures: influence of culture time and BDNF treatment on dopamine neuron survival and function. *Brain Res.* 813: 313-322.

Hollmann M., Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.

Hontanilla B., Parent A., Giménez-Amaya J.M. (1997) Parvalbumin and calbindin-D_{28k} in the entopeduncular nucleus, subthalamic nucleus, and substantia nigra of the rat as revealed by double-immunohistochemical methods. *Synapse* 25: 359-367.

Horch H.W., Kruttgen A., Portbury S.D., Katz L.C. (1999) Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron* 23: 353-364.

Huang E.J., Reichardt L.F. (2001) Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Ann. Rev. Neurosci.* 24: 677-736.

Huang Z.J., Kirkwood A., Pizzorusso T., Porciatti V., Morales B., Bear M.F., Maffei L., Tonegawa S. (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98: 739-755.

Huber K.M., Sawtell N.B., Bear M.F. (1998) Brain-derived neurotrophic factor alters the synaptic modification threshold in visual cortex. *Neuropharmacology* 37: 571-579.

Hughes P.E., Alexi T., Walton M., Williams C.E., Dragunow M., Clark R.G., Gluckman P.D. (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors, and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 57: 421-450.

Hung H.C., Lee E.H. (1996) The mesolimbic dopaminergic pathway is more resistant than the nigrostriatal dopaminergic pathway to MPTP and MPP+ toxicity: role of BDNF gene expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 41: 14-26.

Hyman C., Hofer M., Barde Y.-A., Juhasz M., Yancopoulos G.D., Squinto S.P., Lindsay R.M. (1991) BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350: 230-232.

Hyman C., Juhasz M., Jackson C., Wright P., Ip N.Y., Lindsay R.M. (1994) Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J. Neurosci.* 14: 335-347.

Ibáñez C.F. (1998) Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 21: 438-44.

Ip N.Y., Li Y., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M. (1993) Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT-3, and NT-4, but not NGF. *J. Neurosci.* 13: 3394-3405.

Isackson P.J., Huntsman M.M., Murray K.D., Gall C.M. (1991) BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron* 6: 937-948.

Isokawa M., Levesque M.F. (1991) Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slices. *Neurosci. Lett.* 132: 212-216.

Ivkovic S., Ehrlich M.E. (1999) Expression of the striatal DARPP-32/ARPP-21 phenotype in GABAergic neurons requires neurotrophins in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 19: 5409-5419.

Jiang B., Akaneya Y., Ohshima M., Ichisaka S., Hata Y., Tsumoto T. (2001) Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex in vivo in young rats, but not in the adult. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1219-1228.

- Jones K.R., Fariñas I., Backus C., Reichardt L.F. (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* 76: 989–999.
- Kaddis F.G., Zawada W.M., Schaack J., Freed C.R. (1996) Conditioned medium from aged monkey fibroblasts stably expressing GDNF and BDNF improves survival of embryonic dopamine neurons in vitro. *Cell Tissue Res.* 286: 241–247.
- Kaplan D.R., Stephens R.M. (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* 25: 1404-1417.
- Kappus H. (1990) Biochemical mechanisms of chemical-induced lipid peroxidation. In *Membrane Lipid Oxidation*, ed. C. Vigo-Pelfrey, 104–119. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Katoh-Semba R., Takeguchi I.K., Semba R., Kato K. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J. Neurochem* 69: 34-42.
- Katoh-Semba R., Semba R., Takeguchi I.K., Kato K. (1998). Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice, and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci. Res.* 31: 227-234.
- Katoh-Semba R., Takeuchi I.K., Inaguma Y., Ito H., Kato K. (1999) Brain-derived neurotrophic factor, nerve growth and neurotrophin-3 selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neurosci Res.* 35: 19-29.
- Katz L.C., Shatz C.J. (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.
- Kawaguchi Y., Wilson C.J., Augood S.J., Emson P.C. (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18: 527–535.
- Kawamoto Y., Nakamura S., Nakano S., Oka N., Akiguchi I., Kimura J. (1996) Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in the adult rat brain. *Neuroscience* 74: 1209–1226.
- Kells A.P., Fong D.M., Dragunow M., During M.J., Young D., Connor B. (2004) AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. *Mol. Ther.* 9: 682-688.
- Kesslak J.P., So V., Choi J., Cotman C.W., Gomez-Pinilla F. (1998) Learning up-regulates brain-derived neurotrophic factor messenger RNA: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci.* 112: 1012–1019.
- Kew J.N., Sofroniew M.W. (1997) Brain-derived neurotrophic factor, acidic and basic fibroblast growth factors, insulin-like growth factors-1, and various antioxidants do not prevent the apoptotic death of developing septal cholinergic neurons following nerve growth factor withdrawal in vitro. *Neuroscience* 76: 809–820.

Kinoshita S., Yasuda H., Taniguchi N., Katoh-Semba R., Hatanaka H., Tsumoto T. (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J. Neurosci.* 19: 2122-2130.

Kirschner P.B., Jenkins B.G., Schulz J.B., Finkelstein S.P., Matthews R.T., Rosen B.R., Beal M.F. (1996) NGF, BDNF and NT-5 but not 3-NT protect against MPP+ toxicity and oxidative stress in neonatal animals. *Brain Res.* 713: 178-185.

Klein R., Parada L.F., Coulier F., Barbacid M. (1989) trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 8: 3701-3709.

Klein R., Conway D., Parada L.F., Barbacid M. (1990) The TrkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61: 647-656.

Klein R., Nanduri V., Jing S.A., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K.R., Reichardt L.F., Barbacid M. (1991) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66: 395-403.

Knipper M., da Penha Berzaghi M., Blochl A., Breer H., Thoenen H., Lindholm D. (1994) Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 6: 668-671.

Knüsel B., Winslow J.W., Rosenthal A., Burton L.E., Seid D.P., Nikolics K., Hefti F. (1991) Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 961-965.

Knüsel B., Beck K.D., Winslow J.W., Rosenthal A., Burton L.E., Widmer H.R., Nikolics K., Hefti F. (1992) Brain-derived neurotrophic factor administration protects basal forebrain cholinergic but not nigral dopaminergic neurons from degenerative changes after axotomy in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 12: 4391-4402.

Kokaia Z., Bengzon J., Metsis M., Kokaia M., Persson H., Lindvall O. (1993) Coexpression of neurotrophins and their receptors in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6711-6715.

Kokaia Z., Andsberg G., Yan Q., Lindvall O. (1998) Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport. *Exp. Neurol.* 154: 289-301.

Koliatsos V.E., Price D.L., Gouras G.K., Cayouette M.H., Burton L.E., Winslow J.W. (1994) Highly selective effects of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3, on intact and injured basal forebrain cholinergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 343: 247-262.

Kooy N. W., Royall J. A., Ye Y. Z., Kelly D. R., Beckman J. S. (1995) Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am. Rev. Respir. Crit. Care Med.* 269: 21614-21619.

Korhonen L., Riikonen R., Nawa H., Lindholm D. (1998) Brain-derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid of children suffering from asphyxia. *Neurosci. Lett.* 240: 151–154.

Koyama Y., Tsujikawa K., Matsuda T., Baba A. (2003) Intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor agonist increases expressions of GDNF and BDNF in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 18: 887-894.

Krieglstein K., Suter Crazzolaro C., Unsicker K. (1995) Development of mesencephalic dopaminergic neurons and the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Neural Transm. Suppl.* 46: 209-216.

Krieglstein K., Maysinger D., Unsicker K. (1996) The survival response of mesencephalic dopaminergic neurons to the neurotrophins BDNF and NT-4 requires priming with serum: comparison with members of the TGF-beta superfamily and characterization of the serum-free culture system. *J. Neural Transm. Suppl.* 47: 247-258.

Kume T., Kouchiyama H., Kaneko S., Maeda T., Akaike A., Shimohama S., Kihara T., Kimura J., Wada K., Koizumi S. (1997) BDNF prevents NO mediated glutamate citotoxicity in cultured cortical cells. *Brain Res.* 756: 200-204.

Kumura E., Kimura F., Taniguchi N., Tsumoto T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor blocks long-term depression in solitary neurones cultured from rat visual cortex. *J. Physiol.* 524: 195-204.

Lang A.E., Lozano A.M. (1998a) Parkinson's disease: first of two parts. *New Engl. J. Med.* 339: 1044–1053.

Lang A.E., Lozano A.M. (1998b) Parkinson's disease: second of two parts. *New Engl. J. Med.* 339: 1130–1143.

Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I. (1983) Chronic parkinsonism due to a product of a meperidine analog synthesis. *Science* 219: 979–980.

Langston J.W., Forno L.S., Robert C.S., Irwin I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292: 390–394.

Lapchak P.A., Beck K.D., Araujo D.M., Irwin I., Langston J.W., Hefti F. (1993a) Chronic intranigral administration of brain-derived neurotrophic factor produces striatal dopaminergic hypofunction in unlesioned adult rats and fails to attenuate the decline of striatal dopaminergic function following medial forebrain bundle transection. *Neuroscience* 53: 183-194.

Lapchak P.A., Araujo D.M., Beck K.D., Finch C.E., Johnson S.A., Hefti F. (1993b) BDNF and TrkB expression in the hippocampal formation of aging rats. *Neurobiol. Aging* 14: 121-126.

Le Moine C., Tison F., Bloch B. (1990) D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett.* 117: 248-252.

Le Moine C, Bloch B. (1991) Rat striatal and mesencephalic neurons contain the long isoform of the D2 dopamine receptor mRNA. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 10 : 283-289.

Lein E.S., Shatz C.J. (2000) Rapid regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA within eye-specific circuits during ocular dominance column formation. *J. Neurosci.* 20: 1470-1483.

Lessmann V. (1998) Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen. Pharmacol.* 31: 667-674.

Levivier M., Przedborski S., Bencsics C., Kang U.J. (1995) Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 15: 7810-7820.

Levy R., Hazrati L.N., Herrero M.T., Vila M., Hassani O.K., Mouroux M., Ruberg M., Asensi H., Agid Y., Feger J., Obeso J.A., Parent A., Hirsch E.C. (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neuroscience* 76: 335-343.

Lewin G.R., Barde Y.-A. (1996) Physiology of neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 289-317.

Liang F.Q., Walline R., Earnest D.J. (1998) Circadian rhythm of brain-derived neurotrophic factor in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 242: 89-92.

Lindholm D. (1994) Role of neurotrophins in preventing glutamate induced neuronal cell death. *J. Neurol.* 242: S16-18.

Lindsay R.M., Hyman C. (1994) Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions. *J. Neurochem.* 63: 1021-1032.

Lindvall O., Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Smith M.L., Siesjo B.K., Persson H. (1992) Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 648-662.

Linnarsson S., Björklund A., Ernfors P. (1997) Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 9: 2581-2587.

Lipton S.A., Sucher N.J., Kaiser P.K., Dreyer E.B. (1991) Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron* 7: 111-118.

Lohof A.M., Ip N.Y., Poo M.M. (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363: 350-353.

Loughlin S.E., Fallon J.H. (1983) Dopaminergic and non-dopaminergic projections to amygdala from substantia nigra and ventral tegmental area. *Brain Res.* 262: 334-338.

Loughlin S.E., Fallon J.H. (1984) Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: topography and collateralization. *Neuroscience* 11: 425-435.

Lowenstein D.H., Arsenault L. (1996) The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. *J. Neurosci.* 16: 1759–1769.

Lu B., Figurov A. (1997) Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev. Neurosci.* 8: 1-12.

Lu B., Chow A. (1999) Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J. Neurosci. Res.* 58: 76–87.

Lu B. (2003) BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn. Mem.* 10: 86-98.

Lucidi-Phillipi C.A., Gage F.H., Shults C.W., Jones K.R., Reichardt L.F., Kang U.J. (1995) Brain-derived neurotrophic factor-transduced fibroblasts: production of BDNF and effects of grafting to the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 354: 361-376.

Lüesse H.-G., Roskoden T., Linke R., Otten U., Heese K., Schwegler H. (1998) Modulation of mRNA expression of the neurotrophins of the nerve growth factor family and their receptors in the septum and hippocampus after transient postnatal thyroxine treatment. *Exp. Brain Res.* 119: 1–8.

MacMillan J., Quarrell O. (1996) The neurobiology of Huntington's disease. In: Harper, P.S. Editor. *Huntington's Disease* (2nd ed), WB Saunders Co Ltd, London, 317–357.

Maisonpierre P.C., Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D., Yancopoulos G.D. (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5: 501–509.

Marin P., Lafon-Cazal M., Bockaert J. (1992) A nitric oxide-synthase activity stimulated by NMDA receptors via protein kinase C activation in mouse striatal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 4: 25–432.

Martínez-Serrano A., Björklund A. (1996) Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J. Neurosci.* 16: 4604-4616.

Marty S., Berzaghi M.P., Berninger B. (1997) Neurotrophins and activity-dependant plasticity of cortical interneurons. *Trends Neurosci.* 20: 198–202.

Matarredona E.R., Santiago M., Venero J.L., Cano J., Machado A. (2001) Group II metabotropic glutamate receptor activation protects striatal dopaminergic nerve terminals against MPP⁺-induced neurotoxicity along with brain-derived neurotrophic factor induction. *J. Neurochem.* 76: 351-360.

Mattson M.P., Rychlik B., Chu C., Christakos S. (1991) Evidence for calcium-reducing and excito-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 1: 41-51.

Mattson M.P., Lovell M.A., Furukawa K., Markesbery W.R. (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular calcium concentration, and neurotoxicity, and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65: 1740–1751.

Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261–263.

McAllister A.K., Katz L.C., Lo D.C. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 295–318.

McBride J.L., Behrstock S.P., Chen E.Y., Jakel R.J., Siegel I., Svendsen C.N., Kordower J.H. (2004) Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J. Comp. Neurol.* 475: 211-219.

McGeer E.G., McGeer P.L. (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263: 517–519.

McRitchie D.A., Cartwright H., Pond S.M., van der Schyf C.J., Castagnoli Jr.N., van der Nest D.G., Halliday G.M. (1998) The midbrain dopaminergic cell groups in the baboon *Papio ursinus*. *Brain Res. Bull.* 47: 611–623.

McRitchie D.A., Hardman C.D., Halliday, G.M. (1996) Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rat and humans. *J. Comp. Neurol.* 364: 121–150.

Meldrum B., Garthwaite J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 379-387.

Merlio J.P., Ernfors P., Jaber M., Persson H. (1992) Molecular cloning of rat TrkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the TrkB family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51: 513-532.

Merlio J.P., Ernfors P., Kokaia Z., Middlemas D.S., Bengzon J., Kokaia M., Smith M.L., Siesjo B.K., Hunter T., Lindvall O. (1993) Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 10: 151–164.

Michael G.J., Priestly J.V. (1996) Combined immunocytochemistry and in situ hybridization, in *In Situ Hybridization Techniques for the Brain* (Henderson Z., ed), Vol. 17: 111-118. John Wiley & Sons Ltd.

Michaelis E.K. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54: 369–415.

Middlemas D.S., Lindberg R.A., Hunter T. (1991) TrkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full length and two truncated receptors. *Mol. Cell Biol.* 11: 143–153.

Milbrandt J., de Sauvage F.J., Fahrner T.J., Baloh R.H., Leitner M.L., Tansey M.G., Lampe P.A., Heuckeoth R.O., Kotzbauer P.T., Simburger K.S., Golden J.P., Davies J.A., Vejsada R., Kato A.C., Hynes M., Sherman D., Nishimura M., Wang L.C., Vandlen R., Moffat B., Klein K., Poulsen K., Gray C., Garces A., Johnson Jr. E.M. (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20: 245-253.

Minichiello L., Korte M., Wolfner D., Kün R., Unsicker K., Cestari V., Rossi-Arnaud C., Lipp H.-P., Bonhoffer T., Klein R. (1999) Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24: 401–414.

Mitchell J.J., Paiva M., Moore D.B., Walker D.W., Heaton M.B. (1998) A comparative study of ethanol, hypoglycemia, hypoxia, and neurotrophic factor interactions with fetal rat hippocampal neurons: a multi-factor in vitro model developmental ethanol effects. *Dev. Brain Res.* 105: 241–250.

Mitsikostas D.D., Sanchez del Rio M. (2001) Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35: 20-35.

Miwa T., Furukawa S., Nakajima K., Furukawa Y., Koshaka S. (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J. Neurosci. Res.* 50: 1023–1029.

Miyake K., Yamamoto W., Tadokoro M., Takagi N., Sasakawa K., Nitta A., Furukawa S., Takeo S. (2002) Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF, and L1 following sustained cerebral ischemia. *Brain Res.* 935: 24-31.

Mizuno K., Carnahan J., Nawa H. (1994) Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev. Biol.* 165: 243–256.

Mizuno M., Yamada K., Olariu A., Nawa H., Nabeshima T. (2000) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci.* 20: 7116-7121.

Mogi M., Togari A., Kondo T., Mizuno Y., Komure O., Kuno S., Ichinose H., Nagatsu T. (1999) Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270: 45–48.

Moller J.C., Kruttgen A., Heymach J.V.Jr., Ghori N., Shooter E.M. (1998) Subcellular localization of epitope-tagged neurotrophins in neuroendocrine cells. *J. Neurosci. Res.* 51: 463-467.

Morse J.K., Wiegand S.J., Anderson K., You Y., Cai N., Carnahan J., Miller J., DiStefano P.S., Altar C.A., Lindsay R.M. (1993) Brain-derived neurotrophic factor prevents the degeneration of medial septal cholinergic neurons following fimbria transection. *J. Neurosci.* 13: 4146–4156.

Mufson E.J., Kroin J.S., Sobreviela T., Burke M.A., Kordower J.H., Penn R.D., Miller J.A. (1994) Intrastratial infusions of brain-derived neurotrophic factor: retrograde transport and colocalization with dopamine containing substantia nigra neurons in rat. *Exp. Neurol.* 129: 15-26.

Mufson E.J., Kroin J.S., Sendera T.J., Sobreviela T. (1999) Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: Functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 57: 451-484.

Muller M.B., Toschi N., Kresse A.E., Post A., Keck M.E. (2000) Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology* 23: 205-215.

Murer M.G., Boissiere F., Yan Q., Hunot S., Villares J., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E., Raisman-Vozari R. (1999a) An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 88: 1015-1032.

Murer M.G., Raisman-Vozari R., Yan Q., Ruberg M., Agid Y., Michel P.P. (1999b) Survival factors promote BDNF protein expression in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Neuroreport* 10: 801-805.

Murer M.G., Yan Q., Raisman-Vozari R. (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63: 71-124.

Muthane U., Ramsay K.A., Jiang H., Jackson-Lewis V., Donaldson D., Fernando S., Ferreira M., Prezdborski S. (1994) Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1 and 6-tetrahydropyridine in C57/bl1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Exp. Neurol.* 126: 195-204.

Nakanishi S., Masu M. (1994) Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 319-348.

Nakao N., Brundin P., Funa K., Lindvall O., Odin P. (1995) Trophic and protective actions of brain-derived neurotrophic factor on striatal DARPP-32-containing neurons in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 90: 92-101.

Nambu A., Tokuno H., Hamada I., Kita H., Imanishi M., Akazawa T., Ikeuchi Y., Hasegawa N. (2000) Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J. Neurophysiol.* 84: 289-300.

Narisawa-Saito M., Nawa H. (1996) Differential regulation of hippocampal neurotrophins during aging in rats. *J. Neurochem.* 67: 1124-1131.

Nawa H., Carnahan J., Gall C. (1995) BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1527-1535.

Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. (1989) Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 69-102.

Neeper S.A., Gomez-Pinilla F., Choi J., Cotman C.W. (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726: 49-56.

- Niblock M.M., Brunso-Bechtold J.K., Riddle D.R. (2000) Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 20: 4165-4176.
- Nibuya M., Morinobu S., Duman R.S. (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.* 15: 7539-7547.
- Nitta A., Ohmiya M., Sometani A., Itoh M., Nomoto H., Furukawa Y., Furukawa S. (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal cell death induced by corticosterone. *J. Neurosci. Res.* 57: 227-235.
- Noh J.S., Kim E.Y., Kang J.S., Kim H.R., Oh Y.J., Gwag B.J. (1999) Neurotoxic and neuroprotective actions of catecholamines in cortical neurons. *Exp. Neurol.* 159: 217-224.
- Nonner D., Barrett E.F., Barrett J.N. (1996) Neurotrophin effects on survival and expression of cholinergic properties in cultured rat septal neurons under normal and stress conditions. *J. Neurosci.* 16: 6665-6675.
- Nonomura T., Hatanaka H. (1992) Neurotrophic effect of brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal rats. *Neurosci. Res.* 14: 226-233.
- Nonomura T., Nishio C., Lindsay R.M., Hatanaka H. (1995) Cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats show both overlapping and non-overlapping responses to the neurotrophins. *Brain Res.* 683: 129-139.
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz Z. (1984) Magnesium gates glutamate activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-46.
- Numan S., Seroogy K.B. (1997) Increased expression of trkB mRNA in rat caudate-putamen following 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Eur. J. Neurosci.* 9: 489-495.
- Numan S., Seroogy K.B. (1999) Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 403: 295-308.
- Oertel W.H., Mugnaini E., Nitsch C., Schmechel D.E., Kopin I.J. (1982) Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. *Brain Res. Bull.* 9: 463-474.
- Ohgoh M., Kimura M., Ogura H., Katayama K., Nishizawa Y. (1998) Apoptotic cell death of cultured cerebral cortical neurons induced by withdrawal of astroglial trophic support. *Exp. Neurol.* 149: 51-63.
- Oliff H.S., Berchtold N.C., Isackson P., Cotman C.W. (1998) Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 61: 147-153.
- Olney J. W. (1990) Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 47-71.

Orieux G., Francois C., Feger J., Hirsch E.C. (2002) Consequences of dopaminergic denervation on the metabolic activity of the cortical neurons projecting to the subthalamic nucleus in the rat. *J. Neurosci.* 22: 8762-8770.

Ostergaard K., Jones S.A., Hyman C., Zimmer J. (1996) Effects of donor age and brain-derived neurotrophic factor on the survival of dopaminergic neurons and axonal growth in postnatal rat nigrostriatal co-cultures. *Exp. Neurol.* 142: 340–350.

Othberg A., Odin P., Ballagi A., Ahgren A., Funa K., Lindvall O. (1995) Specific effects of platelet-derived growth factor on fetal rat and human dopaminergic neurons in vitro. *Exp. Brain Res.* 105: 111–122.

Parain K., Murer M.G., Yan Q., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E., Raisman-Vozari R. (1999) Reduced expression of BDNF protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport* 10: 557–561.

Parent A. (1990) Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13: 254–258.

Parent A., Hazrati L.N. (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. Part II: the place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res. Rev.* 20: 128–154.

Patapoutian A., Reichardt L.F. (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 272-280.

Patterson S.L., Grover L.M., Schwartzkroin P.A., Bothwell M. (1992) Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9: 1081-1088.

Paxinos G., Watson C. (1986) *The rat brain in Stereotaxic Coordinates*, 2^a ed., Academic Press, London.

Peng T-I., Jou M-J., Sheu S-S., Greenamyre J.T. (1998) Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons. *Exp. Neurol.* 149: 1–12.

Pérez-Navarro E., Alberch J., Neveu I., Arenas E. (1999) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo. *Neuroscience* 91: 1257-1264.

Pérez-Navarro E., Canudas A.M., Akerud P., Alberch J., Arenas E. (2000) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 75: 2190-2199.

Plaitakis A., Berl S., Yahr M. (1982) Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216: 193–196.

Poo M.M. (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Rev. Neurosci.* 2: 24-32.

Pringle A.K., Sundstrom L.E., Wilde G.J., Williams L.R., Iannotti F. (1996) Brain-derived neurotrophic factor, but not neurotrophin-3 prevents ischemia-induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampal cultures. *Neurosci. Lett.* 211: 203–206.

Radka S.F., Holst P.A., Fritsche M., Altar C.A. (1996) Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res.* 709: 122-301.

Revuelta M., Castaño A., Venero J.L., Machado A., Cano J. (2001) Long-lasting induction of brain-derived neurotrophic factor is restricted to resistant cell populations in an animal model of status epilepticus. *Neuroscience* 103: 955-969.

Roberts R.C., Ahn A., Swartz K.J., Beal M.F., DiFiglia M. (1993) Intrastratial injections of quinolinic acid or kainic acid: differential patterns of cell survival and the effects of data analysis on outcome. *Exp. Neurol.* 124: 274–282.

Rocamora N., Welker E., Pascual M., Soriano E. (1996) Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after sensory stimulation. *J. Neurosci.* 16: 4411-4419.

Rosenfeld R.D., Zeni L., Haniu M., Talvenheimo J., Radka S.F., Bennett L., Miller J.A., Welcher A.A. (1995) Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr. Purif.* 4: 465-471.

Rosenthal A., Goeddel D.V., Nguyen T., Martin E., Burton L.E., Shih A., Laramée G.R., Wurm F., Mason A., Nikolics K., Winslow J.W. (1991) Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* 129: 1289–1294.

Rossi F.M., Bozzi Y., Pizzorusso T., Maffei L. (1999) Monocular deprivation decreases brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the rat visual cortex. *Neuroscience* 90: 363-368.

Rothstein J.D., Tsai G., Kuncl R.W., Clawson L., Cornblath D.R., Drachman D.B., Pestronk A., Stauch B.L., Coyle J.T. (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 28: 18–25.

Rubinsztein D.C. (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet.* 18: 202-219.

Rudge J.S., Alderson R.F., Pasnikowski E., McClain J., Ip N.Y., Lindsay R.M. (1992) Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 4: 459-471.

Russo-Neustadt A., Beard R.C., Cotman C.W. (1999) Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology* 21: 679-682.

Rutherford L.C., DeWan A., Lauer H.M., Turrigiano G.G. (1997) Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J. Neurosci.* 17: 4527-4535.

Rutherford L.C., Nelson S.B., Turrigiano G.G. (1998) BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 21: 521-530.

Ryu J.K., Kim J., Cho S.J., Hatori K., Nagai A., Choi H.B., Lee M.C., McLarnon J.G., Kim S.U. (2004) Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* 16: 68-77.

Sanberg P.R., Nishino H., Borlongan C.V. (1999) *Mitochondrial Inhibitors and Neurodegenerative Disorders*, Humana Press, NJ.

Sautter J., Meyer M., Spenger C., Seiler R.W., Widmer H.R. (1998) Effects of combined BDNF and GDNF treatment on cultured dopaminergic midbrain neurons. *Neuroreport* 9: 1093–1096.

Schaaf M.J.M., de Jong J., de Kloet R., Vreugdenhil E. (1998) Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Res.* 813: 112–120.

Schlessinger J., Ullrich A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9: 383–391.

Schmidt-Kastner R., Wetmore C., Olson L. (1996) Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular levels suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. *Neuroscience* 74: 161-83.

Schoepp D.D., Jane D.E., Monn J.A. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38: 1431-1476.

Schoups A.A., Elliott R.C., Friedman W.J., Black I.B. (1995) NGF and BDNF are differentially modulated by visual experience in the developing geniculocortical pathway. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86: 326-334.

Schuman E.M. (1999) Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 105-109.

Schwarcz R., Hökfelt T., Fuxe K., Jonsson G., Goldstein M., Terenius L. (1979) Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Exp. Brain Res.* 37: 199–216.

Schwarcz R., Whetsell W.O., Mangano R.M. (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219: 316–318.

Schwarcz R., Foster A.C., French E.D., Whetsell W.O., Kohler C. (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* 35: 19-32.

Segal R., Greenberg M. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Ann. Rev. Neurosci.* 19: 463–489.

Seroogy K.B., Dangaran K., Lim S., Haycock J.W., Fallon J.H. (1989) Ventral mesencephalic neurons containing both cholecystokinin- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities project to forebrain regions. *J. Comp. Neurol.* 279: 397–414.

Seroogy K.B., Gall C.M. (1993) Expression of neurotrophins by midbrain dopaminergic neurons. *Exp. Neurol.* 124: 119-128.

Seroogy K.B., Lundgren K.H., Tran T.M., Guthrie K.M., Isackson P.J., Gall C.M. (1994) Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J.Comp.Neurol.* 342: 321-334.

Sherwood N.T., Lo D.C. (1999) Long-term enhancement of central synaptic transmission by chronic brain- derived neurotrophic factor treatment. *J. Neurosci.* 19: 7025-7036.

Shetty A.K., Turner D.A. (1998) In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal-growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurobiol.* 35: 395-425.

Shigemoto R., Kinoshita A., Wada E., Nomura S., Ohishi H., Takada M., Flor P.J., Neki A., Abe T., Nakanishi S., Mizuno N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 19: 7503-7522.

Shimohama S., Tamura Y., Akaike A., Tsukahara T., Ohara O., Wanatabe S., Kimura J. (1993) Brain-derived neurotrophic factor exerts a partially protective effect against glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 164: 55-58.

Shults C.W., Kimber T., Altar C.A. (1996) BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hidroxidopamine. *Neuroreport* 6: 1109-1112.

Siegel G.J, Chauhan N.B. (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 33: 199-227.

Smith A.D., Bolam J.P. (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci.* 13: 259-265.

Smith M.A., Makino S., Kvetnansky R., Post R.M. (1995) Stress alters the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the hippocampus. *J. Neurosci.* 15: 1768-1777.

Smith M.A., Cizza G. (1996) Stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression are attenuated in aged Fischer 344/N rats. *Neurobiol. Aging* 17: 859-864.

Smith M.A., Zhang L.X., Lyons W.E., Mamounas L.A. (1997) Anterograde transport of endogenous brain-derived neurotrophic factor in hippocampal mossy fibers. *Neuroreport* 8: 1829-1834.

Smith Y., Bevan M.D., Shink E., Bolam J.P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86: 353-387.

Snider W.D. (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77: 627-638.

Snider W.D., Lichtman J.W. (1996) Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol. Cell. Neurosci.* 6: 433-442.

Sofroniew M.V., Galletly N.P., Isacson O., Svendsen C.N. (1990) Survival of adult basal cholinergic neurons after loss of target neurons. *Science* 247: 338-342.

Son J.H., Chun H.S., Joh T.H., Conti B., Lee J.W. (1999) Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *J. Neurosci.* 19: 10–20.

Soppet D., Escandon E., Maragos J., Middlemas D.S., Reid S.W., Blair J., Burton L.E., Stanton B.R., Kaplan D.R., Hunter T. (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65: 895-903.

Spenger C., Hyman C., Studer L., Egli M., Evtouchenko L., Jackson C., Dahl-Jorgensen A., Lindsay R.M., Seiler R.W. (1995) Effects of BDNF on dopaminergic, serotonergic, and GABAergic neurons in cultures of human fetal ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* 133: 50-63.

Spina M.B., Squinto S.P., Miller J., Lindsay R.M., Hyman C. (1992) Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and *N*-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J. Neurochem.* 59: 99–160.

Steiner H., Kitai S.T. (2001) Unilateral striatal dopamine depletion: time-dependent effects on cortical function and behavioural correlates. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1390-1404.

Stout A.K., Raphael H.M., Kanterewicz B.I., Klann E., Reynolds I.J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature Neurosci.* 1: 366–373.

Studer L., Spenger C., Seiler R.W., Altar C.A., Lindsay R.M., Hyman C. (1995) Comparison of the effects of the neurotrophins on the morphological structure of dopaminergic neurons in cultures of rat substantia nigra. *Eur. J. Neurosci.* 7: 223–233.

Studer L., Spenger C., Seiler R.W., Othberg A., Lindvall O., Odin P. (1996) Effects of brain-derived neurotrophic factor on neuronal structure of dopaminergic neurons in dissociated cultures of human fetal mesencephalon. *Exp. Brain Res.* 108: 328–336.

Szabo J. (1962) Topical distribution of the striatal efferents in the monkey. *Exp. Neurol.* 5: 21–36.

Tanabe Y., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Nakanishi S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8: 169–179.

Thajeb P., Ling Z.D., Potter E.D., Carvey P.M. (1997) The effects of storage conditions and trophic supplementation on the survival of fetal mesencephalic cells. *Cell. Transplant.* 6: 297–307.

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: 971–983.

Thoenen H., Barde Y.-A., Davies A.M., Johnson J.E. (1987) Neurotrophic factors and neuronal death. *Cyba Found. Symp.* 126: 82-95.

Thoenen H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-598.

Timmusk T., Palm K., Lendahl U., Metsis M. (1999) Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J. Biol. Chem.* 274: 1078-1084.

Toggas S.M., Masliah E., Rockenstein E.M., Rall G.F., Abraham C.R., Mucke L. (1994) Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature* 367: 188-193.

Toyomoto M., Ohta M., Okumura K., Yano H., Matsumoto K., Inoue S., Hayashi K., Ikeda K. (2004) Prostaglandins are powerful inducers of NGF and BDNF production in mouse astrocyte cultures. *FEBS Lett.* 562: 211-215.

Tremblay R., Hewitt K., Lesiuk H., Mealing G., Morley P., Durkin J.P. (1999) Evidence that brain-derived neurotrophic factor neuroprotection is linked to its ability to reverse the NMDA-induced inactivation of protein kinase C in cortical neurons. *J. Neurochem.* 72: 102-111.

Tseng J.L., Baetge E.E., Zurn A.D., Aebischer P. (1997) GDNF reduced drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. *J. Neurosci.* 17: 325-333.

Tsukahara T., Takeda M., Shimohama S., Ohara O., Hashimoto N. (1995) Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery* 37: 733-741.

Ueyama T., Kawai Y., Nemoto K., Sekimoto M., Tone S., Semba E. (1997) Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci. Res.* 28: 103-110.

Uyama Y., Ishida M., Shinozaki H. (1997) DCG-IV, a potent metabotropic glutamate receptor agonist, as an NMDA receptor agonist in the rat cortical slice. *Brain Res.* 752: 327-330.

Vaidya V.A., Terwilliger R.M., Duman R.S. (1999) Role of 5-HT_{2A} receptors in the stress-induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 262: 1-4.

van der Kooy D., Coscina D.V., Hattori T. (1981) Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway? *Neuroscience* 6: 345-357.

Venero J.L., Beck K.D., Hefti F. (1994a) 6-Hydroxydopamine lesions reduce BDNF mRNA levels in adult rat brain substantia nigra. *Neuroreport* 5: 429-432.

Venero J.L., Knüsel B., Beck K.D., Hefti F. (1994b) Expression of neurotrophin and Trk receptor genes in adult rats with fimbria transections: effect of intraventricular nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor administration. *Neuroscience* 59: 797-815.

Venero J.L., Revuelta M., Cano J., Machado A. (1997) Time course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial forebrain bundle: detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra. *J. Neurochem.* 68: 2458–2468.

Venero J.L., Hefti F. (1998) Regionally specific induction of BDNF and truncated trkB.T1 receptors in the hippocampal formation after intraseptal injection of kainic acid. *Brain Res.* 790: 270-277.

Venero J.L., Vizuite M.L., Revuelta M., Vargas C., Cano J., Machado A. (2000) Upregulation of BDNF mRNA and trkB mRNA in the nigrostriatal system and in the lesion site following unilateral transection of the medial forebrain bundle. *Exp. Neurol.* 161: 38-48.

Venero J.L., Santiago M., Tomas-Camardiel M., Matarredona E.R., Cano J., Machado A. (2002) DCG-IV but not other group-II metabotropic receptor agonists induces microglial BDNF mRNA expression in the rat striatum. Correlation with neuronal injury. *Neuroscience* 113: 857-869.

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

Vicario-Abejon C., Collin C., McKay R.D., Segal M. (1998) Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18: 7256-7271.

Volpe B.T., Wildmann J., Altar C.A. (1998) Brain-derived neurotrophic factor prevents the loss of nigral neurons induced by excitotoxic striatal-pallidal lesions. *Neuroscience* 83: 741-748.

von Bartheld C.S. (1998) Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol. Histopathol.* 13: 437-459.

von Bartheld C.S., Wang X., Butowt R. (2001) Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks. *Mol. Neurobiol.* 24: 1-28.

Vonsattel J-P.G., DiFiglia M. (1998) Huntington Disease. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 57: 369–384.

Wang Y., Sheen V.L., Macklis J.D. (1998) Cortical interneurons upregulate neurotrophins *in vivo* in response to targeted apoptotic degeneration of neighboring pyramidal neurons. *Exp. Neurol.* 154: 389–402.

West A.E., Chen W.G., Dalva M.B., Dolmetsch R.E., Kornhauser J.M., Shaywitz A.J., Takasu M.A., Tao X., Greenberg M.E. (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11024-11031.

Wetmore C., Cao Y., Pettersson R.F., Olson L. (1991) Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9843–9847.

Widmer H.R., Knüsel B., Hefti F. (1993) BDNF protection of basal forebrain cholinergic neurons after axotomy: complete protection of p75^{NGFR}-positive cells. *Neuroreport* 4: 363–366.

Williams L.R., Inouye G., Cummins V., Pelleymounter M.A. (1996) Glial cell line derived neurotrophic factor sustains axotomized basal forebrain cholinergic neurons in vivo: dose-response comparison to nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 1140–1151.

Wilsch V.W., Pidoplichko V.I., Opitz T., Shinozaki H., Reymann K.G. (1994) Metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV as NMDA receptor agonist in immature rat hippocampal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 262: 287–289.

Wu H., Friedman W.J., Dreyfus C.F. (2004) Differential regulation of neurotrophin expression in basal forebrain astrocytes by neuronal signals. *J. Neurosci. Res.* 76: 76–85.

Xiong H., Yamada K., Han D., Nabeshima T., Enikopolov G., Carnahan J., Nawa H. (1999) Mutual regulation between the intercellular messengers nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in rodent neocortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 11: 1567–1576.

Xu B., Zang K., Ruff N.L., Zhang Y.A., McConnell S.K., Stryker M.P., Reichardt L.F. (2000) Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB. *Neuron* 26: 233–245.

Yan Q., Rosenfeld R.D., Matheson C.R., Hawkins N., Lopez O.T., Bennett L., Welcher A.A. (1997a) Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78: 431–448.

Yan Q., Radeke M.J., Matheson C.R., Talvenheimo J., Welcher A.A., Feinstein S.C. (1997b) Immunocytochemical localization of Trkb in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 378: 135–157.

Yoshimoto Y., Lin Q., Collier T.J., Frim D.M., Breakefield X.O., Bohn M.C. (1995) Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioural improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 691: 25–36.

Young A.B., Greenamyre J.T., Penney J.B. (1986) Glutamate receptors in Alzheimer's disease. In *Excitatory Amino Acid Transmission*, eds T. P. Hicks, D. Lodge and H. McLennan, 233–240. Alan R. Liss: New York.

Young A.B., Greenamyre J.T., Hollingsworth Z., Albin R., D'Amato C., Shoulson I., Penney J. B. (1988) NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241: 981–983.

Yuen E.C., Mobly W.C. (1996) Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Ann. Neurol.* 40: 346–354.

Yurek D.M., Lu W., Hipkens S., Wiegand S.J. (1996) BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons. *Ann. Neurol.* 137: 105–118.

Zafra F., Hengerer B., Leibrock J., Thoenen H., Lindholm D. (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.* 9: 3545-3550.

Zetterstrom T.S., Pei Q., Madhav T.R., Coppel A.L., Lewis L., Graham-Smith D.G. (1999) Manipulations of brain 5-HT levels affect gene expression for BDNF in rat brain. *Neuropharmacology* 38: 1063–1073.

Zhou J., Bradford H.F., Stern G.M. (1994) The response of human and rat fetal ventral mesencephalon in culture to the brain-derived neurotrophic factor treatment. *Brain Res.* 656: 147–156.

Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D., Leavitt B.R., Goffredo D., Conti L., MacDonald M.E., Friedlander R.M., Silani V., Hayden M.R., Timmusk T., Sipione S., Cattaneo E. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293: 493-498.