



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN DE UNA VÍA NEUROPROTECTORA
MEDIADA POR LA NEUROTROFINA BDNF Y ÓXIDO NÍTRICO**

Memoria para optar al título de Bioquímico

Profesor Patrocinante

Dra. María Antonieta Valenzuela
Laboratorio de Bioquímica
Depto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile.

Director de Tesis

Dra. Úrsula Wyneken
Laboratorio de Neurociencias
Facultad de Medicina
Universidad de Los Andes

ARIEL ANDRÉS CAVIEDES AVENDAÑO

Santiago, 2011

Agradecimientos:

Quiero agradecer a la Dra. Úrsula Wyneken por acogerme en su laboratorio, por su paciencia, enseñanzas y formación. También quiero agradecer a Andrés González y Rodrigo González por sus enseñanzas y sincera dedicación. Además quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio Soledad, Mauricio, Estíbaliz, Javier Rubio, Ximena, Camilo, Marcos y Vicky por su apoyo y consejos. No puedo dejar de mencionar a mis amigos Alejandro Luarte y Jorge Toledo que con ellos todo esto fue más fácil.

Esta memoria fue financiada por el proyecto Fondecyt 1100322 y por el proyecto Anillo ACT09-2006.

Dedicada a mi familia, en especial a mi madre Leonor.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Plasticidad homeostática.....	5
1.2. Mecanismos de plasticidad homeostática.....	9
1.3. BDNF y su receptor TrkB.....	9
1.4. Vías de señalización mediadas por TrkB.....	10
1.5. Neurotransmisión excitatoria y receptores para glutamato.....	11
1.6. Receptor de glutamato de tipo NMDA como mecanismos homeostático...	12
1.7. Óxido nítrico sintasa.....	13
1.8. Vías de producción de NO.....	14
1.9. Efectos protectores versus tóxicos del NO.....	15
1.10. S-nitrosilación del R-NMDA como mecanismo homeostático frente a actividad neuronal elevada.....	16
1.11. Datos del laboratorio.....	17
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. MATERIALES.....	20
4.1.1. Reactivos.....	20
4.1.2. Sondas para medir fluorescencia.....	20
4.1.3. Fármacos e inhibidores.....	20
4.1.4. Anticuerpos.....	21
4.2. METODOS.....	21
4.2.1. Cultivo celular primario.....	21
4.2.2. Estimulación de circuitos neuronales con <i>bicuculina</i> 10 μ m por dos días.....	23

4.2.3.	Imágenes de fluorescencia.....	23
4.2.4.	Medición de Ca ²⁺ intracelular.....	23
4.2.5.	Medición de NO intracelular.....	24
4.2.6.	Inmunocitoquímica.....	25
4.2.7.	Adquisición de imágenes y análisis.....	26
4.2.8.	Metodología de cuantificación.....	26
4.2.9.	Estadística.....	27
5.	RESULTADOS.....	28
5.1.	Consideraciones experimentales.....	28
5.1.1.	Selección de neuronas para medir producción de NO y Ca ²⁺ Intracelular.....	28
5.1.2.	Medición de producción de NO.....	29
5.2.	BDNF estimula la producción de NO en neuronas corticales.....	30
5.3.	La producción de NO es dependiente del receptor para BDNF, TrkB.....	32
5.4.	La producción de NO luego de la estimulación con NMDA es mayor en neuronas hipocámpicas.....	33
5.5.	Los aumentos de Ca ²⁺ mediados por el R NMDA en neuronas corticales son inhibidos por BDNF y NO.....	35
5.6.	Activación del receptor TrkB.....	37
6.	DISCUSIÓN.....	39
6.1.	Mecanismos homeostáticos.....	40
6.2.	Papeles biológicos opuestos de NO reportados en la literatura.....	42
6.3.	S-nitrosilación del Receptor de NMDA por BDNF/TrkB.....	42
6.4.	Vulnerabilidad diferencial de diferentes estructuras neuronales y la expresión de mecanismos homeostáticos.....	43
7.	CONCLUSIÓN.....	44
8.	REFERENCIAS.....	46

ABREVIATURAS

BDNF:	Brain Derived Neurotrophic Factor (por factor neurotrófico derivado del cerebro)
BIC:	Bicuculina
CaM:	Calmodulina
CNQX:	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CX:	Corteza
DAF-fm:	3-amino,4-aminoetil-2',7'-difluoresceína
DAG:	Diacilglicerol
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPS:	Densidad postsináptica
EE:	Error estándar
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
Fura-2-AM:	Fura-2 acetoximetilester
GABA:	Ácido alfa-aminobutírico
GABA A:	Ácido alfa-aminobutírico tipo A
HP	Hipocampo
L-NNA:	N[ω]-nitro-L-arginina
MEM:	Medio esencial mínimo
mEPSC:	Corrientes sinápticas excitadoras en miniatura
NGF:	Factor de crecimiento nervioso
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NMDA-R:	Receptor glutamatérgico tipo NMDA
NO:	Óxido nítrico
NOS:	Óxido nítrico sintasa
nNOS:	Óxido nítrico sintasa neuronal

NT:	Neurotrofina
IP3:	Inositol 1,4,5-trifosfato
PBS:	Tampón fosfato salino
PFA:	Paraformaldehído
PKC:	Proteína kinasa C
PLC γ :	Fosfolipasa C tipo gama
p-Y515:	Tirosina 515 fosforilada
SNAP:	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNC:	Sistema nervioso central
TTX:	Tetrodotoxina
TNF- α :	Factor necrótico tumoral alfa
TrkB:	Receptor para BDNF
TrkB-Fc:	Proteína de fusión compuesta por el dominio extracelular del receptor TrkB unido a la cadena pesada de IgG
VEH:	Vehículo

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA N°1: Evidencia de ajuste de tasa de disparos de potenciales de acción en cultivos neuronales.
- FIGURA N°2: Efectos de un bloqueo o aumento de la actividad sobre las mEPSCs
- FIGURA N°3: Efectos opuestos del NO en el sistema nervioso central
- FIGURA N°4: Modulación diferencial de la viabilidad celular en respuesta a NMDA
- FIGURA N°5: Curso temporal del protocolo de medición de NO
- FIGURA N°6: Imagen representativa de un cultivo neuronal
- FIGURA N°7: Mediciones de NO y control de disponibilidad de la sonda fluorescente DAF-fm
- FIGURA N°8: NO es producido a mayor velocidad en neuronas corticales que en neuronas hipocámpales en respuesta a BDNF
- FIGURA N°9: La producción de NO en respuesta a BDNF depende de TrkB
- FIGURA N°10: Medición de NO en respuesta a NMDA
- FIGURA N°11: Mediciones de Ca^{2+} intracelular dependientes del R-NMDA: modulación por BDNF y NO
- FIGURA N°12: Cuantificación de TrkB fosforilado en tirosina 515 (p-Y515)
- FIGURA N°13: Colocalización de PSD-95 y TrkB fosforilado en tirosina 515 (p-Y515)
- FIGURA N°14: Modelo propuesto.

RESUMEN.

La plasticidad homeostática mantiene la actividad sináptica y neuronal en rangos fisiológicos. En cultivos neuronales primarios, estos cambios compensatorios se inducen por perturbaciones prolongadas (48 horas) de la actividad neuronal utilizando fármacos. Así, al incubar cultivos con Bicuculina, un inhibidor de la neurotransmisión inhibitoria (GABAérgica), aumenta la actividad neuronal.

Los cambios compensatorios incluyen inhibición de la neurotransmisión excitadora, que está mediada por el neurotransmisor L-glutamato. En las sinapsis glutamatérgicas, los receptores post-sinápticos son principalmente canales iónicos que conducen cationes y existen subtipos de ellos basados en su perfil farmacológico diferencial. Así, el receptor tipo NMDA conduce sodio, potasio y calcio. Se ha propuesto que este receptor puede ser inhibido de manera homeostática por óxido nítrico (NO) frente a períodos de actividad aumentada, induciendo neuroprotección. NO modifica la actividad del receptor NMDA a través de S-nitrosilación de residuos de cisteína relevantes. Sin embargo, también se ha reportado que NO es tóxico. En el hipocampo, la sobre-estimulación del receptor NMDA activa a la óxido nítrico sintasa, que es calcio-dependiente, síntesis de NO y muerte neuronal por excitotoxicidad. También se sabe que diversas zonas cerebrales son diferencialmente sensibles a la excitotoxicidad, siendo el hipocampo una de las zonas más vulnerables.

Para dilucidar los efectos controversiales del NO en nuestro laboratorio se realizaron ensayos de viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas incubados con NMDA. Se usaron tanto cultivos primarios hipocámpales como corticales, en los cuales se indujeron aumentos de actividad prolongadas por incubaciones por 48 horas con bicuculina.

Después de un insulto excitotóxico con NMDA, se encontró que las neuronas corticales son más resistentes al daño excitotóxico comparado con neuronas hipocámpales, en que la sobrevivencia celular alcanzó al $72,93 \pm 4,75$ y $71,17 \pm 2,81\%$ en cultivos control e incubados con bicuculina. La mayor sobrevivencia de cultivos corticales depende de NO y la neurotrofina BDNF y su receptor TrkB. En cambio, en neuronas

hipocampales, se confirmó la toxicidad de NO y la presencia de BDNF no tuvo efecto sobre la viabilidad. Basados en estos hallazgos, la hipótesis de esta memoria es la siguiente: BDNF, a través de su receptor TrkB, induce síntesis de NO lo que lleva a modulación homeostática del receptor de NMDA en neuronas corticales pero no hipocampales. Esta vía no depende de fosforilación del receptor TrkB en el residuo Y515.

Se encontró que BDNF es capaz de inducir síntesis de NO en neuronas corticales, pero no en hipocampales. Además, NO inhibe los influxos de calcio mediados por el receptor de NMDA en neuronas corticales, pero no hipocampales. Esta vía neuroprotectora no pudo ser detectada en células hipocampales, en la cual el NO fue sintetizado principalmente en respuesta a estimulación NMDA, lo que no inhibió los influxos de calcio.

Este estudio muestra que BDNF tiene un papel neuroprotector frente a un insulto excitotóxico en neuronas corticales pero no hipocampales, efecto que está mediado por NO. Por lo tanto, efectos biológicos opuestos del NO dependen de la vía de señalización implicada en su síntesis. Es posible que este mecanismo neuroprotector pueda ser potenciado en regiones cerebrales vulnerables a insultos excitotóxicos asociados a patologías como la epilepsia, isquemia y accidentes vasculares.

SUMMARY.

CHARACTERIZATION OF A NEUROPROTECTIVE PATHWAY MEDIATED BY THE NEUROTROPHIN BDNF AND NITRIC OXIDE

Homeostatic plasticity maintains neuronal and synaptic activity within physiological limits. In primary neuronal cultures, such compensatory changes are induced by long-term (48 hours) pharmacological perturbations in network activity. For example, when cultures are incubated with Bicuculline, that blocks inhibitory (GABAergic) neurotransmission, network activity increases.

Compensatory changes include inhibition of excitatory neurotransmission, that is mediated by the neurotransmitter L-glutamate. At glutamatergic synapses, postsynaptic receptors are mainly cationic ionic channels and several classes exist based on differential pharmacological profiles. The NMDA-type glutamate receptor is permeable to sodium, potassium and calcium. It has been proposed that the NMDA receptor can be inhibited in a homeostatic manner by nitric oxide (NO) following periods of elevated activity, thereby inducing neuroprotection. NO modifies NMDA receptor activity by S-nitrosylation of relevant cysteine residues.

However, NO has also proposed to be neurotoxic. In the hippocampus, NMDA receptor overstimulation activates nitric oxide synthase, that is calcium dependent, NO synthesis and neuronal death by excitotoxicity. It has been reported that brain regions are differentially sensitive to excitotoxicity, and the hippocampus is one of such a highly vulnerable region.

To unravel controversial effects of NO, in our laboratory viability experiments were carried out in neuronal cultures incubated with NMDA. Both hippocampal and cortical cultures were used, and sustained activity elevation was induced by 48 hour incubations with bicuculline.

Following an excitotoxic challenge with NMDA, we found that cortical neurons were more resistant than hippocampal neurons, in which cell survival was of 72.93 ± 4.75 y $71.17 \pm 2.81\%$ in control and bicuculline-stimulated cultures, respectively. The enhanced survival of cortical neurons depended on NO, the neurotrophin BDNF and its receptor TrkB. However, in hippocampal neurons NO toxicity was confirmed and the presence of BDNF had no effect on viability. Based on these results, the hypothesis of this thesis work is as follows: BDNF through its receptor TrkB induces NO synthesis leading to homeostatic modulation of NMDA receptor in cortical but not hippocampal neurons. This pathway is not dependent on TrkB receptor phosphorylation at residue Y515.

We found that BDNF is able to induce NO synthesis in cortical neurons, but not in hippocampal ones. In addition, NO inhibits NMDA receptor mediated calcium influxes in cortical, but not hippocampal neurons. This neuroprotective pathway could not be detected in hippocampal neurons, in which NO was synthesized mainly in response to NMDA, and did not lead to inhibition of calcium influxes.

This work shows that BDNF has a neuroprotective role in response to an excitotoxic challenge in cortical but not hippocampal neurons that is mediated by NO. In conclusion, opposing biological roles of NO depend on the signaling pathway involved in its synthesis. It is possible that this neuroprotective pathway can be potentiated in vulnerable brain regions in which excitotoxicity is associated to hypoxic-ischemic pathologies such as epilepsy and vascular accidents.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Plasticidad homeostática.

Las neuronas son célula del sistema nervioso central (SNC) cuya función es recibir, integrar y transmitir información. Las neuronas están organizadas en circuitos que conectan las estructuras del SNC, o que conectan la periferia con el SNC (Kandel 2000). La información en una neurona se transmite unidireccionalmente a lo largo de los axones neuronales en forma de señales eléctricas llamadas potenciales de acción, los cuales alcanzan las terminaciones axonales. En la terminación axonal, la llegada del potencial de acción causa liberación de sustancias químicas llamadas neurotransmisores. Éstos actúan sobre la neurona contactada por la terminación axonal. Los sitios de conexión entre neuronas individuales son las sinapsis (Kandel 2000; Rizzoli and Betz 2005). Los neurotransmisores interactúan con receptores en la membrana postsináptica que inducen cambios en el potencial eléctrico de membrana. Dependiendo del efecto sobre el potencial de membrana, que puede ser depolarizante o hiperpolarizante, las sinapsis son excitadoras o inhibitoras, respectivamente. Las neuronas de proyección (que conectan estructuras cerebrales) son generalmente excitadoras y usan mayoritariamente el neurotransmisor L-glutamato (Orrego and Villanueva 1993). En cambio, las interneuronas, que modulan la actividad de estas neuronas, son inhibitoras y usan mayoritariamente el neurotransmisor GABA (por ácido gamma-aminobutírico) (Mody *et al.* 1994).

Las neuronas responden o se adaptan a los estímulos externos o internos mediante cambios plásticos, estos cambios pueden afectar desde las propiedades excitables de la membrana plasmática hasta la transcripción génica, regulación de citoesqueleto, modificaciones de la fuerza sináptica y cambios morfológicos (Alvarez and Sabatini 2007; Malenka and Bear 2004; West *et al.* 2002). La plasticidad homeostática es una forma de plasticidad que tiende a mantener la actividad neuronal dentro de límites fisiológicos. Así, las neuronas se adaptan a períodos de alta o baja actividad y se previenen estados patológicos. A pesar de que la plasticidad

homeostática ha sido conceptualmente reconocida como un mecanismo esencial para mantener la actividad neuronal en rangos fisiológicos (Turrigiano and Nelson 2004), los mecanismos celulares subyacentes son escasamente conocidos. Por ejemplo, después de un daño al sistema nervioso que causa silenciamiento neuronal, o después de privación sensorial, las neuronas recuperan su actividad gracias a mecanismos homeostáticos (Desai 2003; Turrigiano and Nelson 2004). Similarmente, en un cerebro sometido a actividad aumentada (como en la epilepsia), se desencadenan mecanismos tendientes a frenar el exceso de actividad.

Como en todos los sistemas fisiológicos, los mecanismos homeostáticos representan una retroalimentación negativa y son de signo contrario al estímulo inductor. Así, un aumento de actividad sostenida en el tiempo induce un debilitamiento de las sinapsis excitadoras y una disminución de la excitabilidad neuronal, mientras que una disminución sostenida de actividad induce un fortalecimiento sináptico y aumento de la excitabilidad neuronal (Perez-Otano and Ehlers 2005; Turrigiano and Nelson 2004). La manipulación de los niveles globales de actividad en un sistema experimental, como en neuronas disociadas, se puede obtener mediante el uso de fármacos, como tetrodotoxina (TTX), un bloqueador de canales de sodio dependientes de potencial, que tiene como fin bloquear los potenciales de acción o mediante bicuculina (BIC), un antagonista GABAérgico. Con BIC, se bloquea la actividad inhibitoria de un circuito con lo cual la actividad excitadora se exagera por falta de "freno". La plasticidad homeostática ha sido estudiada a nivel de membrana neuronal, en que cambia la presencia de conductancias iónicas, y a nivel sináptico (Turrigiano *et al.* 1998).

Una de las primeras evidencias de la existencia de plasticidad homeostática se obtuvo en neuronas corticales en cultivo (Figura 1), en donde se observó que al perturbar la actividad del circuito neuronal se generaban estos cambios compensatorios que permitieron ajustar la actividad neuronal en la dirección contraria al estímulo inductor (Turrigiano *et al.* 1998). Este fenómeno se observa a un nivel global, en todas las neuronas del cultivo, de esta manera, los circuitos mantienen

estabilidad y se evita hipo- o hiperactividad (Turrigiano 2008; Turrigiano and Nelson 2004).

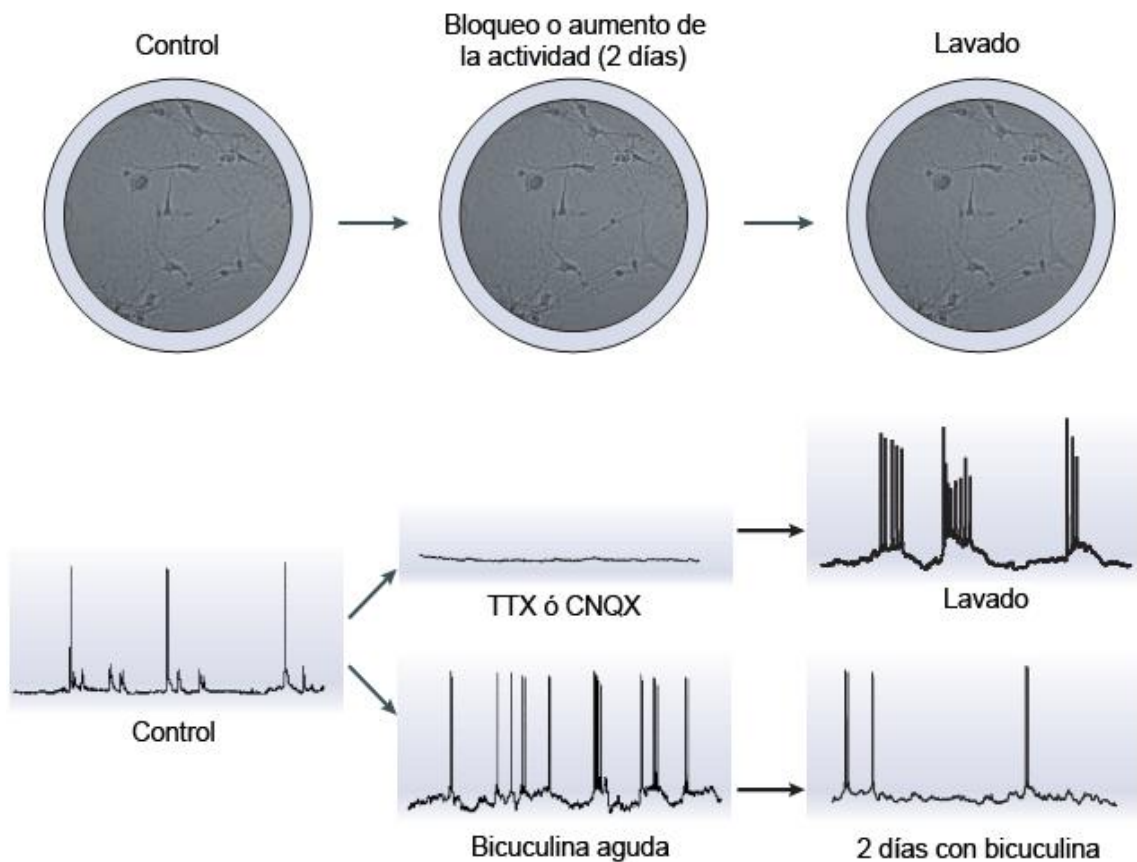


Figura N°1: Evidencia de ajuste de tasa de disparos de potenciales de acción en cultivos neuronales. Se muestra un cultivo primario de neuronas corticales que está compuesto por un red interconectada de neuronas piramidales excitatorias y de interneuronas inhibitorias, las que desarrollan actividad espontánea a los pocos días *in vitro* (control). Al inhibir las descargas neuronales por un bloqueador de los canales de sodio como tetrodotoxina (TTX) o 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), se bloquea la actividad en forma aguda (panel central). Si después de dos días de incubación se retira el fármaco, se pudo apreciar un aumento en la tasa de disparo comparado con la situación control. Es decir, aumentó la excitabilidad del sistema para contrarrestar el bloqueo farmacológico. En cambio, al agregar un agente que aumenta la actividad neuronal como bicuculina (BIC), que es un inhibidor de los receptores inhibitorios GABAérgicos, por dos días y luego se retirada del medio, se observa una disminución en la tasa de disparo comparado con la situación control. Esquema tomado de Turrigiano and Nelson 2004.

El fenómeno de adaptación homeostática a nivel sináptico se ha denominado escalamiento sináptico. Un ejemplo de este fenómeno se muestra en la Figura 2, en que se midieron corrientes sinápticas excitadoras en miniatura (mEPSC). Se observa que al agregar un agente que aumenta la actividad como BIC (inhibidor del receptor GABA-A), disminuyen las corrientes mientras que un bloqueador de la actividad como TTX induce un aumento en estas corrientes.

De esta manera, cuando hay un aumento en la actividad neuronal global se reduce la amplitud de la mEPSC, mientras que una disminución en la actividad tiene un efecto opuesto. Estas evidencias muestran que las corrientes iónicas a través de los canales iónicos de la membrana sináptica y extrasináptica son reguladas en una manera homeostática por cambios prolongados en la actividad (Turrigiano 2008; Turrigiano and Nelson 2004; Watt *et al.* 2000). En el caso de las sinapsis, los canales iónicos más abundantes ahí presentes son los receptores para el neurotransmisor, mientras que en la membrana extrasináptica, la excitabilidad depende principalmente de conductancias de sodio, potasio y de Ca^{2+} sensibles a potencial.

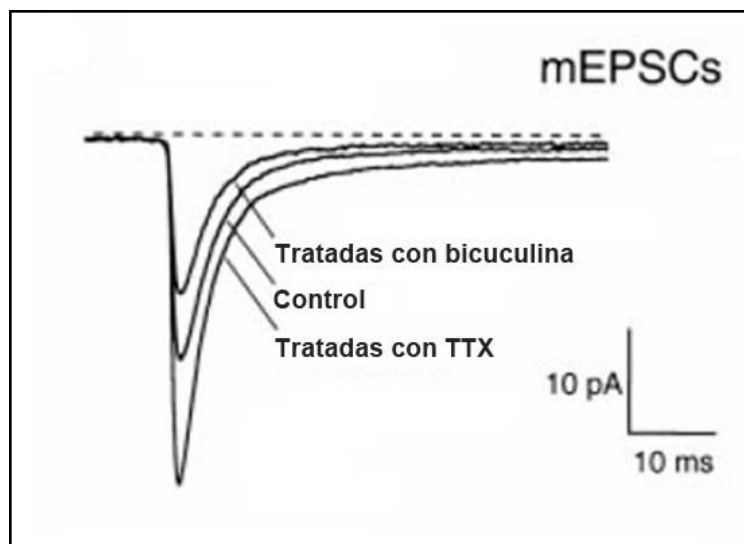


Figura N°2: Efectos de un bloqueo o aumento de la actividad sobre las mEPSCs. Cuando se tratan células con un bloqueador de la actividad como TTX, se observa un aumento en las corrientes comparadas con el control. En cambio, cuando se tratan células con un agente que aumenta la actividad como BIC, se observa una disminución en las corrientes. Esquema tomado de Turrigiano, et al. 1998

1.2.- Mecanismos de plasticidad homeostática.

Si bien no se conocen en profundidad los mecanismos que explican cómo las neuronas realizan este proceso de retroalimentación negativa, por ejemplo en las sinapsis, las evidencias muestran que los cambios ocurrirían a varios niveles, como en el agrupamiento de receptores postsinápticos, liberación o recaptación del neurotransmisor a nivel presináptico o en el número de sinapsis funcionales (Turrigiano and Nelson 2004).

Las evidencias más sólidas que se han encontrado son los cambios en la cantidad y el agrupamiento en los receptores postsinápticos para L-glutamato. Estos receptores son muy dinámicos y se movilizan desde y hacia sitios sinápticos. Por ejemplo, con un bloqueo crónico de la actividad se produce inserción de receptores en la membrana postsináptica incrementando la fuerza de la transmisión sináptica excitatoria y en consecuencia, la tasa de disparo de potenciales de acción llevándola a niveles normales (Turrigiano 2008; Turrigiano and Nelson 2004).

Recientemente, se ha descrito que el factor necrótico tumoral (TNF- α) media la plasticidad homeostática inducida por bloqueo de actividad (Pozo and Goda 2010; Turrigiano 2008). Al respecto, una de las primeras moléculas que se identificó como mediador de plasticidad homeostática fue el factor neurotrófico derivado de cerebro BDNF (por brain-derived neurotrophic factor) (Desai *et al.* 1999; Swanwick *et al.* 2006). En esta tesis, nos centraremos en el papel de BDNF como mediador de plasticidad homeostática frente a períodos de actividad elevada.

1.3.- BDNF y su receptor TrkB.

El BDNF pertenece a la familia de las neurotrofinas, factores tróficos que son esenciales durante el desarrollo del SNC, pues regulan el crecimiento y supervivencia neuronal. Además de sus efectos clásicos en supervivencia neuronal, las neurotrofinas también pueden regular crecimiento axonal y dendrítico, número de sinapsis y su estructura, liberación de neurotransmisores y plasticidad sináptica en el SNC adulto

(Chao 2003). El BDNF es una glicoproteína liberada en las sinapsis y se distribuye ampliamente en todo el SNC, detectándose en múltiples regiones cerebrales como la neocorteza, amígdala, tálamo, hipotálamo, glándula pituitaria y sustancia nigra (Ohira and Hayashi 2009). Todas las neurotrofinas, es decir, BDNF, NGF, NT-3 y NT-4/5 se unen como dímeros a sus receptores. Entre los receptores podemos encontrar dos tipos: El receptor p75 que interactúa con todas las neurotrofinas con afinidad similar mientras que la familia de receptores Trk (por tropomyosin related kinase) son selectivos para determinadas neurotrofinas. Así, NGF se une preferencialmente a TrkA; BDNF y neurotrofina 4 (NT4) a TrkB; y neurotrofina 3 (NT3) a TrkC (Binder *et al.* 2001; Chao 2003; Reichardt 2006).

BDNF es liberado en forma dependiente de la actividad sináptica (Chao 2003; Ohira and Hayashi 2009), de manera que una actividad elevada lleva a un aumento en la liberación de BDNF. Su receptor TrkB está ampliamente distribuido en el SNC y está presente tanto en terminaciones axonales como en la membrana postsináptica (Altar *et al.* 1994). En las sinapsis, se ha visto que BDNF cumple un papel importante en la plasticidad sináptica y puede directamente aumentar la frecuencia de disparo de potenciales de acción (Hu and Russek 2008; Kafitz *et al.* 1999).

1.4.- Vías de señalización mediadas por TrkB.

La unión del BDNF a su receptor TrkB, tiene como consecuencia su dimerización, resultando en la trans-autofosforilación de residuos de tirosinas. La fosforilación en un dominio autoregulatorio aumenta su actividad enzimática, mientras que la fosforilación de otros residuos crea sitios de anclaje para proteínas adaptadoras que acoplan al receptor a cascadas de señalización intracelular (Hu and Russek 2008; Reichardt 2006; Yoshii and Constantine-Paton 2010).

Así, la fosforilación en el residuo tirosina 816 (p-Y816) de TrkB produce activación de la PLC γ , la que a su vez hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, generando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC) y el IP3 se une a su receptor en el retículo endoplásmico,

gatillando la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Matsumoto *et al.* 2001; Minichiello *et al.* 2002; Reichardt 2006; Yoshii and Constantine-Paton 2010). En cambio, la fosforilación de la tirosina 515 (p-Y515), produce el reclutamiento y fosforilación de la proteína Shc. A su vez la proteína Shc interacciona con la proteína adaptadora Grb2 que recluta y activa el factor intercambiador de nucleótidos de guanina SOS. SOS promueve la remoción del GDP de la proteína Ras que ahora puede unir GTP y activar kinasas río abajo como B-raf y en consecuencia, MEK y MAPK/Erk. El reclutamiento de Shc al receptor TrkB también permite la activación de PI3K por Ras, vía la proteína adaptadora Grb2. La activación de PI3K cambia la composición lipídica resultando en la translocación de Akt/proteína quinasa B a la membrana plasmática (Chen *et al.* 2007; Reichardt 2006; Tong *et al.* 2004; Yoshii and Constantine-Paton 2010).

Por medio de todas estas vías, BDNF regula la expresión génica de distintos genes blanco, modulando por lo tanto la función neuronal y el balance entre la excitación e inhibición en el sistema nervioso. Su disfunción contribuiría al desarrollo de enfermedades neurológicas (Hu and Russek 2008).

1.5.- Neurotransmisión excitadora y receptores para glutamato.

La transmisión sináptica excitadora (mediada por el neurotransmisor L-glutamato) se realiza desde terminales axónicos hacia espinas dendríticas en donde se observa una especialización del citoesqueleto subyacente a la membrana postsináptica llamada densidad postsináptica (DPS). Acá se encuentran proteínas y moléculas involucradas en la generación del potencial sináptico excitador y en la transducción de la señal sináptica (Sheng and Hoogenraad 2007; Ziff 1997). En la DPS existen dos tipos de receptores para L-glutamato, los receptores ionotrópicos que son canales iónicos activados por ligando (Madden 2002) y los receptores metabotrópicos acoplados a proteína G, que transducen la señal a través de segundos mensajeros (Schoepp *et al.* 1990). Los receptores ionotrópicos se clasifican a su vez en tres subtipos, dependiendo del agonista farmacológico por el cual sean afines. Tenemos

receptores de tipo NMDA (R-NMDA) que son activados por ácido N-metil D-aspartico, receptores AMPA (R-AMPA) que son activados por ácido α -animo-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico y el receptores de kainato (R-KA), que son activados por ácido kaínico (Madden 2002; Michaelis 1998; Sheng and Hoogenraad 2007). Nos centraremos a continuación en los R-NMDA, los cuales tienen la particularidad de conducir Ca^{2+} .

1.6.- Receptor de glutamato de tipo NMDA como mecanismos homeostático.

El R-NMDA es un canal catiónico no selectivo, permeable a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} que aparte de L-glutamato para su activación requiere como co-agonista a glicina. Su característica distintiva es su permeabilidad al Ca^{2+} . Por otra parte, el R-NMDA es bloqueado en el potencial de reposo por ión magnesio (Mg^{2+}) extracelular. Cuando la membrana se depolariza, se libera el Mg^{2+} del canal iónico. Una vez desbloqueado el canal por depolarización, L-glutamato presente en el espacio sináptico es capaz de abrir el canal iónico y permitir el influjo de Ca^{2+} (Cull-Candy *et al.* 2001; Kohr 2006). Durante períodos de actividad elevada, el Ca^{2+} que ingresa por el R-NMDA puede ser tóxico para la célula.

El R-NMDA es un tetrámero compuesto por dos subunidades NR1 y dos subunidades NR2. NR1 proviene de un gen, mientras NR2 proviene de cuatro genes (A, B, C y D). Las subunidades de NR1 contienen el sitio de glicina, en donde se une el co-agonista endógeno D-serina y las subunidades NR2 contienen el sitio de unión para el agonista L-glutamato (Kohr 2006). La subunidad NR2B (NR2D) es la más abundante en los primeros estadios de desarrollo, y las subunidades NR2A Y NR2C son las que aumentan en el estado adulto y desplazan a NR2B. En el SNC adulto, NR2A es expresado en forma ubicua, mientras que NR2B se restringe al telencéfalo y NR2C está altamente enriquecido en el cerebelo (Kohr 2006).

Las subunidades NR2 que componen al receptor pueden originar receptores diheteroméricos (ej: NR1/NR2B) o triheteroméricos (ej: NR1/NR2B/NR2A) (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004). El ingreso masivo de Ca^{2+} por los R-NMDA, que se produce

durante períodos de actividad elevada lleva a la muerte celular por necrosis y apoptosis. Este fenómeno se denomina excitotoxicidad. (Sattler and Tymianski 2001). Una forma de atenuar los efectos citotóxicos es mediante la modulación negativa del R-NMDA. Se ha visto que uno de estos moduladores sería el óxido nítrico (NO), el cual es producido por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Calabrese *et al.* 2007).

1.7.- Óxido nítrico sintasa (NOS).

Se han identificado 3 isoformas de la NOS: La NOS neuronal (nNOS o NOS tipo I), la NOS endotelial (eNOS o NOS tipo III) y la NOS inducible (iNOS o NOS tipo II), de las cuales nNOS y eNOS son expresadas constitutivamente (Calabrese *et al.* 2007). Estructuralmente las NOS exhiben una estructura bidominio, en la cual su dominio oxigenasa ubicado en el N-terminal contienen sitios de unión para hem, BH4 y L-arginina, su dominio reductasa en el C-terminal contiene sitios de unión para FAD, FMN y NADPH. Ambos dominios están conectados por un sitio de unión a calmodulina (CaM) (Alderton *et al.* 2001). En presencia de oxígeno todas las isoformas de NOS catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina más óxido nítrico (NO), utilizando como cofactor tetrahidrobiopterina, mononucleótidos de flavina y dinucleótidos de flavina adenina y como dador de electrones a NADPH (Alderton *et al.* 2001; Bredt and Snyder 1992; Dawson and Snyder 1994).

Específicamente la enzima nNOS se encuentra ampliamente distribuida en el tejido neuronal y en mayor abundancia en corteza cerebral, núcleo ventral endopiriforme, el claustrum, el bulbo olfatorio, el estriatum, la amígdala, el hipocampo (principalmente región CA1 y giro dentado), el hipotálamo, el tálamo, el cerebelo, entre otros. También se ha encontrado en astrocitos y vasos sanguíneos cerebrales así como en neuronas periféricas (Calabrese *et al.* 2007; Dawson and Snyder 1994).

En la membrana postsináptica, el R-NMDA está anclado a la proteína de andamio PSD-95 (por Post-Synaptic-Density 95). PSD-95 a su vez interactúa con la nNOS. Cuando se activa el R-NMDA por el neurotransmisor L-glutamato, hay influjos de Ca^{2+} a través del receptor, aumentando por consecuencia los niveles intracelulares

de Ca^{2+} y este Ca^{2+} se une a la calmodulina (CaM), luego Ca^{2+} -calmodulina, se une a la nNOS, permitiendo su activación (Baranano *et al.* 2001; Dawson and Snyder 1994). De esta manera, el influjo de Ca^{2+} a través del R-NMDA se acopla directamente a la activación de nNOS y producción de NO (Brenman and Bredt 1997; Garthwaite and Boulton 1995).

1.8.- Vías de producción de NO.

Se ha descrito más de una vía que llevaría a la síntesis de NO. Por una parte, la vía recién descrita es la mejor caracterizada. Otra vía de inducir síntesis de NO es a través de la neurotrofina BDNF y su receptor TrkB (Nott *et al.* 2008). TrkB, al movilizar Ca^{2+} a través de la activación de la PLC_γ , estimularía a la NOS (Riccio *et al.* 2006).

El NO, que es un gas difusible, puede ser utilizado en la misma neurona postsináptica, en la neurona presináptica o en células de la vecindad que incluyen a otras neuronas o astrocitos. Aquí, interactúa con la guanilato ciclasa soluble (GCs) estimulando su actividad enzimática, lo que tiene como consecuencia aumentos intracelulares de GMP cíclico (Baranano *et al.* 2001; Patel *et al.* 2001). El GMPc a su vez activa a la proteína quinasa G (PKG) que activa las vías Akt y CREB. A través de estas vías, NO ejerce una serie de efectos que incluyen plasticidad sináptica, relajación del músculo liso, neurosecreción y neurotransmisión (Calabrese *et al.* 2007). El NO también puede interactuar con el anión superóxido y generar otros radicales libres como el peroxinitrito lo que lleva a nitración de proteínas por modificación de residuos tirosina. Otra vía de transducción del NO es la modificación de residuos cisteína en proteínas, reacción que se conoce con el nombre de S-nitrosilación (Baranano *et al.* 2001).

1.9.- Efectos protectores *versus* tóxicos del NO.

Los efectos del NO en el SNC pueden ser tanto neuroprotectores como neurotóxicos (Figura 3). En general, se acepta en la literatura que estos efectos dependen de los niveles de NO alcanzados, siendo tóxicos los niveles altos y protectores los niveles bajos.

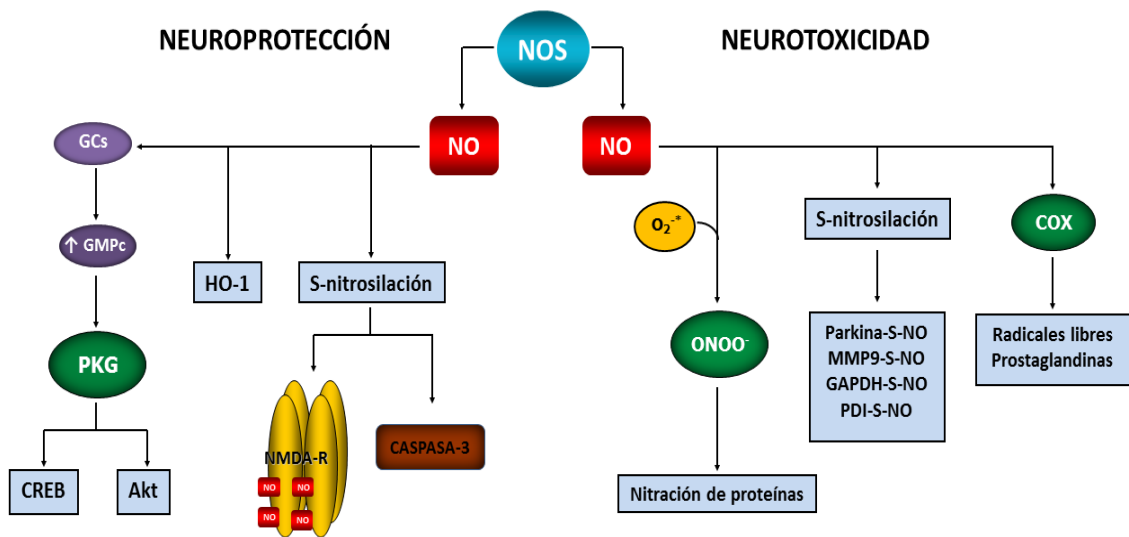


Figura N°3. Efectos opuestos del NO en el sistema nervioso central. Se han visto efectos antagónicos del NO, por un lado los efectos neuroprotectores involucran S-nitrosilación de las subunidades del R-NMDA y de caspasa-3, también activación de vías de supervivencia como CREB y Akt, así como aumento en la expresión de hem oxigenasa 1 (HO-1), induciendo cambios en la estabilidad del mRNA. Los efectos neurotóxicos involucran S-nitrosilación de otras proteínas. Cuando hay estrés oxidativo con producción de anión superóxido, éste reacciona con el NO formando peroxinitrito, que lleva a la nitración de proteínas. El NO también activa la COX que lleva a la producción de radicales libres y prostaglandinas las cuales tienen fuertes propiedades proinflamatorias.

Los mecanismos de neurotoxicidad son mediados por S-nitrosilación de proteínas. Alternativamente, si la célula se encuentra en un estado pro-oxidante, NO reacciona con especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido llevando a la producción de peroxinitrito, que se caracteriza por ser una molécula altamente oxidante, produciendo nitración de proteínas. Otro mecanismo neurotóxico se induce por activación de ciclooxigenasas (COXs), que durante su ciclo catalítico liberan radicales libres y generan prostaglandinas, induciendo neuroinflamación. Los

mecanismos neuroprotectores principalmente están mediados por la activación de vías de supervivencia (Akt y CREB) y por S-nitrosilación, tanto de las subunidades del R-NMDA disminuyendo la excitotoxicidad por entrada masiva de Ca^{2+} como de caspasa 3, disminuyendo su actividad (Calabrese *et al.* 2007; Hara and Snyder 2007).

1.10.- S-nitrosilación del R-NMDA como mecanismo homeostático frente a actividad neuronal elevada.

El R-NMDA puede sufrir modificaciones post-traduccionales que modulan su actividad de canal iónico. Así, el R-NMDA es inhibido por medio de la S-nitrosilación, (Lipton *et al.* 2002), siendo la cisteína 399 en la subunidad NR2A principalmente responsable del efecto inhibitorio (Choi *et al.* 2000). Esta modulación negativa del R-NMDA podría inhibir la excesiva activación del R-NMDA en situaciones de actividad elevada, limitando así el Influxo de Ca^{2+} y aminorando excitotoxicidad (Lipton *et al.* 2002; Stamler *et al.* 2001).

Se ha visto que la excitotoxicidad afecta pronunciadamente a ciertas estructuras cerebrales que son más vulnerables a este tipo de daño (Wang *et al.* 2009). Entre las estructuras vulnerables se encuentra el hipocampo. La excitotoxicidad en el hipocampo está mediada principalmente por NO (Calabrese *et al.* 2007; Hara and Snyder 2007). De hecho, se mostró que al impedir la interacción entre PSD-95 y el R-NMDA, se protegen las neuronas de la excitotoxicidad tanto en cultivo como en animales (Aarts *et al.* 2002). A pesar de la reconocida toxicidad de NO en el hipocampo, se ha reportado que NO puede ser neuroprotector en neuronas corticales, en donde BDNF estimula su síntesis, induciendo la S-nitrosilación de histonas y activando factores transcripcionales (Nott *et al.* 2008; Riccio *et al.* 2006; Sen *et al.* 2009).

1.11.- Datos del laboratorio.

Para resolver la controversia entre posibles efectos neuroprotectores versus neurotóxicos de BDNF y NO en diferentes tipos celulares, en nuestro laboratorio se realizaron ensayos de viabilidad celular en respuesta a NMDA (Figura 4).

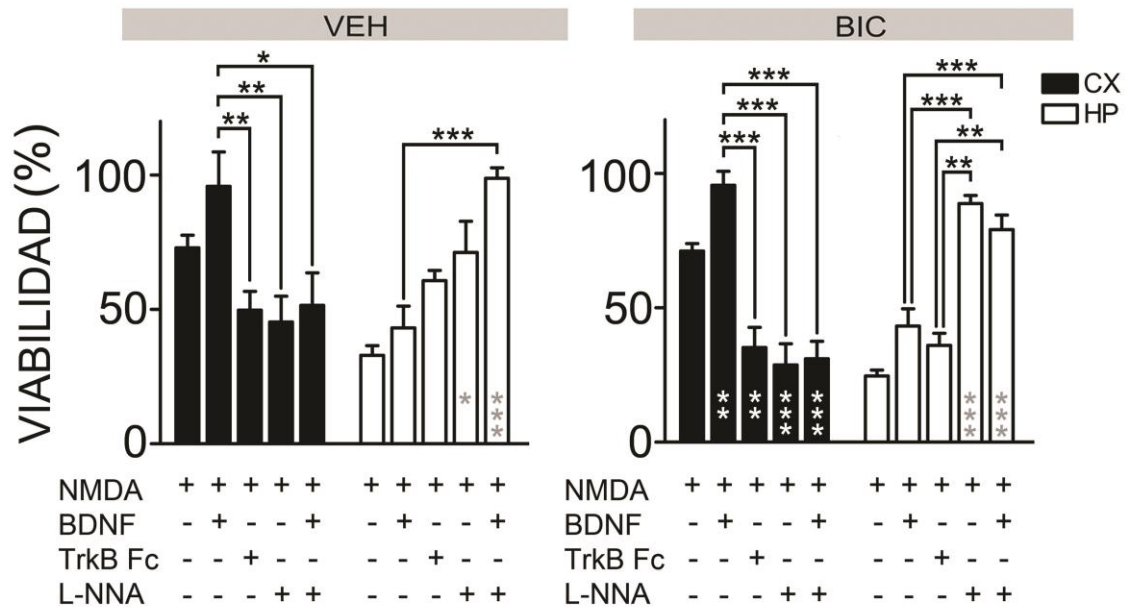


Figura N°4. Modulación diferencial de la viabilidad celular en respuesta a NMDA. Los cultivos neuronales fueron tratadas con VEH (izquierda) o con BIC 10 μ M (derecha) por 48 horas para elevar la actividad. Luego, se incubaron con 30 μ M de NMDA por 1 hora, en presencia de los fármacos correspondientes (BDNF, TrkB-Fc: atrapador del BDNF; L-NNA: inhibidor de NOS). Luego se cambió a medio fresco y a las 24 horas se calculó el porcentaje de viabilidad celular con el test de exclusión de azul de tripán. Las barras negras corresponden a células corticales y las blancas a células hipocámpales. Los símbolos dentro de las barras indican significancia comparada con NMDA (primera barra en cada caso). Las llaves indican significancia estadística entre las barras que se indican. La prueba estadística utilizada fue ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Se encontró que las neuronas corticales son más resistentes al daño excitotóxico comparado con neuronas hipocámpales. Esta mayor sobrevivencia en cultivos corticales depende de NO y BDNF, pues al inhibir a la NOS (con L-NNA) o retirar el

BDNF del medio de cultivo (con TrkB-Fc) se ve una notable disminución de la viabilidad. Al contrario, y de acuerdo con la literatura, al inhibir la NOS en cultivos hipocampales aumenta muy significativamente la viabilidad celular. Este ensayo muestra un papel opuesto para NO que actúa como protector en cultivos corticales junto a BDNF, y tóxico en cultivos hipocampales. Sin embargo, se desconoce si ambos mediadores convergen sobre vías intracelulares anti-apoptóticas o si forman parte, secuencialmente, de una misma vía. En este caso, BDNF debería ser capaz de inducir síntesis de NO.

De acuerdo a lo expuesto, en esta memoria de título se postula la siguiente hipótesis:

2.- HIPÓTESIS.

BDNF, a través de su receptor TrkB, induce síntesis de NO lo que lleva a modulación homeostática del receptor de NMDA en neuronas corticales pero no hipocampales. Esta vía no depende de la fosforilación del receptor TrkB en el residuo Y515.

3.- OBJETIVOS.

1. Evaluar si BDNF es capaz de estimular la producción de NO en neuronas de corteza e hipocampo.
2. Evaluar la participación de la actividad tirosina quinasa de TrkB en la generación de NO.
3. Evaluar la producción de NO en respuesta a NMDA en neuronas de corteza e hipocampo.
4. Evaluar la función del R NMDA en neuronas corticales e hipocampales incubadas en presencia de moduladores de la vía BDNF/TrkB/NOS
5. Evaluar el estado de activación de TrkB en cultivos neuronales mediante inmunodetección de su residuo de tirosina Y515 fosforilado (p-tyr515).

4.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.- MATERIALES:

4.1.1.- Reactivos.

MEM (Minimum Essential Medium GIBCO® Cell Culture, Cat. N°: 11900-024), Neurobasal (GIBCO®, Cat. N°: 21103-049) y B-27 (GIBCO®, Cat. N°: 17504-044) se obtuvieron de Invitrogen Corporation (USA); Suero equino (Equine Serum,) se obtuvo de HyQ Hyclone (Cat. N°: SH30074.03. Utah, USA); Azul de tripán (Cat. N°: T6146), Poli-L-lisina (Cat. N°: P8920), L-glutamina (Cat. N°: G3126St) y Paraformaldehído se obtuvieron de Sigma®, (Louis, Mo, USA); el antibiótico Penicilina-Estreptomicina se obtuvo de HyQ, Hyclone (Cat. N°: SV30010. Utah, USA).

4.1.2.- Sondas para medir fluorescencia.

3-amino,4-aminoetil-2',7'-difluoresceína (DAF-fm) se consiguió de Calbiochem, (Cat. N°: 251520. San Diego, CA, USA) y Fura-2 acetoximetilester (Fura-2-AM) se obtuvo de Molecular Probes (Cat. N°: F-1225).

4.1.3.- Fármacos e inhibidores.

BDNF recombinante (Cat. N°: B-250) y K252a (Cat. N°: K-150), un inhibidor de la fosforilación del receptor Trk, se obtuvieron en Alomone Labs (Jerusalem, Israel). De Tocris Bioscience (Bristol, UK) se obtuvo ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (Cat. N°: 0114) y tetrodotoxina (TTX) (Cat. N°: 1069). S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), un dador de óxido nítrico, se obtuvo en Calbiochem (Cat. N°487910. San Diego, CA, USA.). El antagonista de receptores no-NMDA, 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), se compró en RBI (Natick, MA, USA), que inhibe los canales de glutamato no NMDA; La proteína de fusión TrkB-Fc, compuesta por el dominio extracelular del receptor TrkB unido a la cadena pesada de IgG (TrkB-Fc) se obtuvo en R&D Systems (Cat. N°: 688-TK. Minneapolis, MN). El inhibidor del receptor GABA-A BIC se

consiguió de Sigma® (Cat. N°: B-9130. St. Louis, Mo, USA) y el DMSO (Dimetilsulfóxido), se obtuvo de Calbiochem ® (Cat. N°: 317275. San Diego, CA, USA).

4.1.4.- ANTICUERPOS:

Anticuerpos primarios.

Anti-TrkB phospho Y515 rabbit 1/100 de Abcam (Cat. N°: ab74841. Cambridge, UK), anti-PSD95 mouse 1/750 de UC Davis/NIH NeuroMab Facility (Cat. N°: 75-028. Davis CA, EEUU).

Anticuerpos secundarios.

Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit 1/1000 (Cat. N°: A11034), Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Mouse 1/1000 (Cat. N°: A31570), de Invitrogen Corporation, (Molecular Probes, EEUU).

4.2.- MÉTODOS.

4.2.1.- Cultivo celular primario.

Las células de los cultivos primarios fueron obtenidas de telencéfalo de embriones de ratas Sprague Dawley de 18 días de gestación (E18). Las ratas preñadas fueron anestesiadas con éter etílico antes de la intervención. Se extraen los cuernos uterinos, obteniéndose en promedio unos 10 ± 2 embriones por rata. Los embriones se depositan en una cápsula Petri que contiene solución Hanks (137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,8 mM Mg SO₄; 0,8 mM Na₂HPO₄; 0,4 mM KH₂PO₄; 1,5 mM CaCl₂; 4,2 mM NaHCO₃; 5,5 mM glucosa; ajustada a pH 7,4 con NaOH) estéril y fría (en hielo). A partir de este momento, todo el procedimiento se realiza en hielo. Los embriones se decapitan y se deposita la cabeza del embrión en una nueva placa con Hanks fresco. Se extrae el cerebro y se separan el hipocampo y corteza cerebral

bajo lupa, descartando los cerebros que hayan sufrido daño durante el proceso de extracción. Los tejidos son lavados 10 veces con solución Hanks estéril y sometidos a disgregación enzimática incubando por 15 minutos con Tripsina/EDTA 2,5%, a 37 ° C, sin agitación. Luego los tejidos se lavan cuatro veces con Medio Mínimo Esencial (MEM, Minimum Essential Medium) con 10% de suero equino. Los tejidos se depositan en tubos Falcon estériles de 15 ml con 2 ml de MEM y se disgregan con pipetas de vidrio de dos diferentes diámetros (para hipocampo) o tres diámetros (para corteza), comenzando por el mayor. Las células y tejidos no disgregados decantan mediante centrifugación corta (segundos). El sobrenadante se traslada a un segundo tubo Falcon para repetir disgregación del pellet. Se obtienen en promedio 2,5 ml de sobrenadante de hipocampo con 1 a 1,5 millón de células/ml, mientras que de corteza se obtienen aproximadamente 4 ml con 3,5 a 4,0 millones de células/ml. Se homogenizan las suspensiones celulares y se toma una alícuota de 40 µl a los cuales se les agrega 10 µl de solución de azul de tripán (0,81 % p/v NaCl; 0,06 % p/v KHPO₄; 0,4 % p/v Azul de Tripán), para su conteo en cámara de Neubauer y posteriormente sembrar en placas estériles cubiertas de poli-L-lisina (preparadas el día anterior con poli-L-lisina 0,01 % p/v Hidrobromuro). Se siembran 3x10⁵ células en placas de 35 mm para los experimentos de medición de Ca²⁺ y NO; 1x10⁴ células en los cubreobjetos de vidrio para inmunocitoquímica. Se agregan 400 µl de MEM a cada pocillo en placas de 24 pocillos y 900 µl en placas de 35 mm y se pre-equilibra en la incubadora de CO₂ por al menos una hora antes de sembrar. Una vez efectuada la siembra, las placas son guardadas en incubadora de CO₂ al 5% y 37 °C.

Para las células sembradas en placas de 24 pocillos: una hora después, se retira todo el medio MEM y se reemplaza por medio Neurobasal suplementado con B-27 al 2% v/v; 0,5 mM de L-glutamina; antibiótico, Penicilina-Estreptomicina 1 % v/v (10.000 µg/ml) (Brewer *et al.* 1993). En el caso de las células sembradas en los pocillos de 35 mm se realiza el cambio de medio a las 24 horas. Los cultivos se alimentan cada 2 a 3 días retirando el 20% del medio de cultivo y reponiéndolo por una cantidad igual de medio Neurobasal/B27 fresco. Los cultivos se dejaron crecer hasta un máximo de

14 días, lo que corresponde a neuronas adultas, en el estadio 5 del desarrollo (Santos Da Silva *et al.* 2004).

4.2.2.- Estimulación de circuitos neuronales con BIC 10 μ M por dos días.

Luego de 12 días *in Vitro* (12 DIV) se estimularon los cultivos neuronales por 48 horas con el antagonista del receptor GABA-A BIC a una concentración final de 10 μ M, para establecer una condición de hiperactividad neuronal *in vitro*. El vehículo de la *bicuculina* es DMSO. Tanto controles como BIC 10 μ M tienen una dilución final de DMSO de 1/2000.

4.2.3.- Imágenes de fluorescencia.

Para las mediciones de fluorescencia se utilizó el microscopio de epifluorescencia Eclipse E400 con un objetivo de inmersión en agua FluorX40 (Nikon Corporation), equipado con un intercambiador de filtros ópticos Sutter Lambda 10-2. La emisión de la fluorescencia fue registrada con una cámara digital CCD *Retiga 2000R Fast 1394 (QImaging)* y los datos fueron procesados usando un software para el tratamiento de imágenes (IPLab 4.0, Scanalytics).

4.2.4.- Medición de Ca^{2+} intracelular.

Los cultivos neuronales fueron cargados con 10 μ M de la sonda sensible a Ca^{2+} Fura-2 acetoximetilester (Fura-2-AM) más ácido plurónico al 0.005% en solución de registro tamponada con HEPES (116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 0,9 mM de NaH_2PO_4 , 1,8 mM de $CaCl_2$, 0,9 mM de $MgCl_2$, 20 mM de HEPES, 10 mM de glucosa y 0,1 mM de L-arginina, ajustada a pH 7,4 con NaOH) por 20 minutos a 37°C, seguido de otros 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizan 5 lavados y se dejan en solución de registro con el agente farmacológico que corresponda para cada experimento.

Se registra la razón de fluorescencia a 510 nm (excitación a 340 nm y a 380 nm) con la sonda específica para Ca^{2+} Fura-2-AM y se adquieren imágenes por 20

minutos a intervalos regulares de 5 segundos con una exposición de 50 a 100ms. La señal fue promediada sobre la región de interés (ROIs) para somas donde se excluyen los núcleos y para 20 μm de dendritas (escogidas desde emergencia de dendrita primaria del soma), a cada medición se le resta la luminosidad del fondo. Las longitudes de onda de excitación de 340 nm y 380 nm corresponden al Ca^{2+} unido a la sonda y sonda total respectivamente, con ello, las mediciones se independizan de la cantidad total de sonda disponible en la célula. Los cambios de los niveles intracelulares de Ca^{2+} fueron estimados por normalización de la razones de emisión de fluorescencia a 510 nm (340/380 excitación) a la razón de emisión basal de fluorescencia a tiempo 0 (Barreto-Chang and Dolmetsch 2009).

4.2.5.- Medición de NO intracelular.

Los cultivos neuronales fueron cargados con 10 μm de la sonda permeable a la células 3-amino,4-aminoetil-2',7'-difluoresceína (DAF-fm) más ácido plurónico al 0.015% en la misma solución de registro anterior, por una hora a 37°C. DAF-fm, emite fluorescencia luego de reaccionar con un intermediario de NO formado durante la oxidación espontánea de NO a NO_2^- (Sheng *et al.* 2005). Posteriormente los cultivos se lavaron 5 veces y se dejaron en solución de registro. La exposición a la luz se minimizó a través del experimento. La fluorescencia (excitación 495 nm, emisión 510 nm) fue adquirida por 300 ms cada 5 minutos con el fin de minimizar la foto-oxidación y fotoblanqueo (destrucción fotoquímica del fluoróforo) de DAF-fm (Balcerczyk *et al.* 2005). La señal fue promediada sobre la región de interés (ROIs) para somas donde se excluyen los núcleos y para 20 μm de dendritas (escogidas desde emergencia de dendrita primaria del soma), a cada medición se le resta la luminosidad del fondo. Se consideraron los primeros minutos de medición como basal para luego agregar el estímulo determinado. Al final del experimento se agregó un dador de NO (SNAP) como control interno para ver si hay sonda disponible (Figura 5).

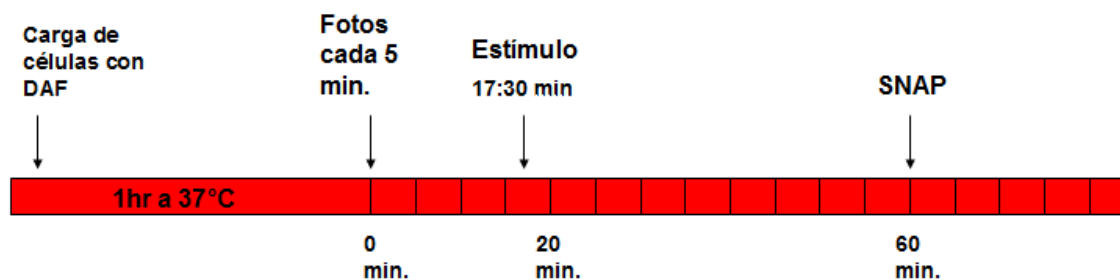


Figura N°5. Curso temporal del protocolo de medición de NO. Las células se cargan con el colorante DAF-fm por una hora, luego se lava para finalmente comenzar con el registro, obteniendo imágenes cada 5 minutos. A los 17:30 minutos se aplica el estímulo farmacológico (NMDA o BDNF) y a los 60 minutos se aplica el dador de NO, SNAP.

4.2.6.- Inmunocitoquímica.

Finalizadas las 48 horas de incubación con BIC 10 μ M o DMSO, las células se fijan para inmunocitoquímica. Para ello, se retira el medio Neurobasal/B27, luego se lava con PBS (tampón salino fosfato) Ca^{+2} 0,1 mM pH 7,4, tres veces. Se fija con paraformaldehído (PFA) 4% Ca^{+2} 0,1 mM, sacarosa 4%, pH 7,4 por 15 minutos. Se lava con PBS tres veces para retirar el exceso de PFA, se permeabiliza con solución Tritón X100 0,2 % en PBS por 10 minutos. Al lavar tres veces por 5 minutos con glicina 25 mM en PBS se apaga la fluorescencia intrínseca del PFA. Se bloquea por 1 hora con BSA al 10% para y luego se incuba con el anticuerpo primario toda la noche en cámara húmeda. Pasado este tiempo se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS a pH 7,4, luego se bloquea por 30 minutos con solución de bloqueo (BSA al 10%) y se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a una sonda fluorescente por 4 horas o toda la noche en cámara húmeda. Una vez incubado con el anticuerpo secundario se lava un mínimo de 3 veces por 5 minutos con PBS pH7.4, se sumergen los cubreobjetos en agua bidestilada y se montan en portaobjetos con medio de montaje (Cat. N°: S3023 Fluorescent Mounting Medium, DAKO, EEUU) y se deja secar en oscuridad a 25°C para observación en microscopio de epifluorescencia.

4.2.7.- Adquisición de imágenes y análisis.

Se utilizó un microscopio Zeiss Axioskop para la adquisición de imágenes. Las fotos fueron obtenidas mediante un objetivo de inmersión en aceite Plan-Neofluar 100X/1,30 y una cámara Nikon Coolpix 995, 3,1 megapíxeles efectivos. Los parámetros usados en todas las sesiones fotográficas fueron: longitud focal 8,2 mm, apertura de lente F2.6, resolución 2048 x 1536 y calidad de la fotografía (bits ocupados en el almacenaje, influye en la información contenida en el registro). Los parámetros como los segundos de exposición fueron ajustados con respecto a requerimientos particulares de cada marcaje. El programa utilizado para el análisis de imágenes fue ImageJ de NIH.

4.2.8.- Metodología de cuantificación.

Las fotos obtenidas se trataron con un protocolo de mejoramiento de la imagen, para su posterior cuantificación. Para el tratamiento de imágenes solamente los parámetros que son lineales (como brillo y contraste) pueden ser modificados sin afectar de forma artificiosa los resultados. El protocolo incluye eliminación de fondo y el realce de la marca por sobre el fondo remanente. Estos cambios son realizados en Photoshop versión CS5, el cual permite grabar todos los cambios hechos. Esta propiedad es importante, permite hacer cambios a una fotografía representativa de las que se desea analizar y posteriormente tratar todas las fotografías de un mismo experimento con los mismos parámetros lineales modificados.

La intensidad lumínica fue calculada mediante el histograma de luminosidad de Photoshop CS5. Se selecciona un área de 40 μm de dendritas (escogidas desde emergencia de dendrita primaria del soma) y luego se hace un trazado a mano por todo el contorno, el cual da un promedio de la luminosidad total en escala de grises del área que fue seleccionada. Como el programa indica los píxeles que fueron seleccionados, se puede normalizar por el área, obteniéndose valores relativos de luminosidad por píxel

Para la cuantificación del número de puntos utilizamos el programa ImageJ de NIH. Para ello, las fotografías son tratadas para obtener imágenes de 8 bit, que son invertidas para obtener una imagen en escala de grises, posteriormente se realiza un trazado a mano por el contorno de la dendrita a analizar. Finalmente, se escoge un umbral de análisis para la cuantificación. Este paso determina lo que el programa considerará como marca. El programa tiene la capacidad de convertir los píxeles en μm y otras unidades. Para las espinas, consideramos tamaños de espinas entre 0,5 a 2,5 μm de diámetro. Todas las señales que no caen en este parámetro el programa no los considera como marca.

4.2.9.- Estadística.

Los parámetros estadísticos se evaluaron mediante los programas OriginPro 7.0 y GraphPad InStat (p value). Todos los resultados fueron expresados como promedio \pm error estándar. Para realizar la estadística, se utilizó la prueba t de Student con dos colas, datos no pareados.

5.- RESULTADOS.

5.1.- Consideraciones experimentales.

5.1.1.- Selección de neuronas para medir producción de NO y Ca^{2+} intracelular

Se trabajó en esta memoria con cultivos neuronales primarios obtenidos desde corteza e hipocampo. Por lo mismo, para la selección y los análisis en ambos tipos de cultivo se eligieron neuronas de morfología piramidal que corresponden a neuronas excitadoras glutamatérgicas (Figura 6).

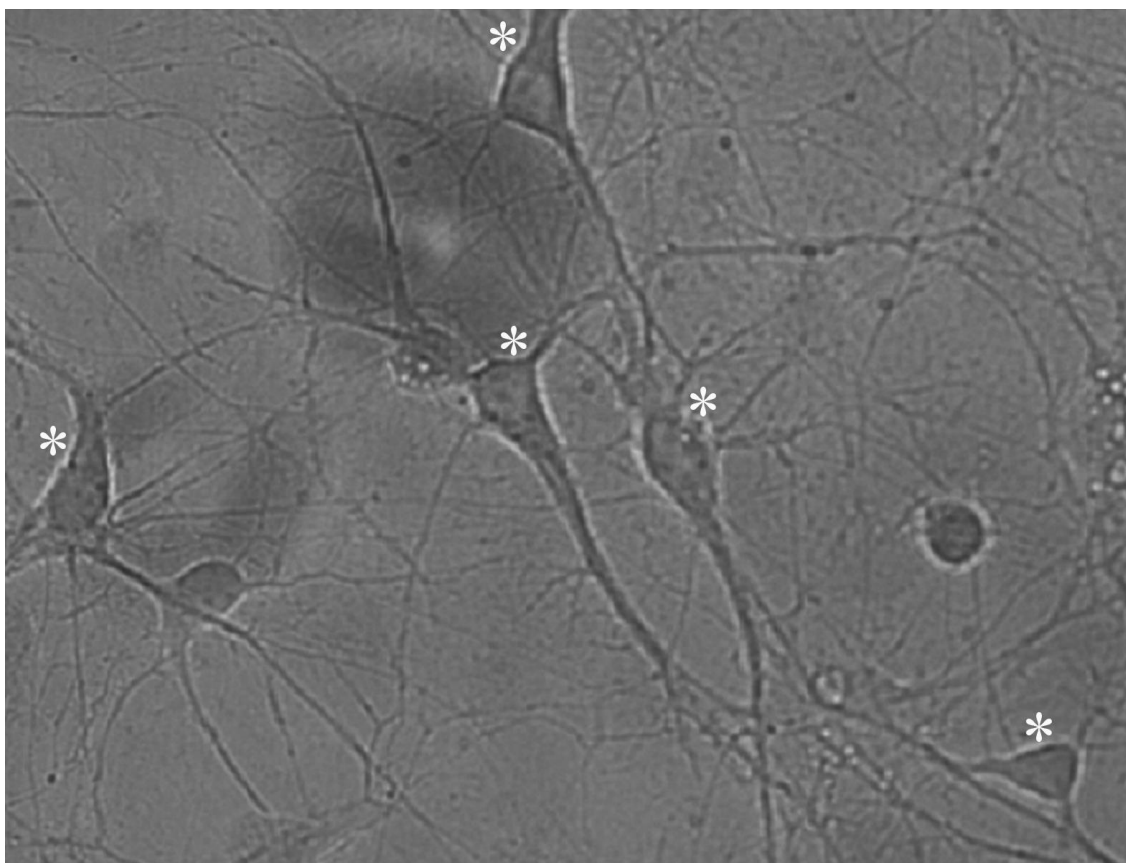


Figura N°6. Imagen representativa de un cultivo neuronal. Fotografía representativa en campo claro de un cultivo de neuronas de hipocampo de 14 DIV. Con asterisco se indica que sólo neuronas con morfología piramidal se consideran para el análisis.

5.1.2.- Medición de producción de NO

Los datos anteriores a esta tesis que se obtuvieron al examinar la viabilidad celular sugirieron que en cultivos corticales podría haber una vía dependiente de BDNF-TrkB capaz de inducir síntesis de NO, y que ésta sería neuroprotectora. Además, NO tendría un efecto antagónico en cultivos corticales e hipocampales. Por ello, decidimos medir los niveles de producción de NO en los cultivos neuronales, los cuales fueron medidos con la sonda fluorescente específica para NO DAF-fm.

En una situación control, se observa un decaimiento lineal de la señal debido al fotoblanqueo que sufre la sonda, Sin embargo, al aplicar un dador de óxido nítrico (10 μm de SNAP), resulta en un incremento inmediato de la fluorescencia, indicando que una considerable cantidad de la sonda sensible al óxido nítrico está disponible (Figura 7 A). La velocidad de producción de NO se determinó basándonos en los cambios en la pendiente de la fluorescencia del DAF-fm. La pendiente basal negativa fue determinada para cada experimento antes de la adición del estímulo en $t=0$ y cada determinación experimental fue corregida por su pendiente basal negativa. Se consideraron sólo los experimentos en que la adición de SNAP indujo un incremento de la fluorescencia, indicando que al final del experimento aún hay sonda disponible.

Al medir la fluorescencia, se puede apreciar un decaimiento en la fluorescencia basal obteniéndose una pendiente negativa de $-41,6 \times 10^{-3} \pm 58,5 \times 10^{-3}$ [U.A/min] (Figura 7 B), debido al apagamiento que sufre la sonda por exposición a la luz. Al, agregar el dador de NO (10 μm de SNAP) se pudo apreciar un incremento en la fluorescencia, obteniéndose una pendiente positiva de $71,4 \times 10^{-3} \pm 53,4 \times 10^{-3}$ [U.A/min]. Ello indica que la sonda no se ha agotado. En el panel derecho del gráfico se puede apreciar la corrección de los datos por el decaimiento lineal que sufre la sonda, estimada durante las mediciones basales. Después de esta corrección, se obtiene una pendiente basal de $0,0057 \pm 0,00097$ [U.A/min] y luego del estímulo con SNAP, ésta aumenta a $124,5 \pm 10,1$ [U.A/min].

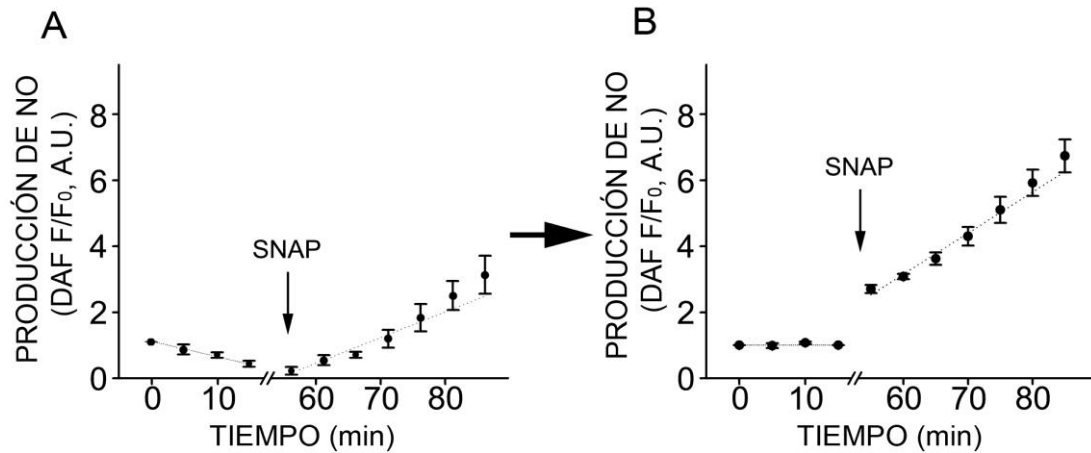


Figura N°7. Mediciones de NO y control de disponibilidad de la sonda fluorescente DAF-fm. Al realizar mediciones de NO en estado basal, se observa un decaimiento lineal de la fluorescencia basal (A). Sin embargo luego de la adición de SNAP se observó una pendiente positiva. Los datos presentados en esta memoria fueron corregidos por la pendiente basal (B). Para controlar la disponibilidad de DAF-fm al final de cada experimento, se aplica el dador de NO SNAP 10 μ M. Al observar un incremento inmediato de la fluorescencia intracelular se concluye que hay sonda disponible capaz de reflejar cambios en la concentración intracelular de NO.

5.2.- BDNF estimula la producción de NO en neuronas corticales.

Para evaluar la producción de NO en respuesta a BDNF, después de un registro basal se estimuló con BDNF (Figura 8) a una concentración de 200 ng/ml (flecha). Se midió el cambio en la fluorescencia tanto en somas como en las dendritas, ya que pueden ocurrir regulaciones homeostáticas a través de mecanismos locales en subcompartimientos neuronales (Yu and Goda 2009)

En células corticales, se observa que BDNF induce síntesis de NO en somas en las condiciones VEH y BIC con pendientes de $10,47 \pm 0,33$ y $14,90 \pm 0,29$, respectivamente. Al comparar estas pendientes, se concluye que BIC induce un aumento de producción de NO ($p < 0,001$). En dendritas, las pendientes fueron de $44,70 \pm 1,86$ y $37,52 \pm 1,33$, respectivamente, concluyendo que en este compartimiento neuronal BIC induce una disminución en la velocidad producción de NO ($p < 0,05$). Cuando se compara entre tipos neuronales (corticales versus hipocampales) se observa que la producción de NO en la condición VEH y BIC tanto en somas como en

dendritas es mayor en neuronas corticales comparadas con neuronas hipocampales ($p < 0,001$ para ambos compartimientos). Adicionalmente podemos ver que en neuronas hipocampales, NO sólo se sintetiza a baja velocidad en somas de células VEH y en ambos compartimientos después de tratamiento con BIC.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que la producción de NO en respuesta a la neurotrofina BDNF es en todos los casos mayor en neuronas corticales que en neuronas hipocampales.

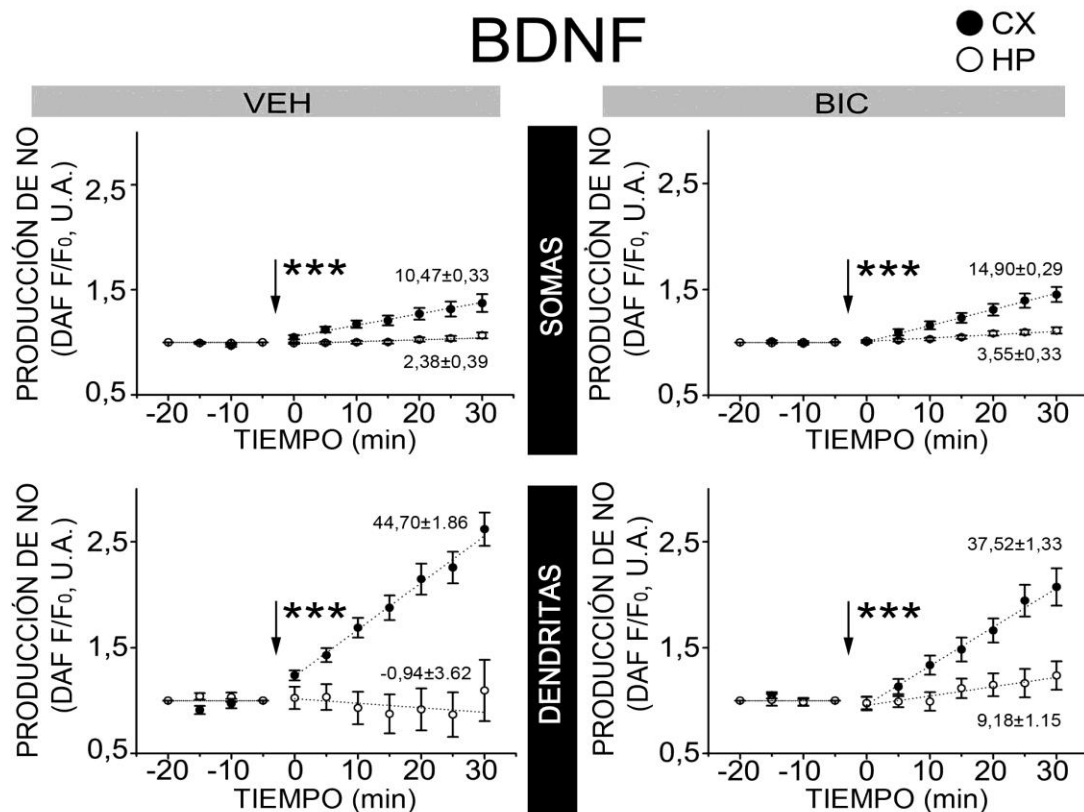


Figura N°8. NO es producido a mayor velocidad en neuronas corticales que en neuronas hipocampales en respuesta a BDNF. La producción de óxido nítrico en las células cargadas con DAF-fm fue medida posterior a la adición de BDNF 200 ng/ml tanto en somas (paneles superiores), como en un segmento de 20 μ m de dendritas (paneles inferiores) en células VEH (izquierda) y BIC (derecha). Se indican las pendientes de las regresiones lineales, después de la corrección de la pendiente basal negativa. Los valores de las pendientes se multiplicaron por 10^3 para facilitar la apreciación de los cambios. Círculos negros representan a neuronas corticales, y círculos blancos representan a neuronas hipocampales. Los valores de las columnas representan el promedio \pm EE obtenido de un $n=5$ de cultivos distintos, en el cual se analizaron entre 5 a 7 somas y 3 a 4 o dendritas por plato. *** $p < 0,001$ por un test t de dos colas

5.3.- La producción de NO es dependiente del receptor para BDNF, TrkB.

Para saber si el receptor para BDNF, TrkB, es necesario para inducir síntesis de NO, los registros se realizaron en presencia del inhibidor de la actividad catalítica de receptores Trk, K252a (Figura 9). Lo que inhibió completamente la producción de NO en células corticales ($p < 0,0001$)

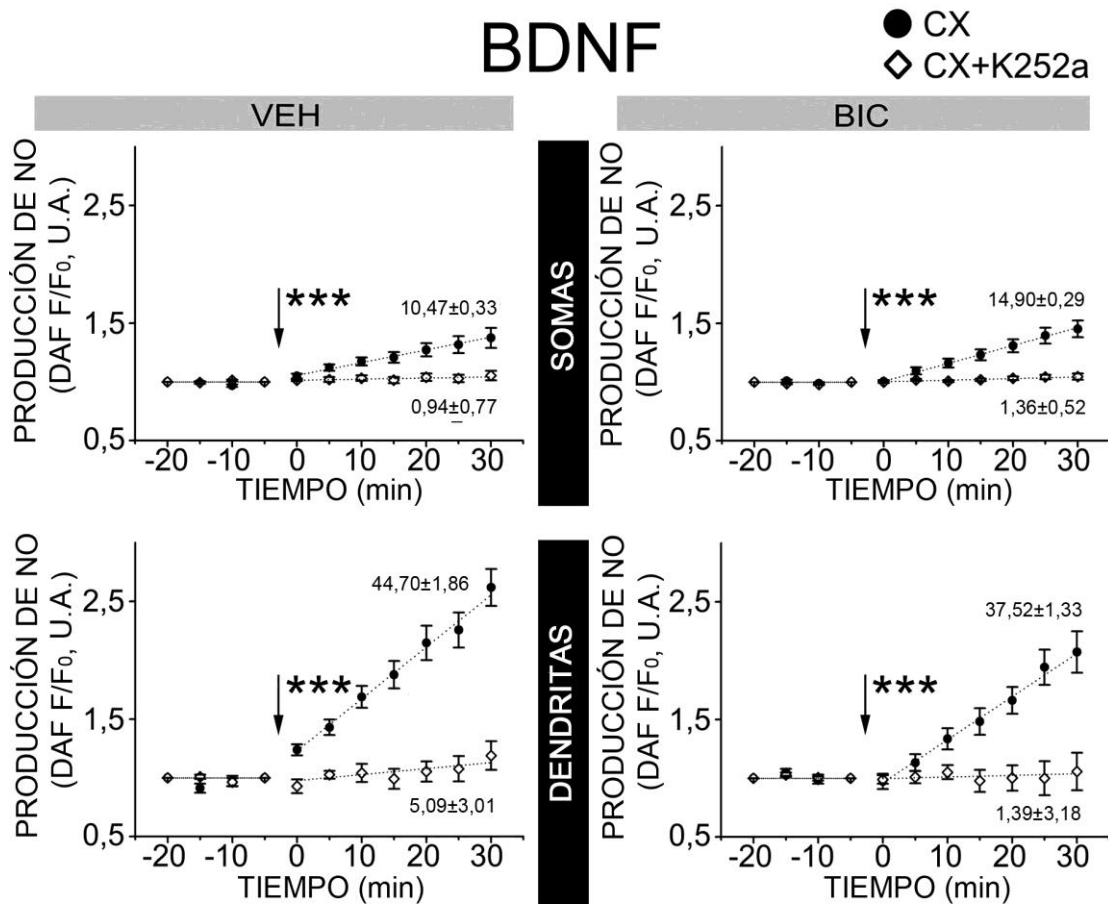


Figura N°9. La producción de NO en respuesta a BDNF depende de TrkB. La producción de NO en respuesta a BDNF 200 ng/ml fue medida en presencia de 100 ng/ml de K252a, tanto en somas (paneles superiores), como en 20 μ m de dendritas (paneles inferiores) en las células VEH (izquierda), como BIC (derecha). El inhibidor fue agregado 10 minutos antes del estímulo con BDNF (flecha). Se muestran las pendientes de las regresiones lineales, después de la corrección de la pendiente basal negativa. Los valores de las pendientes se multiplicaron por 10^3 para facilitar la apreciación de los cambios. Círculos negros representan a neuronas corticales, y círculos blancos representan a neuronas hipocámpales. Los valores de las columnas representan el promedio \pm EE obtenido de un $n=5$ de cultivos distintos, en el cual se analizaron entre 5 a 7 somas y 3 a 4 o dendritas por plato. *** $p < 0,001$ por un test t de dos colas

Estos resultados indican que el aumento en la producción de NO en neuronas corticales depende de la fosforilación de los receptores Trks.

5.4.- La producción de NO luego de la estimulación con NMDA es mayor en neuronas hipocampales.

Como la vía de producción de NO a través de la activación del R-NMDA es la mejor descrita en la literatura, quisimos evaluarla en ambos tipos de cultivos (Figura 10).

En células hipocampales se observa que NMDA induce síntesis de NO en somas en las condiciones VEH y BIC con pendientes de $5,92 \pm 0,74$ y $20,60 \pm 1,08$ respectivamente, al comparar pendientes se concluye que BIC induce un aumento en la producción de NO ($p < 0,001$). En dendritas, las pendientes fueron de $27,98 \pm 1,76$ y $22,61 \pm 1,46$, respectivamente, concluyendo que en este compartimiento neuronal la BIC induce una disminución en la velocidad producción de NO ($p < 0,05$). En somas de células corticales vemos similar producción de NO en las condiciones de VEH y BIC, sin embargo en dendritas las pendientes fueron de $9,33 \pm 2,35$ para el VEH y $-0,87 \pm 2,02$ para la BIC, por lo que al comparar pendientes se concluye que BIC inhibe la producción de NO ($p < 0,05$).

Cuando se compara entre tipos neuronales (corticales versus hipocampales), en la condición VEH, NO fue sintetizado en rangos muy similares en somas de neuronas hipocampales y corticales, sin embargo, fue mayor en dendritas hipocampales comparado con dendritas corticales ($27,98 \pm 1,76$ y $9,33 \pm 2,35$ con $p < 0,001$). Después del tratamiento con BIC, el aumento de NO fue mayor tanto en somas como dendritas de células hipocampales comparados somas y dendritas de células corticales (ambas con $p < 0,001$). Además es de notar que en dendritas corticales BIC no se observó producción de NO.

De acuerdo a estos resultados, concluimos que NO se produce a mayor velocidad en neuronas hipocampales en respuesta a NMDA. Además, BIC induce una

respuesta del tipo homeostático en dendritas de ambos tipos celulares que permite reducir la producción tóxica de NO dependiente de NMDA en este compartimiento subcelular.

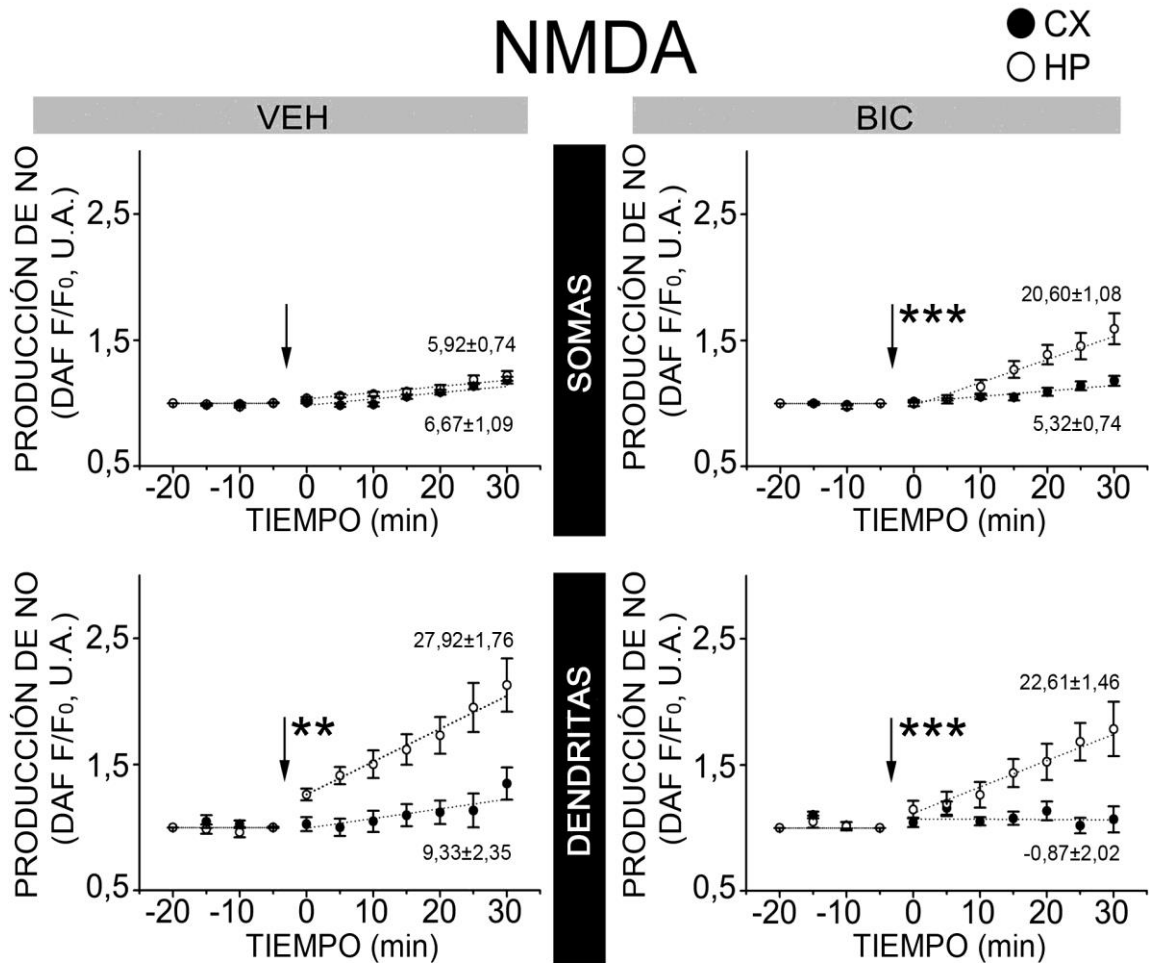


Figura N°10. Medición de NO en respuesta a NMDA. La producción de NO fue medida posterior a la adición de 30 μ M de NMDA (flecha) tanto en somas (paneles superiores), como en 20 μ m de dendritas (paneles inferiores) en cultivos VEH (izquierda) o BIC (derecha). Se indican las pendientes de las regresiones lineales, después de la corrección de la pendiente basal negativa. Los valores de las pendientes se multiplicaron por 10³ para facilitar la apreciación de los cambios. Círculos negros representan a neuronas corticales, y círculos blancos representan a neuronas hipocámpales. Los valores de las columnas representan el promedio \pm EE obtenido de un n=5 de cultivos distintos, en el cual se analizaron entre 5 a 7 somas y 3 a 4 o dendritas por plato. ** p<0,01; *** p<0,001 por un test t de dos colas

5.5.- Los aumentos de Ca^{2+} mediados por el R NMDA en neuronas corticales son inhibidos por BDNF y NO.

Los resultados anteriores muestran que las células corticales son capaces de producir NO en respuesta a BDNF, lo que resulta protector frente a un estímulo de NMDA. De acuerdo a la literatura, NO podría S-nitrosilar al R-NMDA, disminuyendo así su actividad y el consecuente ingreso de Ca^{2+} a la neurona. Para esto, medimos el influjo de Ca^{2+} a través del R-NMDA (Figura 12).

Como se observa en la Figura 12, en somas ($p < 0,01$) como en dendritas ($p < 0,05$) de neuronas hipocámpales se observa mayor influjo de Ca^{2+} cuando se compara con somas y dendritas de neuronas corticales estimuladas con NMDA. Al utilizar un inhibidor de NOS (L-NNA) o un atrapador del BDNF (TrkB-Fc), se observa un aumento en los niveles de Ca^{2+} ($P < 0,001$) tanto en somas como en dendritas de células corticales. Al agregar SNAP (dador de NO) en presencia del atrapador del BDNF se pudo observar que se suprimieron los aumentos de Ca^{2+} tanto en somas ($p < 0,01$) como dendritas de neuronas corticales ($p < 0,05$). Esta modulación no se pudo observar en células hipocámpales, por lo que NO en estas células no contribuye a la regulación del R-NMDA. En cambio, la presencia de TrkB-Fc inducen disminución de Ca^{2+} en los somas de neuronas hipocámpales ($p < 0,05$). De acuerdo a estos resultados pudimos concluir que BDNF y NO son capaces de inhibir la función del receptor de NMDA en neuronas corticales. En cambio, en neuronas hipocámpales, NO, no contribuye a la regulación de la actividad del R-NMDA y BDNF potencia al R-NMDA.

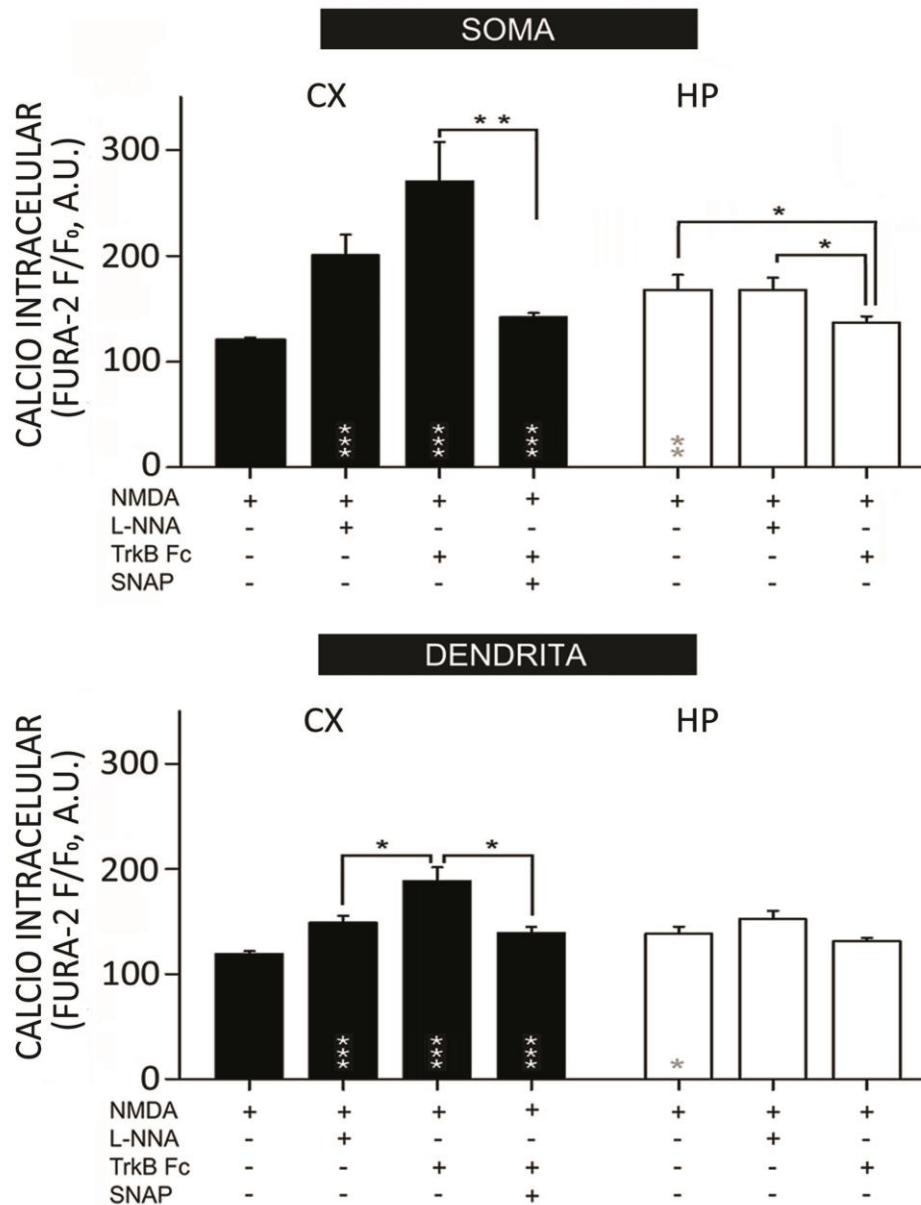


Figura N°11. Mediciones de Ca²⁺ intracelular dependientes del R-NMDA: modulación por BDNF y NO. Se midieron los niveles de Ca²⁺ intracelular en células corticales (barras negras) y células hipocámpales (barra blanca) bajo distintas condiciones experimentales en cultivos BIC. Se integró la señal de Ca²⁺ durante un período de 20 minutos. Los valores de las columnas representan el promedio ± EE obtenido de al menos 5 neuronas de un n=5 cultivos distintos, en el cual se analizaron entre 5 a 7 somas y 3 a 4 o dendritas por plato. La significancias estadísticas indicadas dentro de las barras resultó de la comparación de los incrementos de Ca²⁺ obtenidos después de la adición de NMDA a neuronas corticales (primera barra negra). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 por un test t de dos colas.

5.6.- Activación del receptor TrkB.

Como reflejo del estado de activación de TrkB en los cultivos neuronales, se quiso evaluar el estado de fosforilación de TrkB en Y816 y Y515. Por razones técnicas, para esta memoria sólo logramos evaluar la localización y los cambio de fosforilación de Y515 con un número de experimentos aún insuficientes para realizar análisis estadístico (n=1). Para ello, se estandarizó la dilución a usar de un anticuerpo contra p-Y515 en experimentos de inmunocitoquímica. Se cuantificó la luminosidad de p-Y515 dendritas de neuronas de morfología piramidal (Figura 12 A). Se encontró una mayor luminosidad en dendritas corticales cuando se compara con dendritas hipocampales. Al estimular con BIC, aumentó la luminosidad tanto en dendritas corticales como hipocampales. También se cuantificó el número de puntos de p-Y515 a lo largo de la dendrita (Figura 12 B). Estos puntos corresponden a agrupaciones del receptor que se producen en la espina dendrítica, el sitio postsináptico de sinapsis excitadoras, que puede ser marcado también con proteínas específicas de la sinapsis con la proteína andamio PSD-95. Se observó una disminución del número de puntos luego de BIC tanto en dendritas corticales como hipocampales comparadas con VEH.

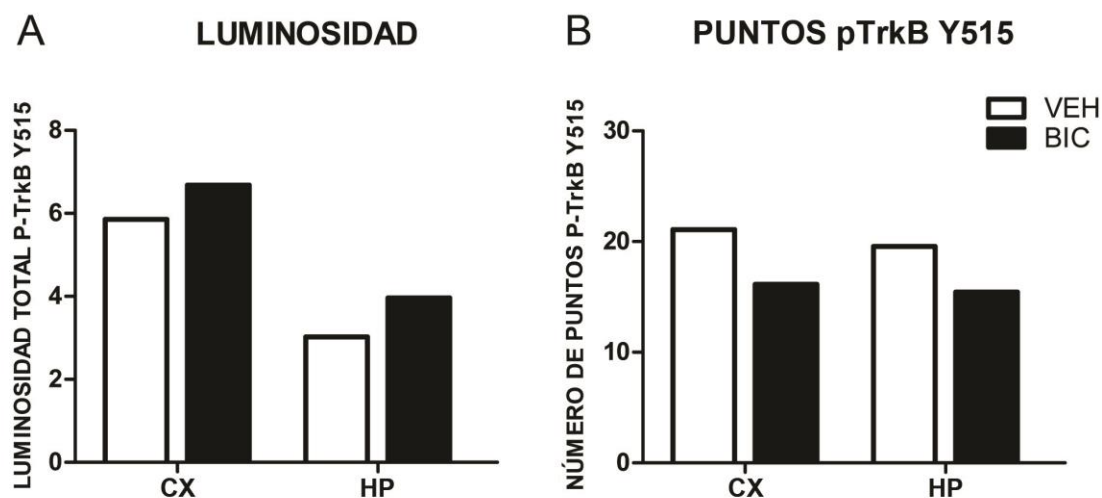


Figura N°12. Cuantificación de la luminosidad y el número de puntos de TrkB fosforilado en tirosina 515. Inmunocitoquímica de p-Y515. Se muestra la luminosidad total del marcaje (A) y el número total de puntos o clusters (B) por 20 μ m de dendrita. Se analizaron en promedio 25 dendritas por condición. Las barras blancas representan al vehículo y las negras a las estimuladas con BIC. CX=neuronas corticales; HP=neuronas hipocampales.

Al colocalizar p-Y515 con la proteína de andamio PSD-95 (Figura 13), observamos mayor porcentaje de colocalización en las neuronas corticales que en las hipocampales. Después de BIC, se observa una disminución del porcentaje de colocalización en dendritas corticales mientras que en las dendritas hipocampales hay un notable aumento en el porcentaje de colocalización (n=1). Este comportamiento diferencial frente a BIC refleja una diferencia adicional entre ambos tipos de cultivo neuronal.

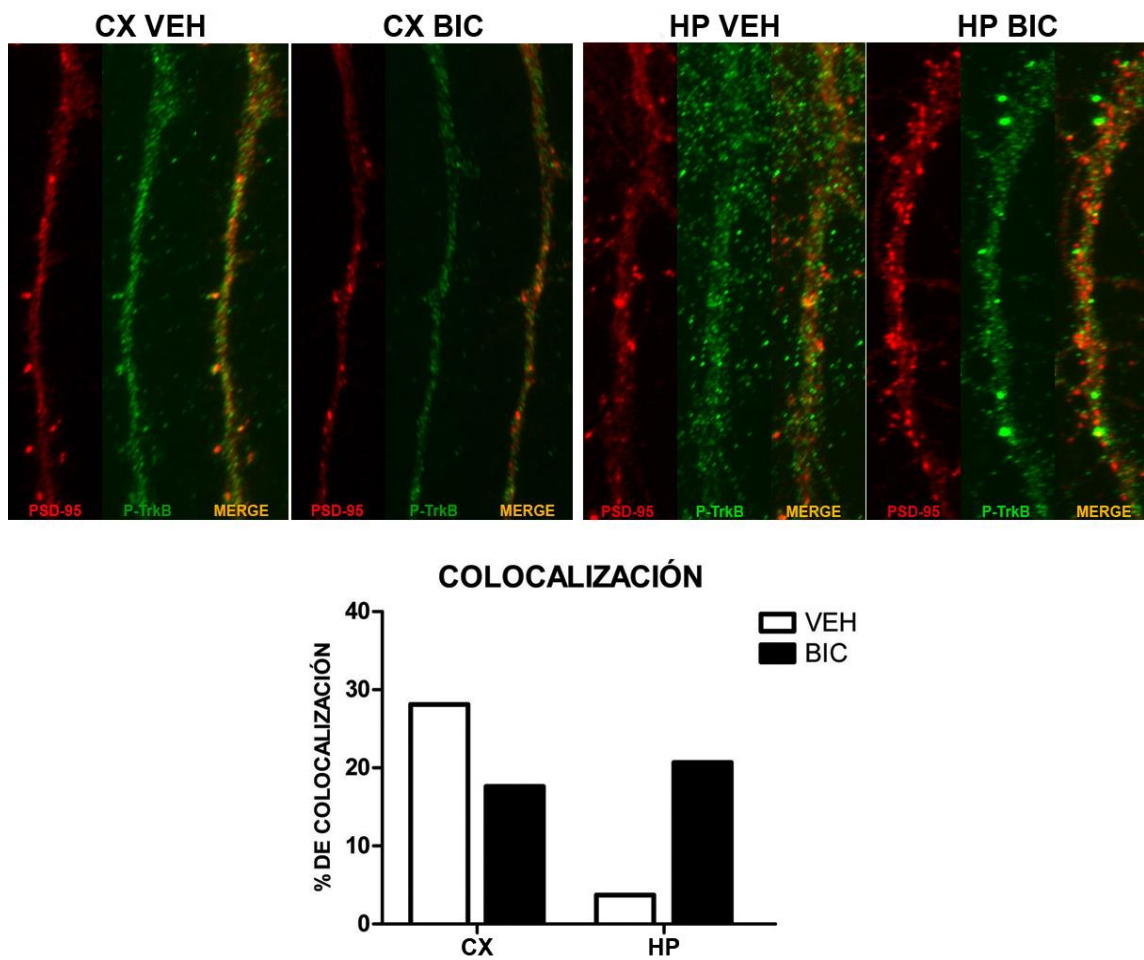


Figura N°13. Porcentaje de colocalización de PSD-95 y TrkB fosforilado en tirosina 515 (p-Y515). Inmunocitoquímica contra p-Y515 y PSD-95 (arriba) en células corticales e hipocampales VEH y BIC. En el panel inferior, se indican los porcentajes de colocalización entre las dos proteínas.

Estos resultados sugieren que en las células corticales hay mecanismos compensatorios que llevan a atenuar la sobre-activación en Y515 después de BIC mientras en hipocampo ocurre lo opuesto.

6.- DISCUSIÓN.

En esta memoria se caracterizó una vía neuroprotectora en células corticales que depende de la producción de NO inducida por BDNF. A pesar de que existe otra vía celular capaz de inducir síntesis de NO, a través de estimulación del R-NMDA, el NO así producido es neurotóxico.

Para evaluar la implicancia biológica de las vías de señalización que inducen síntesis de NO, así como para hacer las mediciones de NO, se utilizaron cultivos primarios de células hipocámpales y corticales, que han sido ampliamente validados para estudiar la vulnerabilidad de neuronas a insultos excitotóxicos (Dawson *et al.* 1993; Fu *et al.* 2011; Kambe *et al.* 2008). Similar a un trabajo anterior, se pudo comprobar una vulnerabilidad diferencial de ambos tipos celulares al insulto excitotóxico (Kambe *et al.* 2008). Sin embargo, en este estudio no se había examinado el papel de BDNF y NO, que resultaron ser neuroprotectores en cultivos corticales pero no hipocámpales. En el laboratorio, se caracterizaron los cultivos hipocámpales y corticales en cuanto a su contenido de astrocitos y neuronas inhibitorias (GABA-érgicas), parámetros que fueron similares y por lo tanto no explican las diferencias encontradas en cuanto a la vía capaz de inducir síntesis de NO. Claramente, ambos tipos de cultivos muestran diferencias significativas en cuanto a la vía de señalización capaz de producir NO, y por lo tanto constituyen un modelo válido para evaluar sus consecuencias sobre el funcionamiento del R-NMDA.

A su vez, los niveles intracelulares de NO y Ca^{2+} fueron evaluados mediante sondas fluorescentes que son ampliamente utilizadas para estos fines (Balcerczyk *et*

al. 2005; Hartell *et al.* 2005). La fluorescencia emitida por la sonda para NO, DAF-fm, decae linealmente con el tiempo, por lo que se aplicó una corrección por este decaimiento basal que ha sido previamente validada (Kovacs *et al.* 2009). Gracias a este ajuste, se visualiza de mejor manera los cambios en la producción de NO.

6.1.- Mecanismos homeostáticos.

El término homeostasis fue acuñado por el fisiólogo Walter B. Cannon y luego desarrollado por el fisiólogo Claude Bernard para describir que la constancia del medio interno es una condición indispensable para la vida (Berne *et al.* 2008). Este concepto de constancia se aplica a todos los parámetros fisiológicos (como niveles hormonales, temperatura corporal etc.) y también, a la tasa de descarga de neuronas. Los mecanismos homeostáticos capaces de mantener la constancia de los parámetros fisiológicos son siempre contrarios al estímulo inductor: por ejemplo, un aumento de temperatura corporal induce mecanismos de disipación de calor tendientes a bajar la temperatura, como transpiración, jadeo, etc. En el sistema nervioso central, los mecanismos homeostáticos capaces de mantener la actividad neuronal en rangos fisiológicos son aún poco conocidos. Éstos se desarrollan en respuesta a modificaciones sostenidas en la actividad neuronal (Turrigiano 2008). Así, un aumento sostenido en la actividad neuronal debería ser capaz de inducir mecanismos capaces de frenar esta actividad. Los mecanismos que se contraponen a aumentos de actividad neuronal son prácticamente desconocidos (Pozo and Goda 2010), y podrían tener relevancia en patologías en que la actividad neuronal se escapa por sobre rangos fisiológicos, como la epilepsia. Experimentalmente, se han utilizado cultivos celulares para comprender los mecanismos subyacentes a este tipo de plasticidad, y la estrategia más usada para inducir aumento de actividad neuronal sostenida es la aplicación de BIC por tiempos prolongados (2 días) (Fu *et al.* 2011; Shepherd *et al.* 2006). A su vez, hay mediadores químicos, como la neurotrofina BDNF, que se liberan en forma dependiente de actividad en el SNC (Lu 2003), y por lo tanto son buenos candidatos para mediar reorganización homeostática (Desai *et al.* 1999). Como la

liberación de BDNF aumenta en los cultivos estimulados con BIC (dato corroborado en nuestro laboratorio), deberíamos esperar una mayor producción endógena de NO en neuronas corticales después de BIC. Esta producción endógena en respuesta al BDNF secretado por las células no fue cuantificada en la presente memoria ya que requiere de mediciones absolutas de producción de NO. Además de las cantidades absolutas de NO sintetizadas, es posible que los mecanismos neuroprotectores (como S-nitrosilación del R-NMDA) sean más eficiente después del tratamiento con BIC. Como NO es un gas de baja vida media, de sólo 3 a 5 segundos (Guix *et al.* 2005), la cercanía física entre la fuente de NO y su proteína blanco son críticos y podrían explicar diferencias en la eficiencia de S-nitrosilación que nosotros no hemos medido. Todas estas consideraciones podrían explicar por qué la sobrevivencia neuronal depende de BDNF y NO después de BIC, pero no en VEH.

Si postulamos que NO producido en respuesta a BDNF es neuroprotector, observamos que las células hipocampales son capaces de desarrollar esta respuesta homeostática después de BIC, tanto en soma como dendritas. Sin embargo, su producción en células hipocampales es siempre menor que en corticales, explicando así la baja efectividad neuroprotectora de BDNF-NO en los cultivos hipocampales. En cambio, la producción de NO en respuesta a NMDA, que es tóxica, disminuye en dendritas de células corticales e hipocampales después de BIC. Ello refleja que ocurre un reordenamiento homeostático en dendritas en ambos tipos celulares, ya que disminuye la producción tóxica de NO dependiente de NMDA. Sin embargo, en el soma de neuronas hipocampales, BIC aumenta la producción de NO en respuesta a NMDA lo que refleja una falta de re-organización homeostática en este compartimento subcelular y es consistente con la alta vulnerabilidad de estas neuronas al insulto excitotóxico.

Cuando observamos las mediciones de producción de NO en los somas y en dendritas, vemos que su producción en dendritas es mayor que en somas. Esto se explica porque toda la maquinaria de producción de NO se encuentra en las densidades post-sinápticas de las espinas dendríticas, en que se localiza la nNOS

junto al R-NMDA (Aarts *et al.* 2002; Ziff 1997). Como NO es un gas difusible de baja vida media, el NO producido en dendritas no es capaz de difundir al soma, por lo tanto, estas mediciones reflejan fielmente la localización subcelular de producción.

6.2.- Papeles biológicos opuestos de NO reportados en la literatura.

Como dijimos, NO ha sido reportado como agente tóxico cuando es producido en exceso, aunque sería neuroprotector cuando sus niveles de producción son bajos (Calabrese *et al.* 2007). Consistente con nuestros resultados, se han descrito efectos neuroprotectores de NO en células corticales (Nott *et al.* 2008; Riccio *et al.* 2006; Sen *et al.* 2009). En estos estudios, se ha visto que está implicada la S-nitrosilación de proteínas, aunque no ha sido examinada esta modificación en los R-NMDA. El aporte de esta memoria consiste en la comparación sistemática de dos diferentes vías de producción de NO sobre una reorganización del tipo homeostática. Además de los trabajos recién mencionados sobre neuroprotección mediada por S-nitrosilación, se agrega otro blanco de importancia como lo es el R-NMDA. Se ha visto que incluso peróxido nítrico, una sustancia altamente reactiva de supuesta alta toxicidad, puede tener efectos neuroprotectores en células corticales (Delgado-Esteban *et al.* 2007; Garcia-Nogales *et al.* 2003).

Nosotros encontramos que cuando NO es producido en respuesta a BDNF, tiene efectos protectores y esto sólo se pudo observar en neuronas corticales, pero no hipocampales.

6.3.- S-nitrosilación del R-NMDA por BDNF/TrkB.

Si bien se había descrito que el R-NMDA puede ser S-nitrosilado en sistemas heterólogos y en cultivos primarios de células corticales (Choi and Lipton 2000; Takahashi *et al.* 2007), otros autores no pudieron encontrar evidencia de este

fenómeno en neuronas hipocampales (Hopper *et al.* 2004; Keynes *et al.* 2004). En concordancia con estos antecedentes, nosotros encontramos que la vía BDNF-NO puede llevar a inhibición del R-NMDA (probablemente por S-nitrosilación) sólo en neuronas corticales. El efecto de BDNF está mediado por su receptor específico TrkB (Huang and Reichardt 2003), ya que el inhibidor de receptores del tipo Trk con K252a, empleado por nosotros, fue capaz de bloquear completamente la producción de NO. Este experimento además valida la idea de que BDNF es capaz de inducir la síntesis de NO. Incluso, se ha propuesto que el mecanismo río abajo de TrkB, que involucraría a la PLC γ , sería capaz de liberar Ca²⁺ desde depósitos intracelulares (Reichardt 2006; Riccio *et al.* 2006). En esta memoria por motivos técnicos sólo pudimos evaluar la activación de TrkB fosforilado en Y515, que lleva a activación de MAPK/Erk y Akt/proteína Kinasa B. Por lo mismo, sería interesante evaluar a TrkB fosforilado en Y816, que lleva a aumentos intracelulares de Ca²⁺ por la activación de PLC γ (Chao 2003; Yoshii and Constantine-Paton 2010). Esta vía debiera mostrarse activa en neuronas corticales explicando en parte la capacidad de BDNF/TrkB para inducir síntesis de NO en este tipo de neuronas.

Es posible que el NO producido en respuesta a BDNF además de S-nitrosilar al R-NMDA, sea capaz de modificar la actividad de otras proteínas neuroprotectoras como GOSPEL (Sen *et al.* 2009), una deacetilasa de histonas (Nott *et al.* 2008; Riccio *et al.* 2006) y caspasas (Zhou *et al.* 2005). Así, BDNF-NO sería capaz de gatillar un complejo “programa de supervivencia” que daría cuenta de la mayor resistencia al daño de células corticales, ya que NO, no pudo ser detectado en respuesta a BDNF en células hipocampales.

6.4.- Vulnerabilidad diferencial de diferentes estructuras neuronales y la expresión de mecanismos homeostáticos.

Se sabe que distintas zonas del SNC son diferencialmente vulnerables frente a insultos cerebrales que inducen hipoxia, como isquemia, accidentes vasculares y

descargas epilépticas (Wang *et al.* 2009). Así por ejemplo, el hipocampo es una región particularmente vulnerable y un insulto de este tipo lleva a desarrollo de epilepsia del lóbulo temporal (es decir, el hipocampo y las regiones adyacente desarrollan hiperexcitabilidad o aumento de actividad neuronal sin freno) (Pitkanen and Sutula 2002). Estos insultos, al alterar el equilibrio iónico celular, promueven una masiva liberación de glutamato al espacio extracelular el cual estimula a su vez los receptores para este neurotransmisor presente en la membrana neuronal (Arundine and Tymianski 2004). El R-NMDA resulta particularmente tóxico por su alta permeabilidad al Ca^{2+} , siendo responsable de la excitotoxicidad. Por ello, el mecanismo aquí descrito, en que la producción de NO se asocia con inhibición del R-NMDA, es capaz de proteger a las neuronas del insulto excitotóxico. La vía que conduce a la inhibición del R-NMDA está presente principalmente en neuronas corticales pero no en neuronas hipocámpales, en que no se pudo detectar bajo las condiciones experimentales empleadas. Por lo tanto, aparte de constituir un mecanismo homeostático, podría explicar la mayor resistencia de neuronas corticales a insultos excitotóxicos.

7.- CONCLUSIÓN.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente memoria se propone el modelo presentado en la Figura 14. Los principales hallazgos de la presente memoria se pueden resumir como sigue:

- 1.- Se dilucidó un mecanismo que puede subyacer al papel biológico antagónico reportado para NO.
- 2.- Se encontró una vía de producción de NO capaz de inhibir al R-NMDA.
- 3.- Se caracterizó un mecanismo homeostático que opera en situaciones de actividad neuronal elevada, capaz de disminuir el ingreso de Ca^{2+} por el R-NMDA.

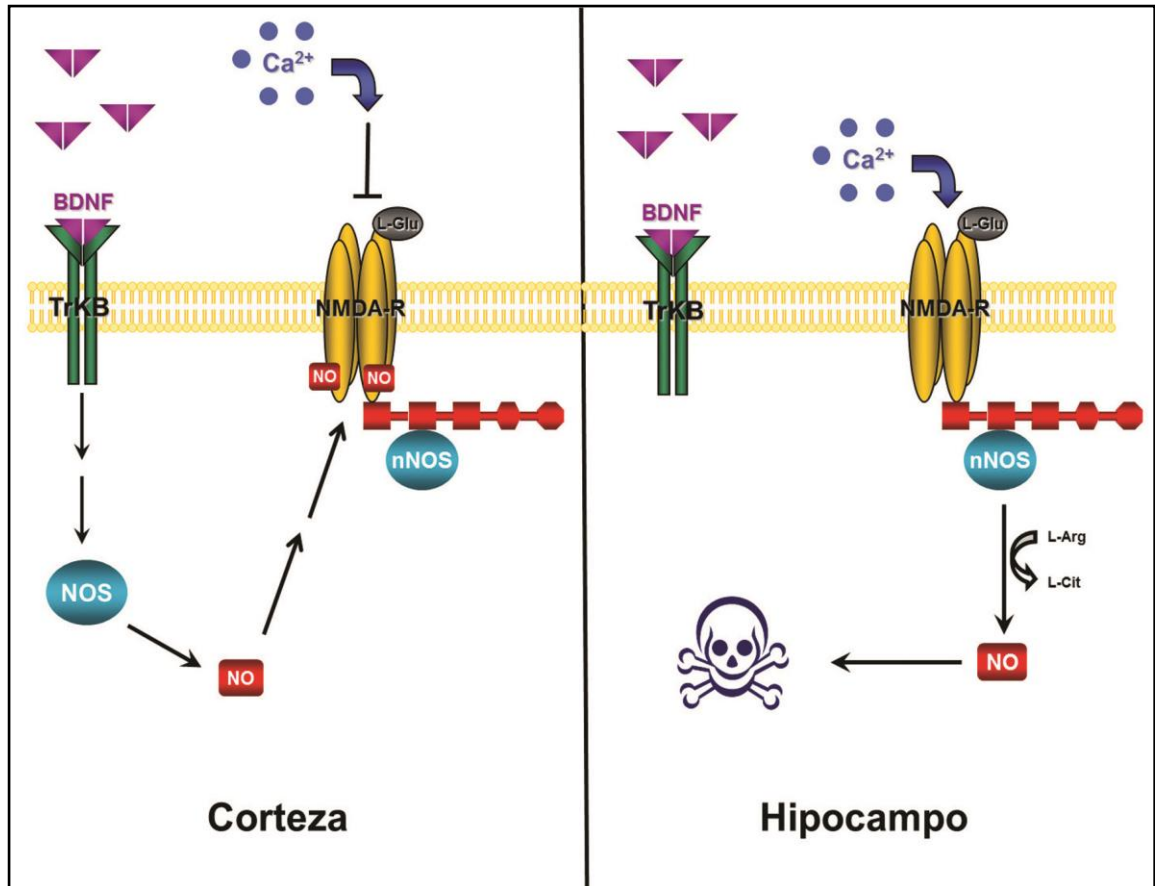


Figura N°14. Modelo propuesto. Diferentes vías de señalización en neuronas corticales e hipocámpales inducen síntesis de NO: Izquierda: La inhibición del R-NMDA por NO depende de la vía BDNF-TrkB. Esta vía de transducción se observa en neuronas corticales e inhibe la entrada de Ca²⁺ por el R-NMDA, lo que representa una retroalimentación negativa, del tipo homeostática, y es neuroprotector. Derecha: En células hipocámpales, la producción de NO depende principalmente del R-NMDA y NO no es capaz de inducir esta respuesta neuroprotectora. En los estudios de viabilidad celular se pudo comprobar que NO producido en respuesta a NMDA es tóxico para la célula.

8.- REFERENCIAS.

- Aarts, M., Y. Liu, L. Liu, S. Besshoh, M. Arundine, J. W. Gurd, Y. T. Wang, M. W. Salter and M. Tymianski (2002). "Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions." *Science* **298**(5594): 846-850.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.
- Altar, C. A., J. A. Siuciak, P. Wright, N. Y. Ip, R. M. Lindsay and S. J. Wiegand (1994). "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**(9): 1389-1405.
- Alvarez, V. A. and B. L. Sabatini (2007). "Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines." *Annu Rev Neurosci* **30**: 79-97.
- Arundine, M. and M. Tymianski (2004). "Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury." *Cell Mol Life Sci* **61**(6): 657-668.
- Balcerczyk, A., M. Soszynski and G. Bartosz (2005). "On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide." *Free Radic Biol Med* **39**(3): 327-335.
- Baranano, D. E., C. D. Ferris and S. H. Snyder (2001). "Atypical neural messengers." *Trends Neurosci* **24**(2): 99-106.
- Barreto-Chang, O. L. and R. E. Dolmetsch (2009). "Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM." *J Vis Exp*(23).
- Berne, R. M., M. N. Levy, B. M. Koeppen and B. A. Stanton (2008). *Berne & Levy physiology*. Philadelphia, PA, Mosby/Elsevier.
- Binder, D. K., S. D. Croll, C. M. Gall and H. E. Scharfman (2001). "BDNF and epilepsy: too much of a good thing?" *Trends Neurosci* **24**(1): 47-53.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1992). "Nitric oxide, a novel neuronal messenger." *Neuron* **8**(1): 3-11.
- Brenman, J. E. and D. S. Bredt (1997). "Synaptic signaling by nitric oxide." *Curr Opin Neurobiol* **7**(3): 374-378.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege and P. J. Price (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." *J Neurosci Res* **35**(5): 567-576.
- Calabrese, V., C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield and A. M. Stella (2007). "Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity." *Nat Rev Neurosci* **8**(10): 766-775.
- Cull-Candy, S., S. Brickley and M. Farrant (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." *Curr Opin Neurobiol* **11**(3): 327-335.
- Cull-Candy, S. G. and D. N. Leszkiewicz (2004). "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses." *Sci STKE* **2004**(255): re16.

- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
- Chen, M. J., T. V. Nguyen, C. J. Pike and A. A. Russo-Neustadt (2007). "Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons." Cell Signal **19**(1): 114-128.
- Choi, Y. B. and S. A. Lipton (2000). "Redox modulation of the NMDA receptor." Cell Mol Life Sci **57**(11): 1535-1541.
- Choi, Y. B., L. Tennesi, D. A. Le, J. Ortiz, G. Bai, H. S. Chen and S. A. Lipton (2000). "Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation." Nat Neurosci **3**(1): 15-21.
- Dawson, T. M. and S. H. Snyder (1994). "Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain." J Neurosci **14**(9): 5147-5159.
- Dawson, V. L., T. M. Dawson, D. A. Bartley, G. R. Uhl and S. H. Snyder (1993). "Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures." J Neurosci **13**(6): 2651-2661.
- Delgado-Esteban, M., D. Martin-Zanca, L. Andres-Martin, A. Almeida and J. P. Bolanos (2007). "Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway." J Neurochem **102**(1): 194-205.
- Desai, N. S. (2003). "Homeostatic plasticity in the CNS: synaptic and intrinsic forms." J Physiol Paris **97**(4-6): 391-402.
- Desai, N. S., L. C. Rutherford and G. G. Turrigiano (1999). "BDNF regulates the intrinsic excitability of cortical neurons." Learn Mem **6**(3): 284-291.
- Fu, A. K., K. W. Hung, W. Y. Fu, C. Shen, Y. Chen, J. Xia, K. O. Lai and N. Y. Ip (2011). "APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity." Nat Neurosci **14**(2): 181-189.
- Garcia-Nogales, P., A. Almeida and J. P. Bolanos (2003). "Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection." J Biol Chem **278**(2): 864-874.
- Garthwaite, J. and C. L. Boulton (1995). "Nitric oxide signaling in the central nervous system." Annu Rev Physiol **57**: 683-706.
- Guix, F. X., I. Uribealago, M. Coma and F. J. Munoz (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." Prog Neurobiol **76**(2): 126-152.
- Hara, M. R. and S. H. Snyder (2007). "Cell signaling and neuronal death." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 117-141.
- Hartell, N. A., H. E. Archer and C. J. Bailey (2005). "Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B." Biochem Pharmacol **69**(5): 781-790.
- Hopper, R., B. Lancaster and J. Garthwaite (2004). "On the regulation of NMDA receptors by nitric oxide." Eur J Neurosci **19**(7): 1675-1682.
- Hu, Y. and S. J. Russek (2008). "BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation." J Neurochem **105**(1): 1-17.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-642.

- Kafitz, K. W., C. R. Rose, H. Thoenen and A. Konnerth (1999). "Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors." Nature **401**(6756): 918-921.
- Kambe, Y., N. Nakamichi, D. D. Georgiev, N. Nakamura, H. Taniura and Y. Yoneda (2008). "Insensitivity to glutamate neurotoxicity mediated by NMDA receptors in association with delayed mitochondrial membrane potential disruption in cultured rat cortical neurons." J Neurochem **105**(5): 1886-1900.
- Kandel, A., Ed. (2000). Principles of Neural Science.
- Keynes, R. G., S. Dupont and J. Garthwaite (2004). "Hippocampal neurons in organotypic slice culture are highly resistant to damage by endogenous and exogenous nitric oxide." Eur J Neurosci **19**(5): 1163-1173.
- Kohr, G. (2006). "NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution." Cell Tissue Res **326**(2): 439-446.
- Kovacs, R., A. Rabanus, J. Otahal, A. Patzak, J. Kardos, K. Albus, U. Heinemann and O. Kann (2009). "Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices." J Neurosci **29**(26): 8565-8577.
- Lipton, S. A., Y. B. Choi, H. Takahashi, D. Zhang, W. Li, A. Godzik and L. A. Bankston (2002). "Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation." Trends Neurosci **25**(9): 474-480.
- Lu, B. (2003). "BDNF and activity-dependent synaptic modulation." Learn Mem **10**(2): 86-98.
- Madden, D. R. (2002). "The structure and function of glutamate receptor ion channels." Nat Rev Neurosci **3**(2): 91-101.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." Neuron **44**(1): 5-21.
- Matsumoto, T., T. Numakawa, N. Adachi, D. Yokomaku, S. Yamagishi, N. Takei and H. Hatanaka (2001). "Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons." J Neurochem **79**(3): 522-530.
- 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**(4): 369-415.
- Minichiello, L., A. M. Calella, D. L. Medina, T. Bonhoeffer, R. Klein and M. Korte (2002). "Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation." Neuron **36**(1): 121-137.
- Mody, I., Y. De Koninck, T. S. Otis and I. Soltesz (1994). "Bridging the cleft at GABA synapses in the brain." Trends Neurosci **17**(12): 517-525.
- Nott, A., P. M. Watson, J. D. Robinson, L. Crepaldi and A. Riccio (2008). "S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons." Nature **455**(7211): 411-415.
- Ohira, K. and M. Hayashi (2009). "A New Aspect of the TrkB Signaling Pathway in Neural Plasticity." Curr Neuropharmacol **7**(4): 276-285.
- Orrego, F. and S. Villanueva (1993). "The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization." Neuroscience **56**(3): 539-555.
- Patel, K. P., Y. F. Li and Y. Hirooka (2001). "Role of nitric oxide in central sympathetic outflow." Exp Biol Med (Maywood) **226**(9): 814-824.

- Perez-Otano, I. and M. D. Ehlers (2005). "Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking." Trends Neurosci **28**(5): 229-238.
- Pitkanen, A. and T. P. Sutula (2002). "Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy." Lancet Neurol **1**(3): 173-181.
- Pozo, K. and Y. Goda (2010). "Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity." Neuron **66**(3): 337-351.
- Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1545-1564.
- Riccio, A., R. S. Alvania, B. E. Lonze, N. Ramanan, T. Kim, Y. Huang, T. M. Dawson, S. H. Snyder and D. D. Ginty (2006). "A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons." Mol Cell **21**(2): 283-294.
- Rizzoli, S. O. and W. J. Betz (2005). "Synaptic vesicle pools." Nat Rev Neurosci **6**(1): 57-69.
- Santos Da Silva, J., V. Schubert and C. G. Dotti (2004). "RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development." Mol Cell Neurosci **27**(1): 1-7.
- Sattler, R. and M. Tymianski (2001). "Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death." Mol Neurobiol **24**(1-3): 107-129.
- Schoepp, D., J. Bockaert and F. Sladeczek (1990). "Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors." Trends Pharmacol Sci **11**(12): 508-515.
- Sen, N., M. R. Hara, A. S. Ahmad, M. B. Cascio, A. Kamiya, J. T. Ehmsen, N. Agrawal, L. Hester, S. Dore, S. H. Snyder and A. Sawa (2009). "GOSPEL: a neuroprotective protein that binds to GAPDH upon S-nitrosylation." Neuron **63**(1): 81-91.
- Sheng, J. Z., D. Wang and A. P. Braun (2005). "DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin." J Pharmacol Exp Ther **315**(2): 931-940.
- Sheng, M. and C. C. Hoogenraad (2007). "The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view." Annu Rev Biochem **76**: 823-847.
- Shepherd, J. D., G. Rumbaugh, J. Wu, S. Chowdhury, N. Plath, D. Kuhl, R. L. Huganir and P. F. Worley (2006). "Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors." Neuron **52**(3): 475-484.
- Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." Cell **106**(6): 675-683.
- Swanwick, C. C., N. R. Murthy and J. Kapur (2006). "Activity-dependent scaling of GABAergic synapse strength is regulated by brain-derived neurotrophic factor." Mol Cell Neurosci **31**(3): 481-492.
- Takahashi, H., Y. Shin, S. J. Cho, W. M. Zago, T. Nakamura, Z. Gu, Y. Ma, H. Furukawa, R. Liddington, D. Zhang, G. Tong, H. S. Chen and S. A. Lipton (2007). "Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif." Neuron **53**(1): 53-64.
- Tong, L., R. Balazs, P. L. Thornton and C. W. Cotman (2004). "Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons." J Neurosci **24**(30): 6799-6809.

- Turrigiano, G. G. (2008). "The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses." Cell **135**(3): 422-435.
- Turrigiano, G. G., K. R. Leslie, N. S. Desai, L. C. Rutherford and S. B. Nelson (1998). "Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons." Nature **391**(6670): 892-896.
- Turrigiano, G. G. and S. B. Nelson (2004). "Homeostatic plasticity in the developing nervous system." Nat Rev Neurosci **5**(2): 97-107.
- Wang, X., A. Zaidi, R. Pal, A. S. Garrett, R. Braceras, X. W. Chen, M. L. Michaelis and E. K. Michaelis (2009). "Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress." BMC Neurosci **10**: 12.
- Watt, A. J., M. C. van Rossum, K. M. MacLeod, S. B. Nelson and G. G. Turrigiano (2000). "Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses." Neuron **26**(3): 659-670.
- West, A. E., E. C. Griffith and M. E. Greenberg (2002). "Regulation of transcription factors by neuronal activity." Nat Rev Neurosci **3**(12): 921-931.
- Yoshii, A. and M. Constantine-Paton (2010). "Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease." Dev Neurobiol **70**(5): 304-322.
- Yu, L. M. and Y. Goda (2009). "Dendritic signalling and homeostatic adaptation." Curr Opin Neurobiol **19**(3): 327-335.
- Zhou, P., L. Qian and C. Iadecola (2005). "Nitric oxide inhibits caspase activation and apoptotic morphology but does not rescue neuronal death." J Cereb Blood Flow Metab **25**(3): 348-357.
- Ziff, E. B. (1997). "Enlightening the postsynaptic density." Neuron **19**(6): 1163-1174.