

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

MECANISMOS PROTECTORES DEL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO EN MODELOS CELULARES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

López Couselo, Federico – LU1072173
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:
Caruso, Carla
Instituto de Investigaciones Biomédicas – UBA-CONICET

Co-Tutor:
Cardozo, Julián
UADE

16 de mayo, 2019



UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Agradecimientos

Agradezco especialmente a mis padres, por acompañarme en esta carrera y por apoyarme toda la vida. A Cristina por estar junto a mí en este camino desde el principio y ser un apoyo incondicional.

Quiero agradecerles a Carla, que confió en mí para realizar este trabajo, y a Julieta que me capacitaron y acompañaron, con paciencia y dedicación, para que este proyecto pueda ser concretado. También les agradezco al resto del equipo de laboratorio, Daniela, Delia, Juan, Lila y Mercedes que me apoyaron en este trabajo.

Resumen

La enfermedad de Huntington (HD) genera estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y neurotoxicidad que afecta principalmente a neuronas del estriado. El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) genera disfunción mitocondrial y estrés oxidativo de forma similar a lo que ocurre en la HD. Los altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas en la matriz mitocondrial generan estrés oxidativo que se asocia con muerte neuronal. La línea celular ST14A-Q120, que deriva de neuronas embrionarias del estriado que expresan un fragmento de la huntingtina humana mutada, son más susceptibles a la muerte por 3-NP que las células ST14A-Q15, que expresan un fragmento de la huntingtina humana normal. Las proteínas desacoplantes (UCP) son transportadores de protones de la membrana mitocondrial interna que desacoplan la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa. UCP4, que se expresa en astrocitos, parece estar involucrada en la reducción de las ROS mitocondriales y la sobreexpresión de UCP4 protege a las neuronas de la disfunción mitocondrial. Anteriormente, hemos demostrado que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) reduce los niveles de ROS y previene la muerte celular inducida por 3-NP en astrocitos. En el presente trabajo, estudiamos los efectos del BDNF sobre la viabilidad celular, producción de ROS y expresión de UCP4 específicamente en astrocitos de estriado, y en las líneas neuronales ST14A-Q15 y ST14A-Q120. Encontramos que el BDNF tiene un efecto protector sobre la muerte inducida por 3-NP en astrocitos de estriado y en células ST14A-Q120. A su vez, el BDNF reduce el aumento de niveles de ROS inducido por 3-NP en astrocitos de estriado, efecto que también se observa en células ST14A-Q120. Los niveles de expresión de UCP4 fueron determinados en astrocitos de estriado y de corteza. Demostramos que, en ambas poblaciones de astrocitos, el BDNF por sí solo aumenta la expresión de UCP4 mientras que el 3-NP induce una marcada reducción. En presencia de BDNF, el efecto inhibitorio sobre UCP4 del 3-NP no se observa. En conclusión, el BDNF protege a los astrocitos de estriado de la toxicidad generada por 3-NP disminuyendo los niveles de ROS y probablemente aumentando la expresión de UCP4. Esto se observa también en células ST14A-Q120. Estos efectos podrían representar nuevos mecanismos de acción de la protección mediada por BDNF.

Abstract

Huntington disease (HD) promotes oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurotoxicity that primarily affect striatal neurons. 3-nitropropionic acid (3-NP), generates mitochondrial dysfunction and oxidative stress as it occurs in HD. High levels of reactive oxygen species (ROS) produced in the mitochondrial matrix generate oxidative stress which is associated with neuronal death. The ST14A-Q120 cell line, which derives from embryonic striatal neurons that express a fragment of the mutant human huntingtin, are more susceptible to death by 3-NP than the ST14A-Q15 cells that express a fragment of the normal human huntingtin. Uncoupling proteins (UCP) are proton transporters of the inner mitochondrial membrane that uncouple the electron transport chain from oxidative phosphorylation. UCP4, which is expressed in astrocytes, seems to be involved in the reduction of mitochondrial ROS levels and UCP4 overexpression protects neurons from mitochondrial dysfunction. We have previously shown that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) reduces ROS levels and prevents cell death induced by 3-NP in astrocytes. Now, we studied BDNF effect on viability, ROS production and UCP4 expression in striatal astrocytes, ST14A-Q15 and ST14A-Q120 neuronal cell lines. We found that BDNF had a protective effect on 3-NP-induced death of striatal astrocytes and a selectively protective effect in ST14A-Q120 cells. Also, BDNF reduces the increase in ROS levels induced by 3-NP in striatal astrocytes and ST14A-Q120 cells. UCP4 protein levels were determined in cortical and striatal astrocytes. We show that, in both astrocyte populations, BDNF per se increased UCP4 expression whilst 3-NP alone markedly reduced it. In the presence of BDNF, 3-NP inhibitory effect on UCP4 expression is not observed. In conclusion, we show that BDNF protects striatal astrocytes from 3-NP toxicity by reducing ROS levels and probably by increasing UCP4 expression. This is also observed in ST14A-Q120 cells. These effects could represent new mechanisms of action of BDNF protection.

Contenidos

1. Introducción	7
1.1. Enfermedad de Huntington	7
1.2. Astrocitos	9
1.3. Línea ST14A	10
1.4. Disfunción mitocondrial	10
1.5. El BDNF	11
1.6. Objetivos	13
2. Antecedentes	14
3. Hipótesis	17
4. Metodología	18
4.1. Materiales	18
4.2. Cultivos primarios de astrocitos	18
4.3. Caracterización de las poblaciones de astrocitos	19
4.4. Líneas celulares	20
4.5. Determinación de la viabilidad celular por el ensayo de exclusión de azul de tripán	20
4.6. Determinación de niveles de especies reactivas de oxígeno	20
4.7. Extracto de proteínas mitocondriales	21
4.8. Western blot	21
4.9. Plásmido mi-ARN	22
4.9.1. Descripción del plásmido	22
4.9.2. Transformación de bacterias competentes y amplificación del plásmido	23
4.9.3. Aislamiento del plásmido	23
4.9.4. Medición de la concentración del plásmido purificado	23
4.9.5. Digestión con enzimas de restricción	24
4.9.6. Electroforesis en gel de agarosa	24
4.10. Transfección de astrocitos	24
4.11. Análisis estadístico	25
5. Resultados	26
5.1. Efectos del BDNF en astrocitos	26
5.1.1. Caracterización de poblaciones de astrocitos	26
5.1.2. Efectos del BDNF sobre la viabilidad de astrocitos de estriado	27
5.1.3. Efectos del BDNF sobre la producción de ROS en astrocitos de estriado	27
5.1.4. Efectos del BDNF sobre la expresión de UCP en astrocitos de estriado y de corteza	28
5.1.5. Transfección de astrocitos	29

5.2. Efectos del BDNF en células ST14A	30
5.2.1. Efectos del BDNF sobre la viabilidad de células ST14A	30
5.2.2. Efectos del BDNF sobre los niveles de ROS en células ST14A	31
5.2.3. Efectos del BDNF sobre la expresión de UCP en células ST14A	32
6. Discusión	34
7. Conclusión	37
8. Bibliografía	38

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD, del inglés *Huntington's disease*) es un desorden neurodegenerativo, causado por la expansión de tripletes CAG en el gen de la proteína huntingtina (HTT) lo que genera una versión mutada de la misma (HTTm). Ésta posee una secuencia anormalmente larga de poliglutaminas que le otorga propiedades tóxicas generando disfunción y muerte en neuronas. Si bien la enfermedad afecta a todo el cerebro, las neuronas espinosas medianas del estriado son particularmente vulnerables al daño producido por HTTm (Bates et al. 2015).

La enfermedad es heredable de forma autosómica dominante y la aparición de síntomas se relaciona con la cantidad de repeticiones de CAG y la edad. A mayor número de repeticiones, los síntomas se presentan más tempranamente, siendo la edad media de aparición de síntomas los 40 años; ocurriendo la muerte entre los 15 y 20 años posteriores (Ross y Tabrizi 2011). El número de repeticiones es un polimorfismo en la población normal que se encuentra en un rango de entre 6 y 35 unidades. Cuando este número supera las 40 unidades, la mutación es altamente penetrante y desencadena la enfermedad. Entre 36 y 39 unidades existe una penetrancia disminuida donde algunas personas poseen la enfermedad mientras que otras no lo hacen. La prevalencia de la enfermedad en la población occidental es de entre 10,6 y 13,7 individuos por cada 100.000 (Bates et al. 2015). Según un estudio, en Argentina, la población control tiene un promedio de repeticiones CAG similar al de poblaciones europeas control (Gatto et al. 2012).

Solo algunas de las funciones de la HTT son conocidas hasta el momento; posee un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso embrionario; regula la transcripción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*); es una proteína de andamiaje que se une a los microtúbulos y regula procesos de transporte intracelular; y es necesaria para una correcta formación de sinapsis excitatorias corticales y estriatales. Si bien no se descarta que la pérdida de función en la HTTm sea uno de los mecanismos de patogénesis de la HD, la aparición de nuevas funciones en la proteína mutada es la principal causa de su toxicidad. Algunos de los mecanismos patogénicos (Figura 1) que han sido descritos son: formación de agregados nucleares y citoplasmáticos, formación

de fragmentos tóxicos de la proteína, desregulación de la transcripción de genes esenciales como el del BDNF, modificaciones en la cromatina, disfunción de los sistemas de degradación de proteínas como el proteosoma y la autofagia, alteraciones en la plasticidad sináptica, disfunción mitocondrial que afecta la producción de adenosín trifosfato y genera la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), y disfunción en astrocitos, donde la recaptación de glutamato se ve afectada, y en la microglía que genera moléculas pro-inflamatorias (Jimenez-Sanchez et al. 2017).

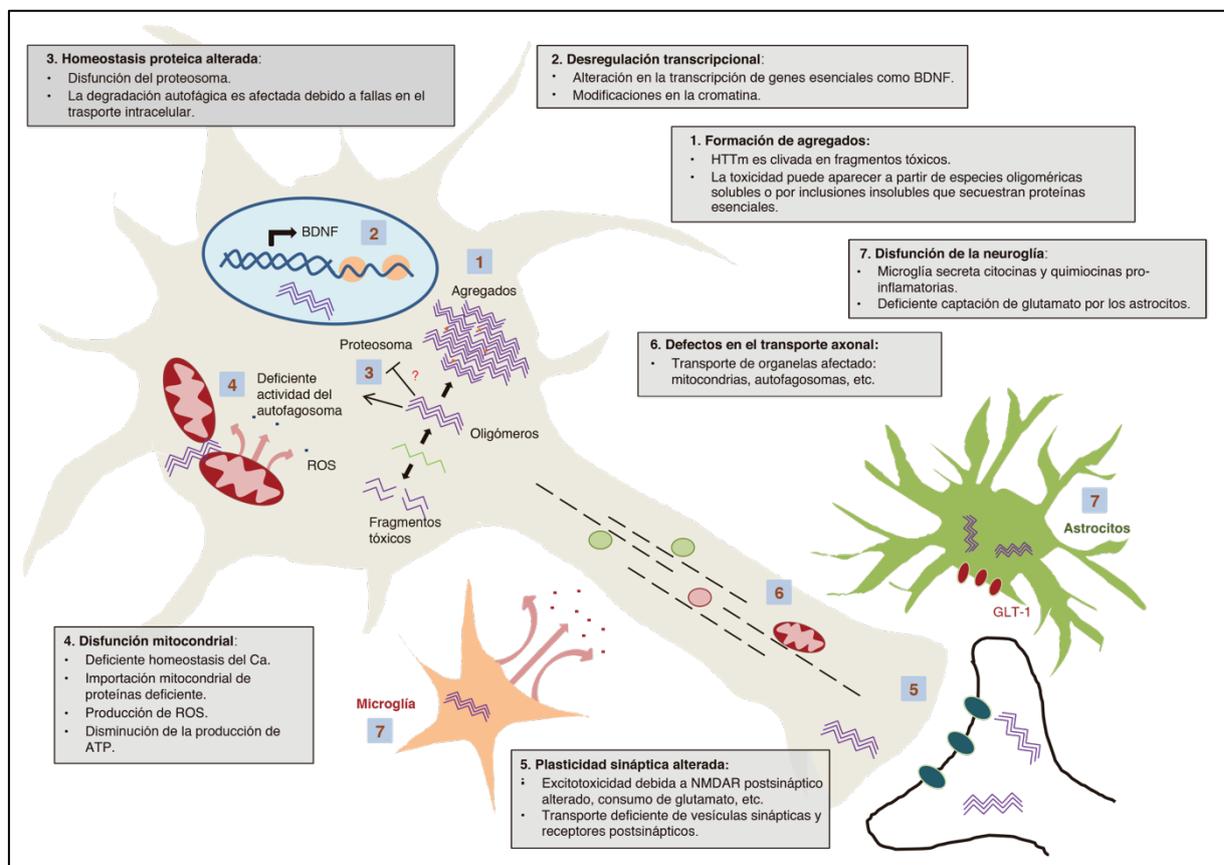


Figura 1. Mecanismos patogénicos de la HD. Adaptado de Jimenez-Sanchez et al. (2017).

Entre los síntomas motores se encuentran, tanto movimientos involuntarios (corea), como falta de movimientos voluntarios, entre los que se incluyen incoordinación y bradiquinesia. Los desórdenes cognitivos pueden aparecer antes que los motores e incluyen: problemas de atención, de planificación y emocionales. El aprendizaje y la captación de nueva información decrecen, pero a diferencia de la enfermedad de Alzheimer, los problemas de memoria no son tan marcados. Los síntomas cognitivos suelen llevar a problemas sociales y

desencadenar características neuropsiquiátricas como depresión, irritabilidad y apatía (Bates et al. 2015).

Sin una cura disponible, y con solo una droga aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos para el tratamiento sintomático de la corea (Bates et al. 2015), el pronóstico de las personas afectadas es devastador, por lo que la identificación de nuevas terapias es de suma importancia.

1.2. Astrocitos

Los astrocitos son el tipo celular más numeroso del sistema nervioso central (SNC) y cumplen un rol clave manteniendo la homeostasis cerebral. Entre sus funciones, contribuyen a la supervivencia de las neuronas y a la formación de las sinapsis durante el desarrollo; forman parte de la barrera hematoencefálica y regulan el flujo sanguíneo del SNC; mantienen la homeostasis de las sinapsis regulando el pH, iones y neurotransmisores; constituyen una reserva de glucógeno; y median la respuesta inmune en el SNC. La proteína fibrilar glial ácida (GFAP, del inglés *glial fibrillary acid protein*) expresada por los astrocitos constituye un marcador para su identificación (Sofroniew y Vinters 2010).

Los astrocitos se activan, en un proceso denominado astrogliosis, junto con la microglía, frente a patógenos o daño tisular donde producen diferentes mediadores pro-inflamatorios como citoquinas y quimiocinas. La neuroinflamación producida por la activación sostenida en el tiempo de los astrocitos es considerada un componente importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Maragakis y Rothstein 2006; Glass et al. 2010). En la HD, se encontró que la astrogliosis es marcada, tanto en pacientes enfermos como en modelos de ratón (Glass et al. 2010). La HTTm se expresa en astrocitos en personas con HD. Ratones transgénicos que expresan HTTm exclusivamente en astrocitos generan síntomas similares a los de la HD, como déficit motor después de un año, y estos ratones mueren a tiempos más largos (Bradford et al. 2009). Los astrocitos que expresan HTTm ven una de sus funciones más importantes afectadas: la recaptación de glutamato, al exhibir menores niveles de expresión de los transportadores de este aminoácido, resultando en un aumento de la muerte neuronal por excitotoxicidad (Shin et al. 2005).

Se ha descrito un rol protector para los astrocitos en la HD dado que el medio condicionado de cultivos de estas células protege de la muerte a neuronas del estriado que

expresan HTTm (Perucho et al. 2013). Teniendo en cuenta esto, entender la participación de los astrocitos en la HD puede aportar nuevos blancos para el tratamiento de la enfermedad.

1.3. Línea ST14A

La línea ST14A derivada de neuronas embrionarias del estriado de rata fue modificada para crear dos líneas que expresan un fragmento de la HTT humana (los primeros 548 aminoácidos), una con 15 tripletes CAG (ST14A-Q15) y otra con 120 tripletes CAG (ST14A-Q120) que representa a la HTTm humana. Estas líneas funcionan como control y modelo de la HD, donde ST14A-Q120 presenta mayor susceptibilidad a la muerte por ácido 3-nitropropiónico (3-NP) y otros tóxicos (Rigamonti et al. 2000). Este modelo puede aportar nuevos mecanismos patogénicos y protectores para la HD.

1.4. Disfunción mitocondrial

Como hemos visto, la disfunción mitocondrial es uno de los mecanismos patogénicos que se observan en la HD. Es por ello que el 3-NP, un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa o complejo II mitocondrial, se utiliza como modelo de la HD ya que, se ha observado que la ingesta o inyección sistémica provoca síntomas similares a los de la enfermedad en ratas, monos y humanos provocando la muerte selectiva de neuronas espinosas medianas del estriado y la alteración de las funciones motoras. Uno de los mecanismos por los cuales el 3-NP genera toxicidad es el aumento en la producción de ROS (Brouillet et al. 2005). En neuronas, altos niveles de ROS, generados principalmente en la matriz mitocondrial, producen estrés oxidativo que se asocia con la muerte neuronal. Por lo tanto, el estudio de la función mitocondrial permitiría encontrar nuevos blancos terapéuticos para la HD. Entre ellos, las proteínas desacoplantes podrían ser un punto de interés.

Las proteínas desacoplantes (UCP, del inglés *uncoupling protein*) son transportadores de solutos de la membrana interna mitocondrial que desacoplan la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa generando transporte de protones desde el espacio intermembrana de vuelta a la matriz mitocondrial e intervienen en la termogénesis y en la regulación del peso corporal. Existen 5 tipos de UCP, entre ellas, UCP3 se expresa principalmente en músculo esquelético y en menor medida en el corazón y en el tejido adiposo multilocular, siendo este último en donde también se expresa principalmente UCP1. (Azzu y Brand 2010). De los 5 subtipos, UCP2 y 4 parecen estar involucrados en la reducción de los

niveles de ROS en la membrana interna mitocondrial (Donadelli et al. 2014; Hass y Barnstable 2016). UCP4 se expresa abundantemente en neuronas, mientras que UCP2 está presente en neuronas inmaduras y desaparece en la madurez (Rupprecht et al. 2014). Se observó que la protección de los astrocitos del estrés oxidativo involucra un aumento en los niveles proteicos de UCP2 (Lapp, Zhang y Barnstable 2014). La sobreexpresión de UCP4 y UCP5 en astrocitos reduce la liberación basal de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y aumenta la supervivencia neuronal (Donadelli et al. 2014). En la HD se observó una disminución en la expresión de genes del metabolismo y del estrés oxidativo entre los que se encontraba UCP2 (Chang et al. 2012).

1.5. El BDNF

El BDNF forma parte de la familia de las neurotrofinas, estas proteínas son mayormente conocidas por su participación en procesos de desarrollo, diferenciación y supervivencia neuronal (Lewin y Barde 1996). El BDNF se sintetiza como un precursor (pro-BDNF) que luego se cliva dentro de la célula para después dimerizarse y actuar así como ligando (Noble et al. 2011). Induce sus efectos a través de dos tipos de receptores (Figura 2): el receptor quinasa relacionado con la tropomiosina tipo B (TrkB-FL, del inglés *tropomyosin receptor kinase B full-length*), al cual BDNF se une con alta afinidad, y el receptor de neurotrofinas p75NTR, al cual se unen todas las neurotrofinas con baja afinidad (Thiele, Li y McKee 2009). Además, existen dos isoformas truncadas de TrkB (TrkB-T1 y TrkB-T2), generadas por empalme alternativo, a las que les falta el dominio tirosina quinasa intracelular por lo que se creía que no pueden transducir señales intracelulares (Luberg et al. 2010). Sin embargo, TrkB-T1 media algunos efectos del BDNF en astrocitos, donde se expresa abundantemente (Ohira et al. 2005; Saba et al. 2018).

Algunas de sus funciones son, promover el desarrollo de neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y GABAérgicas (Connor y Dragunow 1998), e inducir la neurogénesis en adultos (Hsiao et al. 2014). A su vez, participa en procesos que atenúan el apetito (Lapchak y Hefti 1992) y en procesos de plasticidad sináptica asociados con el aprendizaje y la memoria (Alonso et al. 2002). Se han descrito también efectos protectores en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Nagahara y Tuszynski 2011). Sin embargo, los niveles endógenos del BDNF se encuentran reducidos en enfermedades como Alzheimer (Connor y Dragunow 1998), Parkinson (Mogi et al. 1999) y en la HD donde también se observa una disminución de la expresión de sus receptores (Zuccato, Valenza y Cattaneo 2010).

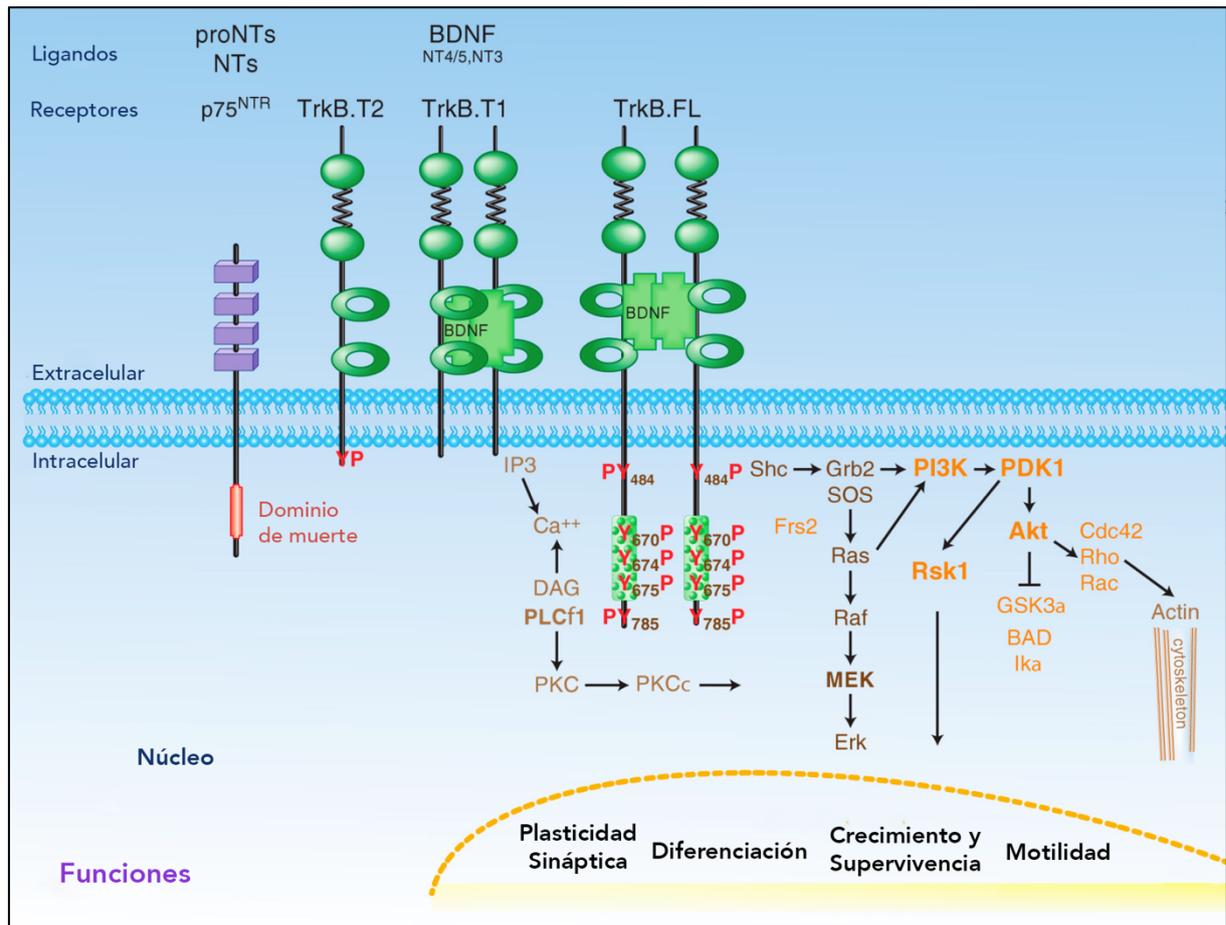


Figura 2. Receptores de BDNF y sus vías de señalización. Adaptada de Thiele, Li y McKee (2009).

Los astrocitos liberan BDNF que estimula la supervivencia neuronal (Arregui et al. 2011) e induce el crecimiento de neuritas en cultivos de neuronas de corteza (Deumens et al. 2006). La administración de BDNF en los ventrículos cerebrales inhibe la activación de astrocitos y microglía inducida en un modelo de isquemia global en ratas y reduce a su vez la expresión de enzimas pro-inflamatorias en el hipocampo, desempeñando así un rol sobre procesos inflamatorios (Kiprianova et al. 1999).

Aún no se conocen completamente los mecanismos protectores utilizados por el BDNF ni la participación de sus receptores en esta acción. Entender estos procesos podría ayudar a diseñar terapias efectivas para frenar la neurodegeneración y la muerte de astrocitos.

1.6. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es determinar los mecanismos protectores del BDNF en un modelo celular de la HD y en astrocitos de estriado. Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Evaluar el efecto del BDNF sobre la viabilidad celular y los niveles de ROS mitocondriales en astrocitos y neuronas ST14A.
2. Evaluar el efecto del BDNF sobre los niveles proteicos de UCP2 y UCP4 en extractos de proteínas mitocondriales de astrocitos y neuronas ST14A.
3. Examinar la participación de las isoformas del TrkB en los efectos del BDNF utilizando un plásmido que expresa un micro-ARN (mi-ARN) para TrkB-T1.

A continuación se describen en antecedentes, los trabajos realizados anteriormente en el área y que se relacionan fuertemente con nuestro estudio, luego se describe la hipótesis y la metodología utilizada para alcanzar los objetivos, seguido de los resultados obtenidos y la discusión de estos; cerrando este trabajo con una conclusión del mismo.

2. Antecedentes

Estudios realizados en nuestro laboratorio (Saba et al. 2018; 2019) indican que el BDNF aumenta la viabilidad de los astrocitos frente a la privación de suero fetal bovino (SFB). El BDNF reduce la muerte celular inducida por la privación de SFB al bloquear la apoptosis. A su vez, se analizó la acción del 3-NP sobre astrocitos y se demostró que, en efecto, éste inhibe la actividad mitocondrial de una manera dosis dependiente (Figura 3A) y disminuye la viabilidad (Figura 3B). En células ST14A el 3-NP disminuye también la viabilidad celular, siendo este efecto más marcado en células ST14A-Q120 (Figura 3C).

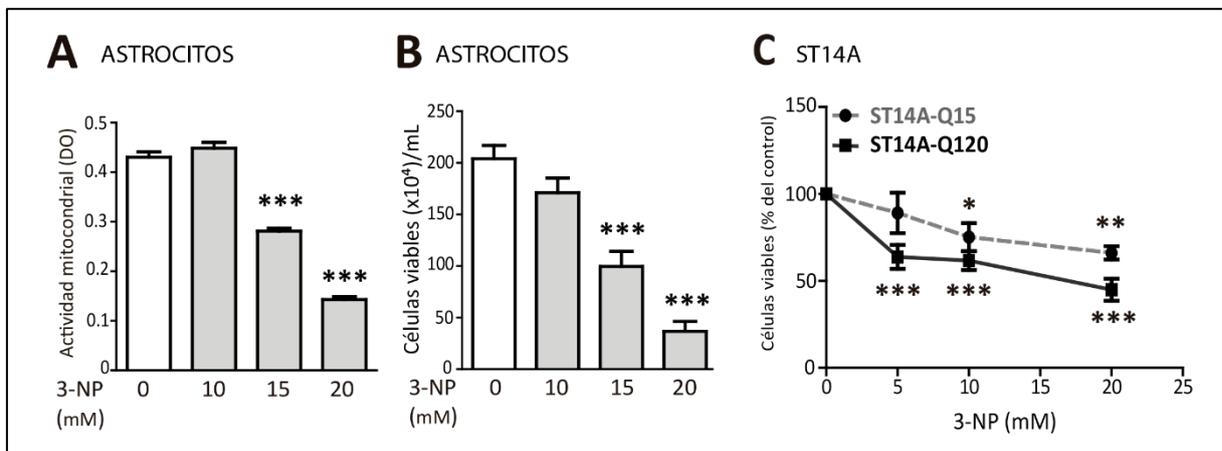


Figura 3. (A) Los astrocitos fueron incubados con 3-NP y después de 24 horas la actividad mitocondrial fue determinada por el ensayo MTT. *** $p < 0,001$ versus el control. (B) La viabilidad de los astrocitos tratados por 24 horas con diferentes dosis de 3-NP fue evaluada por el ensayo de exclusión de azul de tripán. *** $p < 0,001$ versus el control. (A) y (B) fueron adaptadas de Saba et al. (2018). (C) La viabilidad de las células ST14A tratadas con diferentes dosis de 3-NP fue evaluada por el ensayo de exclusión de azul de tripán. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus control. Adaptada de Saba et al. (2019).

Por otro lado, el BDNF protege a los astrocitos totales de la muerte inducida por 3-NP (Figura 4) y también observamos que tiene el mismo efecto en astrocitos de corteza. Los efectos protectores del BDNF fueron bloqueados al utilizar el compuesto ANA-12, un potente y selectivo antagonista de los receptores TrkB que bloquea todas sus isoformas, y K252a, un inhibidor de tirosina quinasas de todos los receptores Trk-FL (Figura 4). Al examinar que isoformas del TrkB expresan los astrocitos se encontró expresión del ARN mensajero (ARNm) de TrkB-FL y TrkB-T1, este último en altos niveles, mientras que los niveles de TrkB-T2 fueron despreciables (Figura 5A). Sin embargo, la expresión proteica por *western blot* muestra que

TrkB-T1 es el principal receptor presente en astrocitos, dado que el TrkB-FL no fue detectado (Figura 5C).

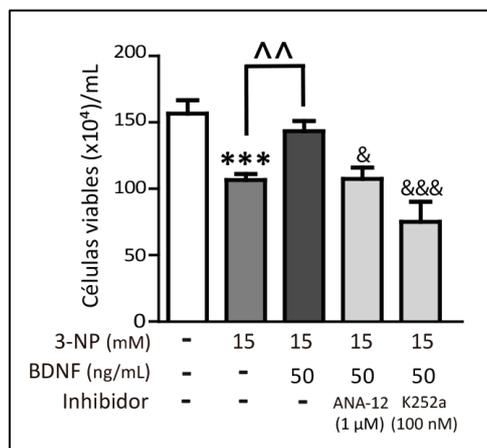


Figura 4. Los astrocitos fueron incubados con 3-NP (15 mM) y BDNF (50 ng/mL) ± los inhibidores ANA-12 (1 μM) y K252a (100 nM) por 24 horas y luego la viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de exclusión de azul de tripán. *** $p < 0,001$ versus el control, ^^ $p < 0,01$ versus 3-NP y & $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$ versus 3-NP + BDNF. Adaptada de Saba et al. (2018).

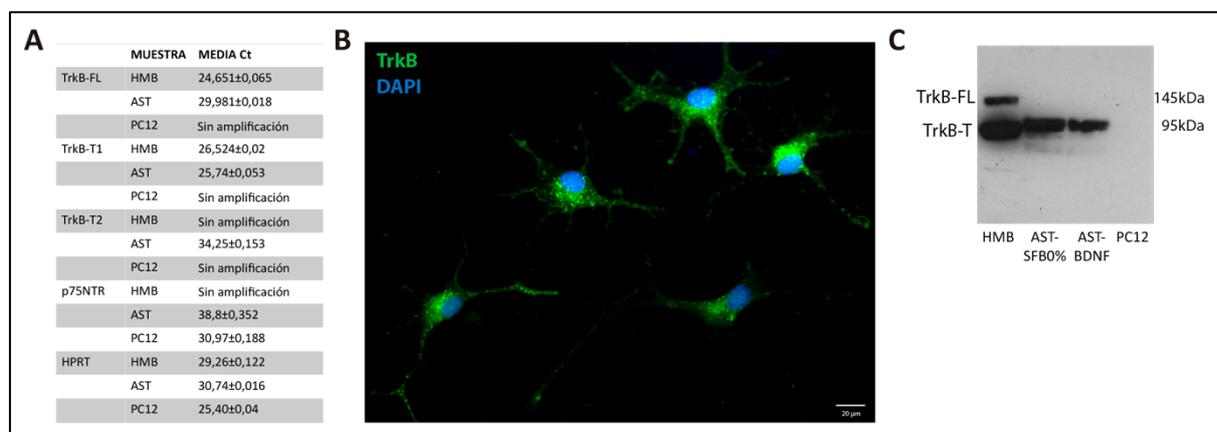


Figura 5. Expresión de los receptores de BDNF en astrocitos. **(A)** Los niveles de ARNm de TrkB-FL, TrkB-T1, TrkB-T2 y p75NTR fueron determinados en un fragmento de hipotálamo (HMB) y en astrocitos (AST) por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real. Las células PC12 fueron utilizadas como control negativo para el TrkB. La media de Cts se muestran para el TrkB-FL, TrkB-T1 y la hipoxantinasguanina fosforibosiltransferasa (HPRT) que se utilizó como control interno. **(B)** Imagen representativa que muestra la expresión de TrkB por la técnica de inmunocitoquímica donde se observan astrocitos positivos para el TrkB (verde) y sus núcleos teñidos con DAPI (azul). **(C)** Los niveles de las proteínas de TrkB-FL (145 kDa) y TrkB-T1 (95 kDa) fueron determinados por *western blot* en el HMB y en astrocitos tratados con 0% SFB (AST-SFB 0%) o con BDNF (AST-BDNF). Las células PC12 fueron utilizadas como control negativo. Adaptada de Saba et al. (2018).

Además, el 3-NP disminuye la función mitocondrial y la viabilidad de la línea neuronal PC12 mientras que el BDNF no tiene efectos sobre esta última dado que no expresa sus receptores. Sin embargo, cuando las células PC12 son incubadas con medio condicionado de astrocitos (MCA) proveniente de astrocitos tratados con BDNF al que se le agrega 3-NP por 24 horas, la muerte celular es prevenida completamente, mientras que el MCA control la previene parcialmente. Esto sugiere que los efectos protectores ejercidos por BDNF en astrocitos inducen de forma indirecta supervivencia neuronal (Figura 6).

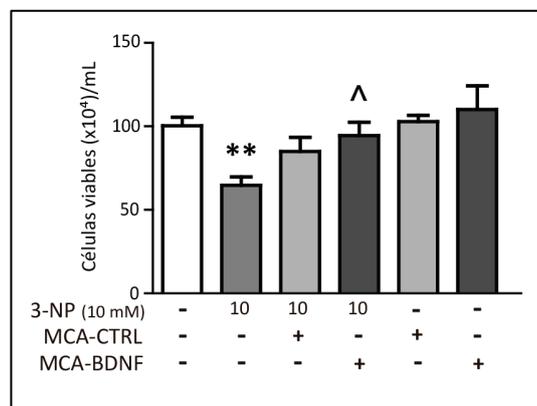


Figura 6. La viabilidad de células PC12 tratadas por 24 horas con 3-NP (10 mM) ± medio condicionado de astrocitos control (MCA-CTRL) o tratados con BDNF (MCA-BDNF) fue evaluada por el ensayo de exclusión de azul de tripán. ** $p < 0,01$ versus el control y $\wedge p < 0,05$ versus 3-NP. Adaptada de Saba et al. (2018).

Finalmente, se demostró que el BDNF tiene efectos antioxidantes en astrocitos de corteza luego de ser tratados con 3-NP, ya que aumenta los niveles de glutatión y disminuye los de ROS (Figura 7).

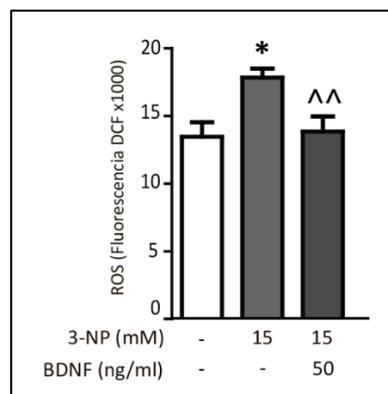


Figura 7. Los astrocitos fueron incubados por 24 horas con 3-NP (15 mM) y BDNF (50 ng/mL) y se determinaron los niveles de ROS. * $p < 0,05$ versus el control y $\wedge\wedge p < 0,01$ versus 3-NP. Adaptada de Saba et al. (2018).

3. Hipótesis

Dado que el BDNF ejerce efectos protectores en astrocitos de corteza, se espera que el BDNF tenga un efecto protector en astrocitos de estriado y neuronas ST14A aumentando la viabilidad frente a la acción del 3-NP.

Esperamos que el BDNF disminuya los niveles de ROS también en astrocitos de estriado y que aumente los niveles de UCP2 y/o UCP4 y que este sea un posible mecanismo por el cual disminuya las ROS y/o aumente la viabilidad celular. También es posible que el 3-NP o la HTTm disminuyan los niveles de UCP4 y aumenten la producción ROS.

Por último, esperamos determinar que receptor está involucrado en las acciones del BDNF. Se espera bloquear los efectos del BDNF con el plásmido que codifica un mi-ARN que disminuye la expresión de TrkB-T1 selectivamente.

4. Metodología

4.1. Materiales

El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*), DMEM/F12, así como los suplementos, antibióticos, tripsina, Opti-MEM y lipoafectamina 3000 fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific (Buenos Aires, Argentina). El medio mínimo esencial (MEM, del inglés *minimum essential medium*), diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y el 3-NP fueron adquiridos de Sigma-Aldrich-Merck (Buenos Aires, Argentina). El SFB fue adquirido de Natocor (Córdoba, Argentina). El BDNF fue comprado en Bachem (California, Estados Unidos). Los anticuerpos anti-UCP2, anti-UCP4, anti-ALDH1L1, anti-HDAC1 y anti- β 3-tubulina se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos) mientras que los anticuerpos anti-UQCRC2, anti-HMGB1 y anti-ratón-HRP en Abcam (Cambridge, Reino Unido), el anticuerpo anti-GFAP en Millipore-Merck (Buenos Aires, Argentina) y el anticuerpo anti-ratón conjugado con Alexa Flúor 488 en Jackson ImmunoResearch (Pensilvania, Estados Unidos).

4.2. Cultivos primarios de astrocitos

Los cultivos primarios se realizaron a partir de ratas Wistar adquiridas en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA) que fueron mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED) a temperatura controlada de 25 °C y con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso a alimento (*lab chow*) y agua *ad libitum*. Fueron criadas en jaulas de metal con un macho y dos hembras por jaula. El uso de animales de laboratorio, así como los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UBA.

Los astrocitos fueron preparados siguiendo el método descrito por Saba et al. (2018) modificado para separar astrocitos de estriado y de corteza. Se realizaron a partir de tejidos cerebrales de ratas de 1 o 2 días de vida de ambos de sexos que fueron decapitadas. Los hemisferios cerebrales fueron disecados y, en el caso de los astrocitos de corteza, se removieron las meninges y se disecó la corteza separándola de las demás regiones. En el caso de los astrocitos de estriado, se realizó un corte coronal en la región anterior de los hemisferios para

exponer el cuerpo estriado el cual fue disecado. En ambos casos, el tejido fue cortado en pequeños fragmentos utilizando un bisturí. Después de la disgregación mecánica a través de una aguja, las células fueron sembradas en botellas de cultivo que, para favorecer la adhesión celular, fueron tratadas previamente con poli-L-lisina (10 µg/mL en *buffer* borato: ácido bórico 0,1 M, borato de sodio 6 mM, pH 8,4) y cultivadas en DMEM/F12, suplementado con SFB 10%, estreptomycin (50 µg/mL) y penicilina (50 U/mL), a 37 °C en una atmósfera con 5% de dióxido de carbono (CO₂). El medio de cultivo fue cambiado por medio fresco dos veces por semana. Luego de 11 a 14 días, los astrocitos fueron separados de la microglía y de los oligodendrocitos a través de agitación por 24 horas en un agitador orbital a 200 rpm. La agitación fue repetida dos veces con un intervalo de 1 a 3 días antes de realizar el subcultivo. Las células fueron tratadas con tripsina (0,83%) y, luego del recuento celular, subcultivadas en placas de 6, 24 (previamente tratadas con poli-L-lisina) o 96 pocillos según el estudio realizar. Luego de 2 a 3 días de estabilización el medio fue reemplazado por DMEM o MEM (este último para la medición de las ROS) suplementado (SFB 0%, L-glutamina 2 mM, estreptomycin 50 µg/mL y penicilina 50 U/mL) para el grupo control. Las células fueron tratadas con BDNF (50 ng/mL), 3-NP (15 mM) o ambos.

4.3. Caracterización de las poblaciones de astrocitos

Se evaluó la marcación de GFAP por inmunocitoquímica en astrocitos de corteza y estriado. Las células se sembraron sobre vidrios previamente tratados con poli-L-lisina en placas de 24 pocillos. Luego, las células fueron lavadas con *buffer* fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) y fijadas en PBS-paraformaldehído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron en PBS-Tritón X-100 (TX) al 0,2% por 5 minutos a temperatura ambiente y luego fueron incubadas en solución de bloqueo formada por PBS-TX 0,1% y suero de cabra 10% por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de esto, se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFAP (dilución 1:400) o anti-ALDH1L1 (dilución 1:50) en *buffer* de dilución conteniendo suero de cabra 1% en PBS-TX 0,1% durante toda la noche a 4 °C. Después de ser lavadas con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 hecho en cabra con una dilución 1:800 en *buffer* de dilución conteniendo PBS-TX 0,1% y suero de cabra 1% por 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas y montadas con medio de montaje que contiene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El control de unión inespecífica se realizó incubando las células con solución

de bloqueo en lugar del anticuerpo primario. La adquisición de imágenes fue realizada utilizando un objetivo 40× de un microscopio de fluorescencia Axiophot Carl Zeiss. Se procesaron las imágenes utilizando el programa ImageJ para obtener la intensidad de fluorescencia verde de GFAP y la misma fue corregida por el número de células por imagen.

4.4. Líneas celulares

Las líneas ST14A-Q15 y ST14A-Q120 fueron adquiridas de Coriell Biorepository (Nueva Jersey, Estados Unidos) y fueron mantenidas en DMEM suplementado con SFB 10%, L-glutamina (2 mM), estreptomicina (100 µg/mL) y penicilina (100 U/mL) a 33 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células fueron tratadas con tripsina (0,25%) y, luego del recuento celular, subcultivadas en placas de 6, 24 o 96 pocillos según el estudio realizar. Luego de 2 a 3 días de estabilización el medio fue reemplazado por DMEM o MEM (este último para la medición de las ROS) suplementado (SFB 0%, L-glutamina 2 mM, estreptomicina 100 µg/mL y penicilina 100 U/mL) para el grupo control. Las células fueron tratadas con BDNF (100 ng/mL), 3-NP (10 mM) o ambos.

4.5. Determinación de la viabilidad celular por el ensayo de exclusión de azul de tripán

Luego del tratamiento, las placas de 24 pocillos con astrocitos o células ST14A fueron lavadas con PBS y tratadas con 50 µL tripsina-EDTA (0.25%). Las células luego fueron resuspendidas en DMEM con SFB 10% y una alícuota de 10 µL fue mezclada con 10 µL de azul de tripán. Las células viables que excluyeron el colorante fueron contadas en una cámara de Neubauer y la viabilidad celular fue expresada en número de células/mL.

4.6. Determinación de niveles de especies reactivas de oxígeno

El compuesto DCFH-DA es un éster no fluorescente que es convertido en diclorofluoresceína (DCF), compuesto fluorescente, por las ROS dentro de la célula. Los astrocitos o células ST14A en placas de 96 pocillos, fueron incubadas con DCFH-DA (10 µM) en MEM por 30 min a 37 °C y luego de dos lavados con PBS fueron tratadas por 24 horas. La fluorescencia emitida fue leída en un fluorómetro Synergy HT a 485 nm/528 nm. Los niveles de ROS se muestran como unidades arbitrarias de fluorescencia por pocillo.

En el caso de las células ST14A los datos fueron ajustados con el ensayo de viabilidad MTT. Luego de la medición de las ROS, se lavaron y se incubaron por 4 horas a 37

°C con *buffer* Krebs con 50 µg de el compuesto MTT disuelto en 10 µL de PBS. Los cristales desarrollados fueron disueltos en 100 µL de HCl 0,04 N en 2-propanol y la densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro de microplacas a 595 nm.

4.7. Extracto de proteínas mitocondriales

Se realizaron extractos de proteínas mitocondriales a partir de astrocitos o células ST14A tratadas en placas de 6 pocillos. Se descartó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. Se trataron las células con tripsina (0.15%) en DMEM a 37 °C por 3 minutos. Luego la tripsina fue inactivada con DMEM suplementado con SFB 10% y las células fueron transferidas a tubos de microcentrífuga para una posterior centrifugación a 5000 g por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células lavadas con PBS y se realizó una segunda centrifugación de 5000 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en *buffer* de lisis (Hepes 10 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM y *cocktail* de proteasas 1:150) y luego homogeneizadas con un homogeneizador de vidrio 10 veces para realizar posteriormente una centrifugación a 1500 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. El sobrenadante se guardó como fracción no mitocondrial, las proteínas mitocondriales se resuspendieron en 10 µL *buffer* de lisis.

4.8. Western blot

Las proteínas obtenidas del extracto mitocondrial (10 µL por grupo) fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) utilizando un gel 15%. La corrida electroforética fue realizada en un *buffer* conteniendo Tris-Base (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,12%), con un pH 8,6 a 200 V. Luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno durante 1 hora a 400 mV en *buffer* de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) en cámara fría. Para verificar la corrida electroforética se tiñeron los geles con azul de Coomassie. La tinción de rojo Ponceau se realizó para verificar la presencia de proteínas en las membranas de fluoruro de polivinilideno. Las membranas se bloquearon por 1 hora con *buffer* tris salino (TBS, del inglés *tris-buffered saline*)-Tween 20 0,1% y leche descremada 1% (para UCP2) o 3% (para UCP4). Las membranas se incubaron con anti-UCP2 con una dilución 1:200 o anti-UCP4 con una dilución 1:300 en TBS-

Tween 20 0,1% y leche descremada 1% (UCP2) o 3% (UCP4) a 4 °C durante toda la noche. Luego de lavar con TBS-Tween 20 0,1%, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo anti-ratón-HRP con una dilución 1:2000 en TBS-Tween 20 0,1% y leche descremada 1% (UCP2) o 3% (UCP4) durante 1 hora a temperatura ambiente. La presencia de las proteínas se reveló utilizando Bio-Lumina, un kit de quimioluminiscencia de PB-L Productos Bio-Lógicos (Buenos Aires, Argentina). Los niveles de UCP4 fueron corregidos por los niveles de la proteína mitocondrial del complejo III UQCRC2 marcados con anti-UQCRC2 (dilución 1:2000). Los extractos mitocondriales se verificaron marcando UQCRC2, β 3-tubulina, una proteína citosólica, HDAC1 y HMGB1, proteínas nucleares, incubando con anti- β 3-tubulina (dilución 1:100), HDAC1 (dilución 1:300) y anti-HMGB1 (dilución 1:30000). La intensidad de las bandas fue determinada por densitometría usando el programa Scion Image.

4.9. Plásmido mi-ARN

4.9.1. Descripción del plásmido

El plásmido pLL-Syn-mi-ARN-Syn-GFP (Figura 8) fue donado por Margarita Díaz-Guerra (Universidad Autónoma de Madrid, España). Posee aproximadamente 8500 pb y fue construido originalmente para expresión viral (Vidaurre et al. 2012). Posee un promotor citomegalovirus (pCMV) y promotores para sinapsina (pSyn) que se expresa preferencialmente en neuronas y codifica un mi-RNA (de aproximadamente 150 pb) que inhibe selectivamente la expresión de TrkB-T1. Entre sus características el plásmido contiene el gen de la resistencia a ampicilina (Amp^R) y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*).

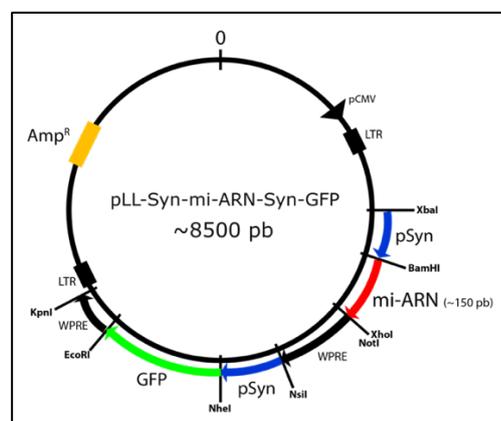


Figura 8. Mapa del vector pLL-Syn-mi-RNA-Syn-GFP.

4.9.2. Transformación de bacterias competentes y amplificación del plásmido

Se utilizó el plásmido para transformar bacterias competentes *Escherichia coli* DH5 α . Se mezclaron 100 μ L de bacterias competentes con 5 ng de plásmido y se incubaron por 60 minutos en hielo. Luego se les realizó un choque térmico al incubarlas por 60 segundos en un baño térmico a 42 °C y a continuación por 2 minutos en hielo. Se les añadió 1 mL de caldo de lisogenia (LB, del inglés *lysogeny broth*) y se incubaron con agitación por 1 hora a 37 °C. Luego de una centrifugación a 4.000 rpm por 30 segundos, las bacterias fueron sembradas en placas de agar-LB con ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas durante toda la noche a 37 °C. Se tomaron 2 o 3 colonias formadas en las placas y se crecieron en tubos separados con 5 mL de LB y ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C con agitación durante toda la noche.

4.9.3. Aislamiento del plásmido

Se realizó el aislamiento del plásmido a partir de bacterias transformadas a través de una minipreparación por lisis alcalina con SDS. Se centrifugó 1,5 mL de bacterias transformadas a 10.000 rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron vortexeadas y se les añadió 0,3 mL de solución 1 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8). Luego de mezclar por inversión e incubar en hielo por 5 minutos se añadió 0,3 mL de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1%). Después de mezclar por inversión e incubar en hielo por 5 minutos se añadió la solución 3 (KAcO 3 M, pH 4,8) y se incubó en hielo por 10 minutos. Se realizó una centrifugación a 10.000 rpm por 15 minutos y 0,7 mL del sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo de microcentrífuga al cual se le añadió 2-propanol a temperatura ambiente, luego de mezclar por inversión se realizó una centrifugación a 10.000 rpm por 30 minutos. Se descartó el sobrenadante, se lavó el tubo con etanol 70% frío y se realizó la última centrifugación a 10.000 rpm por 5 minutos. El líquido se removió con pipeta y se dejó secar el tubo con la tapa abierta aproximadamente 15 minutos y el ADN plasmídico fue resuspendido en 20 μ L de agua bidestilada con 1 μ L de RNasa (10 mg/mL).

4.9.4. Medición de la concentración del plásmido purificado

Se obtuvo la concentración del plásmido purificado a través de la medición de la densidad óptica a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm utilizando un NanoDrop. Se utilizó

2 μ L de agua bidestilada con RNasa como blanco y 2 μ L de plásmido purificado como muestra. Se obtuvo la concentración en mg/ μ L y se verificó la relación 260/280.

4.9.5. Digestión con enzimas de restricción

Se realizó una digestión con enzimas de restricción del plásmido para verificar el tamaño en una reacción conteniendo 1 μ g de plásmido, 1 μ L de enzima NsiI (10 U/ μ L, Thermo-Fischer Scientific), 2 μ L de *buffer* R (10 \times , Thermo-Fischer Scientific) llevado a un volumen final de 20 μ L con agua libre de RNasas e incubando por 2 horas a 37 $^{\circ}$ C.

4.9.6. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0,9% en *buffer* TAE 1 \times (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM). Se sembró 1 μ g de marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen-Thermo Fischer Scientific) o plásmido por calle con la ayuda de *buffer* de carga. Las corridas se realizaron a 80 V por 2 horas.

4.10. Transfección de astrocitos

Los astrocitos cultivados sobre vidrios en placas de 24 pocillos recibieron un cambio de medio por 200 μ L de DMEM/F12 suplementado con SFB 10%. Se agregó 1 μ g de ADN plasmídico junto con 1 μ L de p3000 en un volumen final de 50 μ L de Opti-MEM y se mezclaron con 50 μ L de Opti-MEM conteniendo 1 μ L de lipoafectamina 3000 por cada pocillo. Los astrocitos se incubaron por 4 horas a 37 $^{\circ}$ C. Se realizó un grupo control al cual no se le agregó ADN. Luego el medio fue reemplazado por DMEM/F12 sin SFB y fueron incubados durante toda la noche a 37 $^{\circ}$ C. Las células fueron lavadas con PBS, fijadas en PBS-paraformaldehído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente y montadas con medio de montaje que contiene DAPI. Se realizaron transfecciones con el plásmido pEGFP (5400 pb) que codifica la GFP mejorada (EGFP, del inglés *enhanced GFP*) y con el plásmido que codifica el mi-ARN. La eficiencia de la transfección se verificó utilizando un objetivo 40 \times de un microscopio de fluorescencia Axiophot Carl y se calculó como número de células transfectadas sobre número de células totales.

4.11. Análisis estadístico

El programa GraphPad Prism fue utilizado para realizar el análisis estadístico de los datos experimentales. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar (ES). La diferencia entre las medias fue determinada de acuerdo con cada experimento. Se realizó ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni para los datos de la viabilidad celular y niveles de ROS y se realizó el *test t* de Student para los datos correspondientes a la inmunocitoquímica y el *test t* de una muestra para los datos correspondientes a *western blot*. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de “*p*” fue menor a 0,05.

5. Resultados

5.1. Efectos del BDNF en astrocitos

5.1.1. Caracterización de poblaciones de astrocitos

Se evaluó la expresión de GFAP en astrocitos de estriado y de corteza por inmunocitoquímica (Figura 9A-C). Se observó la presencia de GFAP en ambos tipos de astrocitos, pero se detectaron menores niveles de fluorescencia en los astrocitos de estriado que en los de corteza. La expresión de ALDH1L1, otra proteína marcadora de astrocitos, resultó similar en astrocitos de estriado y de corteza (Figura 9D-E).

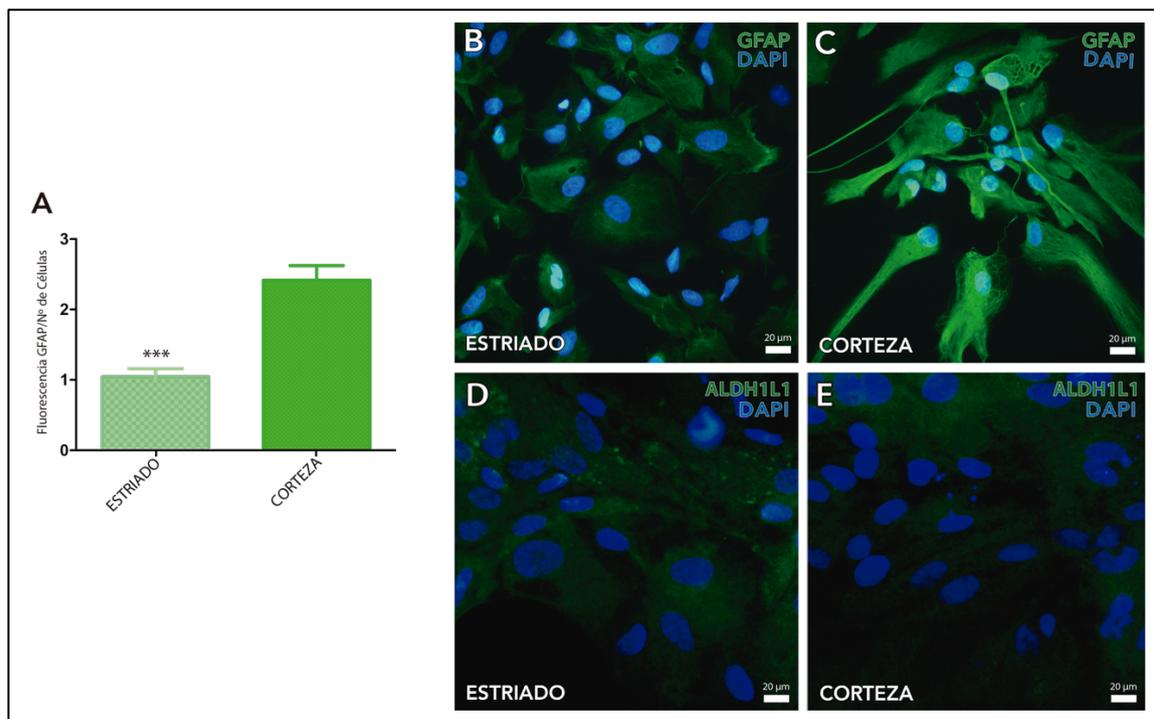


Figura 9. Caracterización de poblaciones de astrocitos. (A) Los niveles de fluorescencia GFAP fueron determinados con el programa ImageJ y normalizados al número de células. Los valores representan la media \pm ES de 10 determinaciones por grupo. Los datos muestran 1 experimento representativo de 3 experimentos independientes que fueron analizados por el *test t* de Student. (***) $p < 0,001$ versus astrocitos de corteza). (B) y (C) Imágenes representativas que muestran la expresión de GFAP por la técnica de inmunocitoquímica donde se observan astrocitos de estriado (B) y de corteza (C) positivos para GFAP (verde) y sus núcleos teñidos con DAPI (azul). (D) y (E) Imágenes representativas que muestran la expresión de ALDH1L1 por la técnica de inmunocitoquímica donde se observan astrocitos de estriado (D) y de corteza (E) positivos para ALDH1L1 (verde) y sus núcleos teñidos con DAPI (azul).

5.1.2 Efectos del BDNF sobre la viabilidad de astrocitos de estriado

Se determinó la viabilidad de astrocitos de estriado por exclusión de azul de tripán (Figura 10). La presencia de BDNF por sí solo no modificó significativamente la viabilidad de los astrocitos. Sin embargo, se observó una disminución en la viabilidad de los astrocitos tratados con 3-NP, que fue revertida por el tratamiento con BDNF.

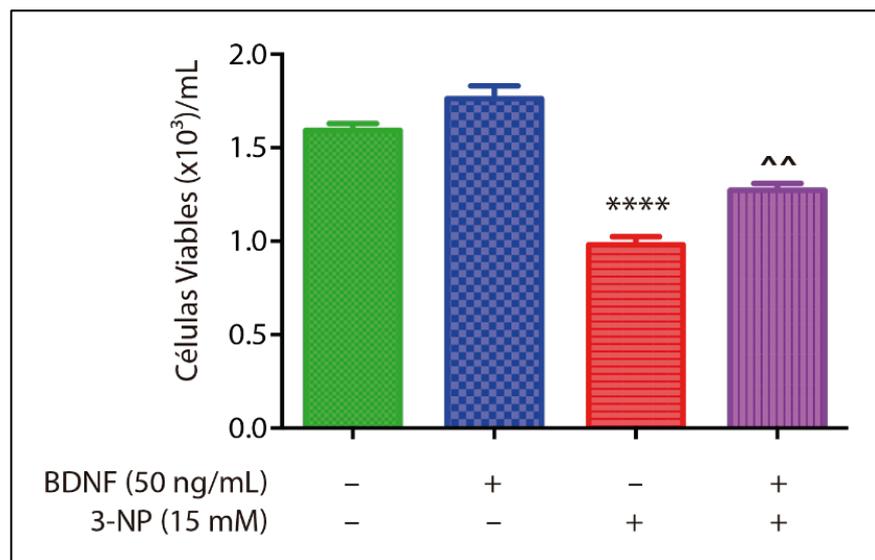


Figura 10. Efecto del BDNF sobre la viabilidad de los astrocitos de estriado. La viabilidad celular fue determinada por exclusión de azul de tripán. Los valores representan la media \pm ES de 6 experimentos independientes y fueron analizados por ANOVA de 1 factor seguido de contrastes de Bonferroni. (**** $p < 0,0001$ versus control; ^^ $p < 0,01$ versus 3-NP).

5.1.3. Efectos del BDNF sobre la producción de ROS en astrocitos de estriado

Se midieron los niveles de ROS en astrocitos de estriado utilizando la sonda fluorescente DCFH-DA (Figura 11). La presencia de BDNF por sí solo no modificó los niveles de ROS en astrocitos. Se observó un aumento de los niveles de ROS luego del tratamiento con 3-NP mientras que la presencia de BDNF revirtió este efecto llevándolos a valores similares al control.

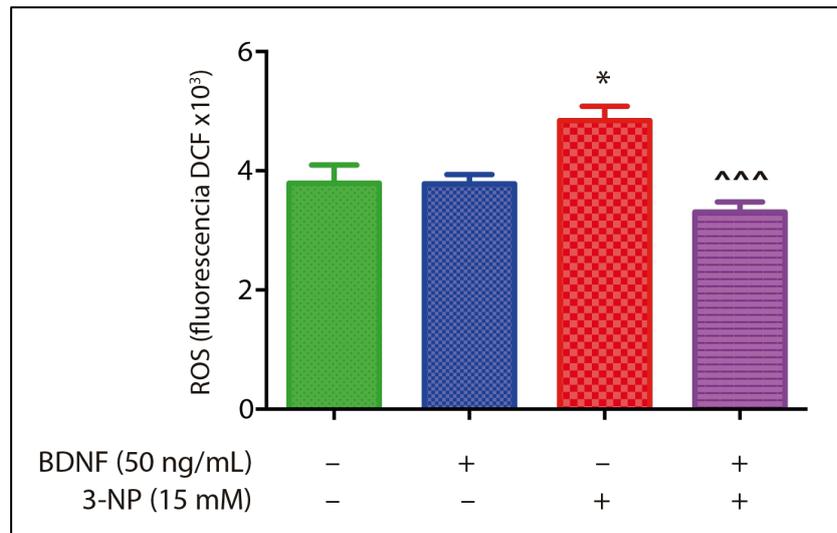


Figura 11. Efecto del BDNF sobre la producción de ROS en astrocitos de estriado. Los niveles de ROS fueron determinados por el ensayo de DCFH-DA. Los valores representan la media \pm ES de 8 determinaciones por grupo. Los datos muestran 1 experimento representativo de 4 experimentos independientes que fueron analizados por ANOVA de 1 factor seguido de contrastes de Bonferroni. (* $p < 0,05$ versus control; ^^^ $p < 0,001$ versus 3-NP).

5.1.4. Efectos del BDNF sobre la expresión de UCP en astrocitos de estriado y de corteza

La expresión proteica de UCP2 no pudo ser detectada en extractos de proteínas mitocondriales provenientes de astrocitos de estriado ni de corteza por *western blot*.

La expresión proteica de UCP4 fue determinada por *western blot* en extractos de proteínas mitocondriales en astrocitos de estriado y de corteza. En ambas poblaciones de astrocitos se observó que la presencia de BDNF por sí solo aumentó la expresión de UCP4 (Figura 12). El tratamiento con 3-NP disminuyó drásticamente la expresión de UCP4 en astrocitos de estriado y corteza (Figura 12). El BDNF revirtió este efecto en las dos poblaciones de astrocitos observándose en ese grupo niveles de expresión similares a los del control (Figura 12).

Además, se verificó la presencia por *western blot* de UQCRC2, una proteína mitocondrial, y de HDAC1, una proteína nuclear, en extractos de proteínas mitocondriales y en la fracción no mitocondrial obtenida durante el proceso de extracción mitocondrial. En el extracto de proteínas mitocondriales se detectó la presencia de UQCRC2 mientras que HDAC1 no fue detectada. Lo contrario se observó en la fracción no mitocondrial, donde HDAC1 fue detectada mientras UQCRC2 no se detectó.

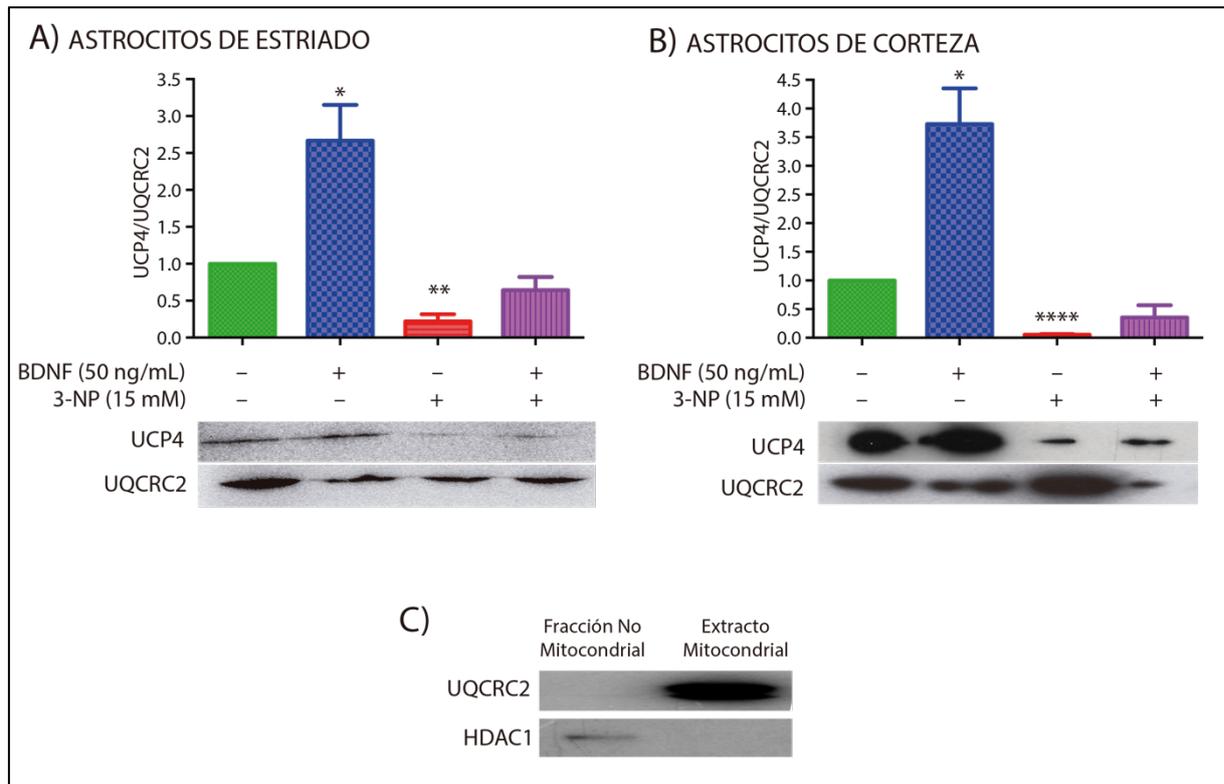


Figura 12. Efecto del BDNF sobre los niveles de UCP4 en astrocitos de **(A)** estriado y de **(B)** corteza. Se muestra el promedio de valores expresados como unidades de incremento de la relación UCP4/UQCRC2 en extractos de proteínas mitocondriales con respecto al grupo control de 5 experimentos independientes para astrocitos de estriado y 4 experimentos independientes para astrocitos de corteza. Se muestra un *blot* representativo de cada caso. Los datos fueron analizados por el *test t* de una muestra. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ versus control). **(C)** *Western blot* de UQCRC2 y HDAC1 en fracción no mitocondrial y extractos de proteínas mitocondriales de astrocitos.

5.1.5. Transfección de astrocitos

El plásmido pLL-Syn-mi-ARN-Syn-GFP expresa un mi-ARN que inhibe la expresión del TrkB-T1. Dado que tiene un pCMV antes del pSyn decidimos transfectarlo en astrocitos para verificar si el pCMV podía dirigir la expresión de GFP, lo cual garantizaría la expresión del mi-ARN. Primero, se realizó una digestión del plásmido pLL-Syn-mi-ARN-Syn-GFP para verificar su tamaño, el cual se encontró en aproximadamente 8500 pb (Figura 13A). La eficiencia de transfección se verificó por fluorescencia en astrocitos transfectados con el plásmido EGFP (Figura 13B) y con el plásmido que codifica el mi-ARN y GFP (Figura 13C). La eficiencia de transfección promedio con el EGFP fue de 44,89% mientras que con el plásmido que codifica el mi-ARN fue de 2,476% (Figura 13D).

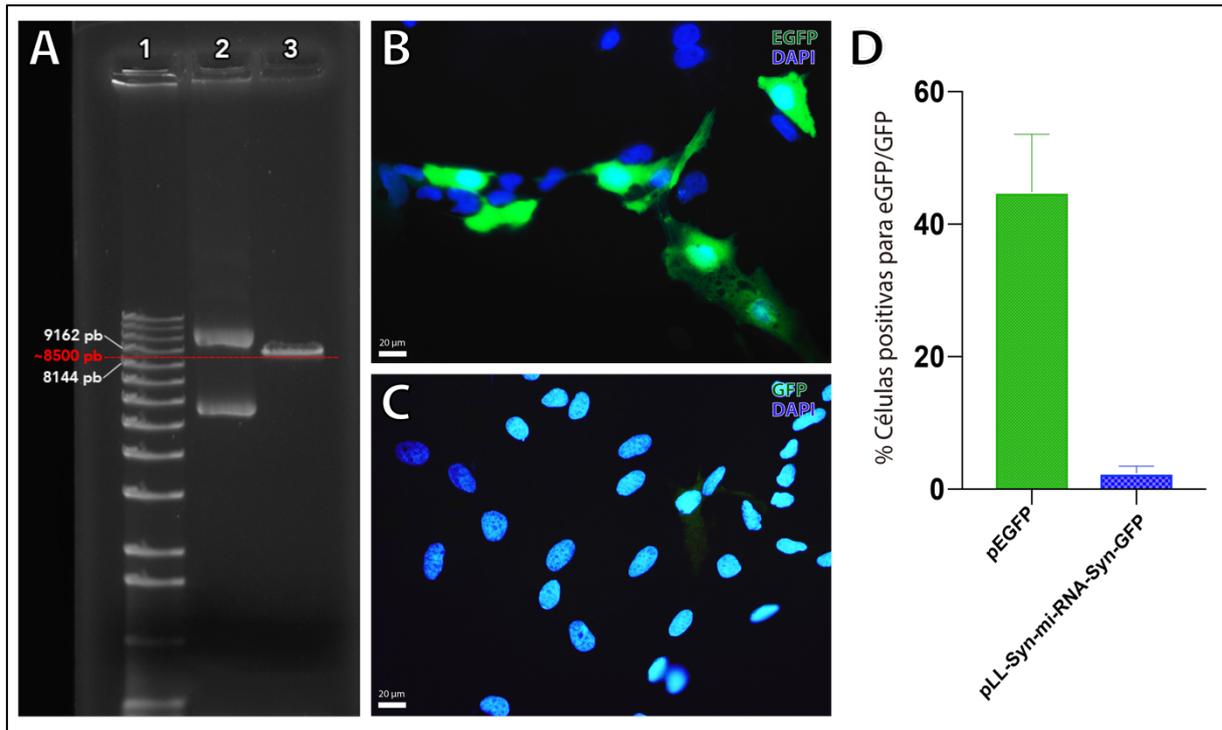


Figura 13. (A) Corrida electroforética en gel de agarosa. Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: pLL-Syn-mi-RNA-Syn-GFP. Calle 3: pLL-Syn-mi-RNA-Syn-GFP digerido con la enzima NsiI. (B) Imagen representativa de la transfección de astrocitos con el plásmido pEGFP. (C) Imagen representativa de la transfección de astrocitos con el plásmido pLL-Syn-mi-RNA-Syn-GFP. (D) Eficiencia de la transfección representada en porcentaje de células positivas para EGFP o GFP.

Debido a la baja eficiencia de transfección obtenida con el plásmido pLL-Syn-mi-ARN-Syn-GFP no se utilizó este plásmido para examinar la participación de las isoformas de TrkB.

5.2. Efectos del BDNF en células ST14A

5.2.1. Efectos del BDNF sobre la viabilidad de células ST14A

Se determinó la viabilidad de las líneas ST14A-Q15 y ST14A-Q120 por exclusión de azul de tripán. La presencia de BDNF por sí solo no modificó significativamente la viabilidad de las líneas celulares. En el caso de la línea ST14A-Q15 el tratamiento con 3-NP generó una disminución de la viabilidad celular tanto en ausencia como en presencia de BDNF (Figura 14A). Por otro lado, en la línea ST14A-Q120 se observó también una disminución de la viabilidad celular luego del tratamiento con 3-NP, pero en presencia de BDNF se observó un aumento en la viabilidad comparado al grupo tratado con 3-NP (Figura 14B).

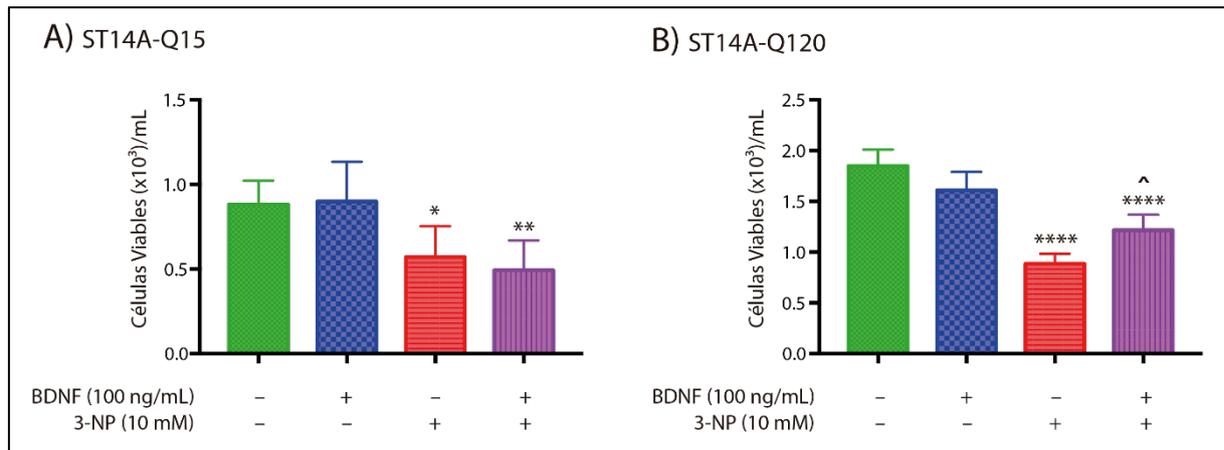


Figura 14. Efecto del BDNF sobre la viabilidad de las líneas ST14A-Q15 (A) y ST14A-Q120 (B). La viabilidad celular fue determinada por exclusión de azul de tripán. Los valores representan la media \pm ES de 6 experimentos independientes para ST14A-Q15 y 5 experimentos independientes para ST14A-Q120 que fueron analizados por ANOVA de 1 factor seguido de contrastes de Bonferroni. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$ versus control; ^ $p < 0,05$ versus 3-NP).

5.2.2. Efectos del BDNF sobre los niveles de ROS en células ST14A

Se midieron los niveles de ROS en las líneas celulares ST14A-Q15 y ST14A-Q120 utilizando la sonda fluorescente DCFH-DA. La presencia de BDNF por sí solo no modificó los niveles de ROS en ninguna de las dos líneas celulares. Por otro lado, se observó un aumento de los niveles de ROS luego del tratamiento con 3-NP mientras que la presencia de BDNF no revirtió este efecto en ST14A-Q15 (Figura 15A) pero si lo revirtió parcialmente en células ST14A-Q120 (Figura 15B).

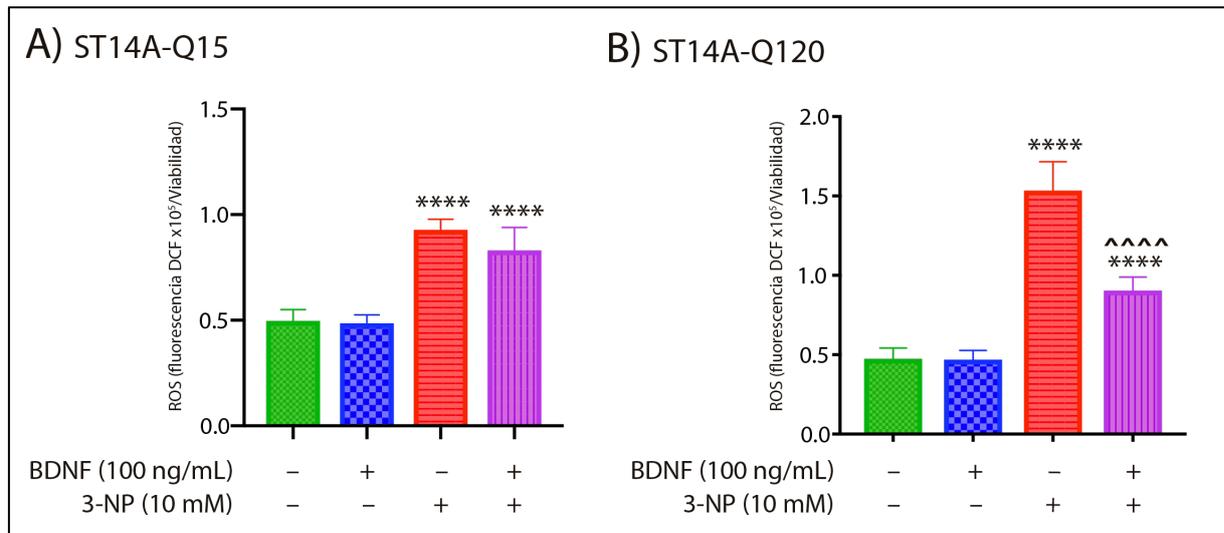


Figura 15. Efecto del BDNF sobre la producción de ROS en células ST14A. Los niveles de ROS fueron determinados por el ensayo de DCFH-DA. Los valores representan la media \pm ES de 8 determinaciones por grupo. Los datos muestran 1 experimento independiente para ST14A-Q15 y 1 experimento representativo de 3 experimentos independientes para ST14A-Q120 que fueron analizados por ANOVA de 1 factor seguido de contrastes de Bonferroni. (**** $p < 0,0001$ versus control; ^^^^ $p < 0,0001$ versus 3-NP).

5.2.3. Efectos del BDNF sobre la expresión de UCP en células ST14A

La expresión proteica de UCP2 no pudo ser detectada en células ST14A por *western blot*. La expresión proteica de UCP4 en células ST14A se redujo notablemente con 3-NP y BDNF revirtió este efecto (Figura 16A). Estos resultados son similares a los obtenidos en astrocitos, sin embargo, son resultados preliminares y deben ser confirmados.

Además, se analizó la presencia por *western blot* de β 3-tubulina, una proteína citosólica del citoesqueleto y HMGB1, una proteína nuclear, en extractos de proteínas mitocondriales y en extractos de proteínas totales de células ST14A. En extractos mitocondriales no se observó la presencia de estas dos proteínas (Figura 16A) mientras que en extractos de proteínas totales ambas fueron detectadas (Figura 16B).

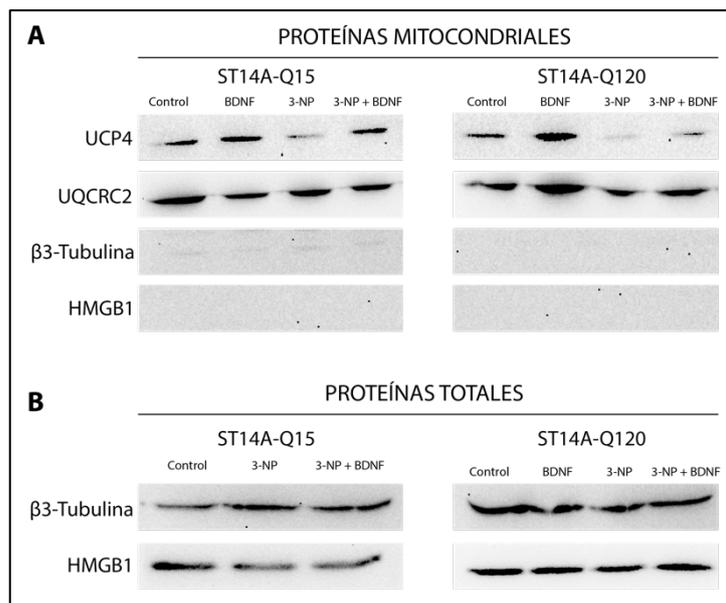


Figura 16. (A) *Western blot* de UCP4, UQCRC2, β 3-tubulina y HMGB1 en extractos de proteínas mitocondriales de células ST14A. **(B)** *Western blot* de β 3-tubulina y HMGB1 en extractos de proteínas totales de células ST14A.

6. Discusión

Los astrocitos son células fundamentales que mantienen la homeostasis del cerebro. La disfunción de los astrocitos afecta funciones neuronales contribuyendo a la neurodegeneración, evidencia que se encuentra en procesos como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y HD (Liu, Teschemacher y Kasparov 2126). Actualmente se reconoce que hay heterogeneidad entre los astrocitos de las distintas regiones del cerebro (Chai et al. 2017). Por lo tanto, en primer lugar, caracterizamos las poblaciones de astrocitos para comparar los cultivos de estriado y de corteza. Observamos que los astrocitos de estriado expresan niveles menores de GFAP, que los astrocitos de corteza, mientras que no varía la expresión de ALDH1L1. Recientemente se encontraron resultados similares en ensayos *in vivo* a través de estudios de transcriptómica y proteómica donde se observó que la expresión de GFAP es menor en astrocitos de estriado que en los de hipocampo que no difieren de los de corteza (Chai et al. 2017). Esto demuestra que los astrocitos en cultivo mantienen características similares a los astrocitos *in vivo*. Conocer las diferencias de una población celular, de diferentes regiones cerebrales, podría ser de interés para entender los mecanismos implicados en patologías donde una región cerebral específica es afectada inicialmente, tal como ocurre con el estriado en la HD.

El BDNF es una neurotrofina esencial para la supervivencia neuronal (Lewin y Barde 1996), que se ve desregulada en la HD (Zuccato, Valenza y Cattaneo 2010) y posee efectos protectores en enfermedades neurodegenerativas (Nagahara y Tuszynski 2011). Nuestros resultados previos indican que el BDNF ejerce efectos protectores en astrocitos a través del TrkB-T1 (Saba et al. 2018). Sin embargo, nada se conoce sobre el efecto del BDNF en astrocitos de estriado. Utilizando cultivos primarios de astrocitos de estriado y de corteza y el 3-NP como modelo de HD evaluamos los efectos del BDNF sobre estas poblaciones celulares. El BDNF posee un efecto protector frente a la muerte inducida por 3-NP en astrocitos de estriado, al igual que ya había sido anteriormente demostrado en astrocitos totales (Saba et al. 2018). Para determinar algunos de los posibles mecanismos por los cuales el BDNF genera este efecto protector analizamos el estrés oxidativo generado por la disfunción mitocondrial, factores que han sido descritos como causantes de la patogénesis de la HD (Jimenez-Sanchez et al. 2017). El BDNF reduce los niveles de ROS generados por la acción del 3-NP en astrocitos del estriado, es decir, posee un efecto antioxidante en esta población celular, disminuyendo así

el estrés oxidativo. Resultados similares fueron descriptos para astrocitos totales (Saba et al. 2018).

Un trabajo demuestra que los astrocitos de estriado son más vulnerables que los corticales a la muerte por 3-NP, lo que se debería a una producción muy elevada de H₂O₂ en las mitocondrias (Misiak et al. 2010). Estos resultados no fueron corroborados por nuestro grupo ya que no encontramos diferencias significativas entre la muerte y la producción de ROS en nuestras condiciones experimentales entre astrocitos de estriado y de corteza.

El BDNF podría mediar la disminución de las ROS a través la sobreexpresión de proteínas mitocondriales como UCP2 y UCP4. Si bien nos fue imposible detectar UCP2 por *western blot*, no descartamos que el BDNF tenga efectos sobre ésta y planeamos analizar a futuro sus niveles de expresión a través de qPCR. Se ha descripto que el *knock-out* de UCP2 y *knock-down* UCP4 genera daño oxidativo y un rápido agotamiento del glutatión, uno de los mayores antioxidantes endógenos (Ho et al. 2012). Nuestros resultados muestran que el 3-NP disminuye fuertemente la expresión de UCP4 mientras que el BDNF por sí solo aumenta la expresión de esta proteína notoriamente tanto en astrocitos de estriado como de corteza. Sin embargo, estos dos efectos parecen competir y obtenemos niveles similares al control al exponer a ambas poblaciones de astrocitos a la presencia de BDNF y 3-NP. Este efecto del BDNF entonces podría evitar el daño oxidativo que se observa ante la disminución de UCP4 y además contribuir a mantener los niveles de glutatión protegiendo de esta manera a los astrocitos frente a la disfunción mitocondrial generada por 3-NP. Este efecto que se vería potenciado también por el aumento de la expresión de xCT inducido por BDNF, una proteína que forma parte del sistema Xc- que importa las cisteínas necesarias para la producción de glutatión, que se correlaciona a su vez con mayores niveles de glutatión en astrocitos (Saba et al. 2018).

Por último, uno de los objetivos de los experimentos en astrocitos era analizar que isoformas del TrkB se involucran en los efectos del BDNF. Resultados anteriores de nuestro laboratorio muestran que el TrkB-T1 es la isoforma expresada en abundancia en astrocitos mientras que no se identifican niveles proteicos detectables de TrkB-FL (Saba et al. 2018). Por lo tanto, creemos que los efectos del BDNF en astrocitos del estriado están mediados por el TrkB-T1. Desafortunadamente, no llegamos a realizar los experimentos con el plásmido que expresa el mi-ARN del TrkB-T1 que hubiera terminado de corroborar esta hipótesis. Creemos que la eficiencia de transfección disminuye por el tamaño del plásmido (Kreiss et al. 1999), que

el promotor de sinapsina no es apropiado para la expresión en astrocitos (Kügler et al. 2003) y que el promotor CMV no dirige la expresión en el vector utilizado por su posición en el mismo. Por lo tanto, estamos en proceso de clonar el mi-ARN en otro plásmido que pueda ser transfectado con mayor eficiencia y que mejore la expresión en astrocitos. Para ello, utilizaremos el plásmido pcDNA3 como vector de destino, de 5400 pb, que posee un promotor CMV inmediatamente corriente arriba del sitio de clonación múltiple, que contiene sitios de restricción para las enzimas XhoI y BamHI (los cuales flanquean al mi-ARN en el vector de origen) y selección para eucariotas con neomicina.

Finalmente, se realizaron experimentos sobre las líneas celulares ST14A para analizar los efectos del BDNF en presencia de 3-NP, pero también de un fragmento de HTTm que se expresa en ST14A-Q120 y utilizando a ST14A-Q15 como control. Los resultados muestran que la línea ST14A-Q15 no es protegida por el BDNF en presencia de 3-NP mientras que la línea ST14A-Q120 responde parcialmente al efecto protector del BDNF. Esto es interesante ya que, al ser la línea ST14A-Q120 la que posee la mutación de la HD, esta se ve mayormente beneficiada por el BDNF como posible agente terapéutico. De forma similar, solo en la línea ST14A-Q120 pudimos observar la disminución parcial de las ROS cuando estas fueron tratadas con BDNF y 3-NP. Este mecanismo podría estar involucrado en el aumento de la viabilidad. Diferencias entre ST14A-Q15 y ST14A-Q120 ya habían sido reportadas (Martire et al. 2013), donde BDNF protege de la muerte inducida por N-metil- D-aspartato solo a ST14A-Q120 y no a ST14A-Q15. La falta de efecto del BDNF sobre las células ST14A-Q15 podría deberse a una menor expresión de los receptores del TrkB que en células ST14A-Q120, una hipótesis que vamos a investigar. Los niveles de UCP2 no pudieron ser detectados por *western blot* al igual que sucedió en astrocitos y se espera poder analizarlos por qPCR en un futuro. Según un experimento preliminar, los niveles de UCP4 en células ST14A parecen disminuir con 3-NP y aumentar con BDNF de forma similar a lo que sucede en astrocitos. Conocer la relación entre los niveles de ROS y las UCP podría ser de importancia para entender la disfunción mitocondrial generada por la HTTm.

7. Conclusión

Nuestros resultados muestran que el BDNF protege a los astrocitos de estriado y a las células ST14A-Q120 de la disfunción mitocondrial inducida por 3-NP. La reducción de los niveles de ROS y el aumento de la expresión de UCP4 podrían representar nuevos mecanismos que participan en la protección mediada por BDNF.

La HD es una enfermedad que, por su carácter genético, los síntomas implicados, la falta de una cura y su pronóstico, es devastadora para las personas que la padecen y sus familias. Esperamos que este trabajo resalte la importancia de los astrocitos en enfermedades neurodegenerativas y fomente el estudio de estos como blancos terapéuticos para la HD y otros desórdenes neurodegenerativos.

8. Bibliografía

ALONSO, M., VIANNA, M., DEPINO, A.M., E SOUZA, T., PEREIRA, P., SZAPIRO, G., VIOLA, H., PITOSI, F., IZQUIERDO, I. y MEDINA, J.H., 2002. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, vol. 12, no. 4, pp. 551-560. ISSN 1098-1063. DOI 10.1002/hipo.10035.

ARREGUI, L., BENÍTEZ, J.A., RAZGADO, L.F., VERGARA, P. y SEGOVIA, J., 2011. Adenoviral Astrocyte-Specific Expression of BDNF in the Striata of Mice Transgenic for Huntington's Disease Delays the Onset of the Motor Phenotype. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 31, no. 8, pp. 1229-1243. ISSN 0272-4340. DOI 10.1007/s10571-011-9725-y.

AZZU, V. y BRAND, M.D., 2010. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 35, no. 5, pp. 298-307. ISSN 0968-0004. DOI 10.1016/j.tibs.2009.11.001.

BATES, G.P., DORSEY, R., GUSELLA, J.F., HAYDEN, M.R., KAY, C., LEAVITT, B.R., NANCE, M., ROSS, C.A., SCAHILL, R.I., WETZEL, R., WILD, E.J. y TABRIZI, S.J., 2015. Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 1, pp. nrdp20155. ISSN 2056-676X. DOI 10.1038/nrdp.2015.5.

BRADFORD, J., SHIN, J.-Y., ROBERTS, M., WANG, C.-E., LI, X.-J. y LI, S., 2009. Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 52, pp. 22480-22485. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.0911503106.

BROUILLET, E., JACQUARD, C., BIZAT, N. y BLUM, D., 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, vol. 95, no. 6, pp. 1521-1540. ISSN 1471-4159. DOI 10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x.

CHAI, H., DIAZ-CASTRO, B., SHIGETOMI, E., MONTE, E., OCTEAU, C.J., YU, X., COHN, W., RAJENDRAN, P.S., VONDRISKA, T.M., WHITELEGGE, J.P., COPPOLA, G. y KHAKH, B.S., 2017. Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron*, vol. 95, no. 3, pp. 531- 549.e9. ISSN 0896-6273. DOI 10.1016/j.neuron.2017.06.029.

CHANG, K.-H., CHEN, Y.-C., WU, Y.-R., LEE, W.-F. y CHEN, C.-M., 2012. Downregulation of Genes Involved in Metabolism and Oxidative Stress in the Peripheral Leukocytes of Huntington's Disease Patients. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, pp. e46492. DOI 10.1371/journal.pone.0046492.

CONNOR, B. y DRAGUNOW, 1998. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research Reviews*, vol. 27, no. 1, pp. 1-39. ISSN 0165-0173. DOI 10.1016/s0165-0173(98)00004-6.

DEUMENS, R., KOOPMANS, G.C., JAKEN, R., MORREN, K., COMHAIR, T., KOSAR, S., STEINBUSCH, H., BAKKER, C. y JOOSTEN, E., 2006. Stimulation of neurite outgrowth on neonatal cerebral astrocytes is enhanced in the presence of BDNF. *Neuroscience Letters*, vol. 407, no. 3, pp. 268-273. ISSN 0304-3940. DOI 10.1016/j.neulet.2006.08.059.

DONADELLI, M., DANDO, I., FIORINI, C. y PALMIERI, M., 2014. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 71, no. 7, pp. 1171-1190. ISSN 1420-682X. DOI 10.1007/s00018-013-1407-0.

GATTO, E., PARISI, V., PERSI, G., CONVERSO, D., ETCHEVERRY, J., VARELA, V., ALBA, L. y FRETCHER, G., 2012. Clinical and genetic characteristics in patients with Huntington's Disease from Argentina. *Parkinsonism & Related Disorders*, vol. 18, no. 2, pp. 166-169. ISSN 1353-8020. DOI 10.1016/j.parkreldis.2011.09.011.

GLASS, C.K., SAIJO, K., WINNER, B., MARCHETTO, M. y GAGE, F.H., 2010. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 918-934. ISSN 0092-8674. DOI 10.1016/j.cell.2010.02.016.

HASS, D.T. y BARNSTABLE, C.J., 2016. Uncoupling protein 2 in the glial response to stress: implications for neuroprotection. *Neural Regeneration Research*, vol. 11, no. 8, pp. 1197-1200. ISSN 1673-5374. DOI 10.4103/1673-5374.189159.

HO, J., HO, P., LIU, H.-F., SO, D., CHAN, K.-H., TSE, Z., KUNG, M., RAMSDEN, D. y HO, S.-L., 2012. UCP4 is a target effector of the NF- κ B c-Rel prosurvival pathway against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 53, no. 2, pp. 383-394. ISSN 0891-5849. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.002.

HSIAO, Y.-H., HUNG, H.-C., CHEN, S.-H. y GEAN, P.-W., 2014. Social Interaction Rescues Memory Deficit in an Animal Model of Alzheimer's Disease by Increasing BDNF-Dependent Hippocampal Neurogenesis. *The Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 49, pp. 16207-16219. ISSN 0270-6474. DOI 10.1523/jneurosci.0747-14.2014.

JIMENEZ-SANCHEZ, M., LICITRA, F., UNDERWOOD, B.R. y RUBINSZTEIN, D.C., 2017. Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 7, no. 7, pp. a024240. ISSN 2157-1422. DOI 10.1101/cshperspect.a024240.

KIPRIANOVA, I., FREIMAN, T.M., DESIDERATO, S., SCHWAB, S., GALMBACHER, R., GILLARDON, F. y SPRANGER, M., 1999. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 56, no. 1, pp. 21-27. ISSN 1097-4547. DOI 10.1002/(sici)1097-4547(19990401)56:1<21::aid-jnr3>3.0.co;2-q.

KREISS, P., MAILHE, P., SCHERMAN, D., PITARD, B., CAMERON, B., RANGARA, R., AGUERRE-CHARRIOL, O., AIRIAU, M. y CROUZET, J., 1999. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Research*, vol. 27, no. 19, pp. 3792-3798. ISSN 0305-1048. DOI 10.1093/nar/27.19.3792.

KÜGLER, S., LINGOR, P., SCHÖLL, U., ZOLOTUKHIN, S. y BÄHR, M., 2003. Differential transgene expression in brain cells in vivo and in vitro from AAV-2 vectors with small transcriptional control units. *Virology*, vol. 311, no. 1, pp. 89-95. ISSN 0042-6822. DOI 10.1016/s0042-6822(03)00162-4.

LAPCHAK, P.A. y HEFTI, F., 1992. BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *NeuroReport*, vol. 3, no. 5, pp. 405-408. ISSN 0959-4965. DOI 10.1097/00001756-199205000-00007.

LAPP, D.W., ZHANG, S.S. y BARNSTABLE, C.J., 2014. Stat3 mediates LIF-induced protection of astrocytes against toxic ROS by upregulating the UPC2 mRNA pool. *Glia*, vol. 62, no. 2, pp. 159-170. ISSN 1098-1136. DOI 10.1002/glia.22594.

LEWIN, G.R. y BARDE, Y.-A., 1996. Physiology of the Neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 19, no. 1, pp. 289-317. ISSN 0147-006x. DOI 10.1146/annurev.ne.19.030196.001445.

LIU, B., TESCHEMACHER, A. y KASPAROV, S., 2016. Neuroprotective potential of astroglia. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 95, no. 11, pp. 2126-2139. ISSN 1097-4547. DOI 10.1002/jnr.24140.

LUBERG, K., WONG, J., WEICKERT, C. y TIMMUSK, T., 2010. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *Journal of Neurochemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 952-964. ISSN 1471-4159. DOI 10.1111/j.1471-4159.2010.06662.x.

MARAGAKIS, N.J. y ROTHSTEIN, J.D., 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, vol. 2, no. 12, pp. 679-689. ISSN 1745-834X. DOI 10.1038/ncpneuro0355.

MARTIRE, A., PEPPONI, R., DOMENICI, M., FERRANTE, A., CHIODI, V. y POPOLI, P., 2013. BDNF prevents NMDA-induced toxicity in models of Huntington's disease: the effects are genotype specific and adenosine A2A receptor is involved. *Journal of Neurochemistry*, vol. 125, no. 2, pp. 225-235. ISSN 1471-4159. DOI 10.1111/jnc.12177.

MISIAK, M., SINGH, S., DREWLO, S., BEYER, C. y ARNOLD, S., 2010. Brain region-specific vulnerability of astrocytes in response to 3-nitropropionic acid is mediated by cytochrome c oxidase isoform expression. *Cell and Tissue Research*, vol. 341, no. 1, pp. 83-93. ISSN 0302-766X. DOI 10.1007/s00441-010-0995-3.

MOGI, M., TOGARI, A., KONDO, T., MIZUNO, Y., KOMURE, O., KUNO, S., ICHINOSE, H. y NAGATSU, T., 1999. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, vol. 270, no. 1, pp. 45-48. ISSN 0304-3940. DOI 10.1016/s0304-3940(99)00463-2.

NAGAHARA, A.H. y TUSZYNSKI, M.H., 2011. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, no. 3, pp. 209. ISSN 1474-1784. DOI 10.1038/nrd3366.

NOBLE, E.E., BILLINGTON, C.J., KOTZ, C.M. y WANG, C., 2011. The lighter side of BDNF. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 300, no. 5, pp. R1053-R1069. ISSN 0363-6119. DOI 10.1152/ajpregu.00776.2010.

OHIRA, K., KUMANOGOH, H., SAHARA, Y., HOMMA, K.J., HIRAI, H., NAKAMURA, S. y HAYASHI, M., 2005. A Truncated Tropo-Myosine-Related Kinase B Receptor, T1, Regulates Glial Cell Morphology via Rho GDP Dissociation Inhibitor 1. *The Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 6, pp. 1343-1353. ISSN 0270-6474. DOI 10.1523/jneurosci.4436-04.2005.

PERUCHO, J., CASAREJOS, M., GÓMEZ, A., RUÍZ, C., FERNÁNDEZ-ESTEVEZ, M., MUÑOZ, M., DE YÉBENES, J. y MENA, M., 2013. Striatal Infusion of Glial Conditioned Medium Diminishes Huntingtin Pathology in R6/1 Mice. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, pp. e73120. DOI 10.1371/journal.pone.0073120.

RIGAMONTI, D., BAUER, J.H., DE-FRAJA, C., CONTI, L., SIPIONE, S., SCIORATI, C., CLEMENTI, E., HACKAM, A., HAYDEN, M.R., LI, Y., COOPER, J.K., ROSS, C.A., GOVONI, S., VINCENZ, C. y CATTANEO, E., 2000. Wild-Type Huntingtin Protects from Apoptosis Upstream of Caspase-3. *Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 10, pp. 3705-3713. ISSN 0270-6474. DOI 10.1523/jneurosci.20-10-03705.2000.

ROSS, C.A. y TABRIZI, S.J., 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 1, pp. 83-98. ISSN 1474-4422. DOI 10.1016/s1474-4422(10)70245-3.

RUPPRECHT, A., SITTNER, D., SMORODCHENKO, A., HILSE, K.E., GOYN, J., MOLDZIO, R., SEILER, A.E., BRÄUER, A.U. y POHL, E.E., 2014. Uncoupling Protein 2 and 4 Expression Pattern during Stem Cell Differentiation Provides New Insight into Their Putative Function. *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, pp. e88474. DOI 10.1371/journal.pone.0088474.

SABA, J., CARNIGLIA, L., RAMÍREZ, D., TURATI, J., IMSEN, M., DURAND, D., LASAGA, M. y CARUSO, C., 2019. Melanocortin 4 receptor activation protects striatal neurons and glial cells from 3-nitropropionic acid toxicity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 94, no. Nat. Rev. Dis. Primers 1 2015, pp. 41-51. ISSN 1044-7431. DOI 10.1016/j.mcn.2018.12.002.

SABA, J., TURATI, J., RAMÍREZ, D., CARNIGLIA, L., DURAND, D., LASAGA, M. y CARUSO, C., 2018. Astrocyte truncated tropomyosin receptor kinase B mediates brain-derived neurotrophic factor anti-apoptotic effect leading to neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*, vol. 146, no. 6, pp. 686-702. ISSN 0022-3042. DOI 10.1111/jnc.14476.

SHIN, J.-Y., FANG, Z.-H., YU, Z.-X., WANG, C.-E., LI, S.-H. y LI, X.-J., 2005. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The Journal of Cell Biology*, vol. 171, no. 6, pp. 1001-1012. ISSN 0021-9525. DOI 10.1083/jcb.200508072.

SOFRONIEW, M.V. y VINTERS, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, vol. 119, no. 1, pp. 7-35. ISSN 0001-6322. DOI 10.1007/s00401-009-0619-8.

THIELE, C.J., LI, Z. y MCKEE, A.E., 2009. On Trk—The TrkB Signal Transduction Pathway Is an Increasingly Important Target in Cancer Biology. *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 19, pp. 5962-5967. ISSN 1078-0432. DOI 10.1158/1078-0432.ccr-08-0651.

VIDAURRE, Ó.G., GASCÓN, S., DEGRACIAS, R., BRADO, CUADRADO, E., MONTANER, J., RODRÍGUEZ-PEÑA, Á. y AZ-GUERRA, 2012. Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death & Disease*, vol. 3, no. 1, pp. e256. ISSN 2041-4889. DOI 10.1038/cddis.2011.143.

ZUCCATO, C., VALENZA, M. y CATTANEO, E., 2010. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiological Reviews*, vol. 90, no. 3, pp. 905-981. ISSN 0031-9333. DOI 10.1152/physrev.00041.2009.