



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

**MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES DE LA
NEUROPROTECCIÓN E PLASTICIDAD INDUCIDA POR
FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO**

CARLOS HENRIQUE VIEIRA MELO

Doctoral Thesis in Neurosciences

2013

**MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES DE LA
NEUROPROTECCIÓN E PLASTICIDAD INDUCIDA POR
FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO**

Tesis de candidatura doctoral,
Departamento de Neurociencias de la
Universidad de Salamanca

Director – D. Carlos Bandeira Duarte

Título de la posición – Profesor Asociado
del Departamento de Ciencias de la Vida de
la Universidad de Coimbra, Portugal

Co-Director – D. Miguel A. Merchán
Cifuentes

Título de la posición – Profesor Catedrático
del Departamento de Neurociencias de la
Universidad de Salamanca, España

Preceptos legales

De conformidad con lo dispuesto en los artículos RD 778/1998, RD 1393/2007 y RD 99/2011, los resultados de los estudios publicados, que fueron utilizados en esta tesis, se indican a continuación. El autor de esta tesis afirma que intervino activamente en el diseño experimental y la ejecución, interpretación de datos y la preparación de los manuscritos publicados, bajo el nombre **MeloC.V.**

Baptista M. S.[#], **Melo C. V.**^{#@}, Armelão M., Herrmann D., Pimentel D. O., Leal G., Caldeira M. V., Bahr B. A., Bengtson M., Ameida R. D., Duarte C. B. (2010) Role of the proteasome in excitotoxicity-induced cleavage of glutamic acid decarboxylase in cultured hippocampal neurons. PLoS One 5(4): e10139.

[#]These authors contributed equally.

[@]Corresponding author.

Melo C. V., Okumoto S., Gomes J. R., Baptista M. S., Bahr A., Frommer W. B., Duarte C. B. (2013) Spatiotemporal resolution of BDNF neuroprotection against glutamate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. Neuroscience 237: 66-86. Cover article.

Melo C. V., Mele M., Curcio M., Silva C. G., Duarte C. B. (2013) BDNF regulates the expression of vesicular glutamate transporters in cultured hippocampal neurons. PLoS One 8(1): e53793.

Este estudio fue co-financiado por la Fundación para la Ciencia y la Tecnología (Fundação para a Ciência e Tecnologia - FCT), Portugal, y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea, a través de la beca doctoral SFRH/BD/29905/2006, y subvenciones PTDC/SAU-FCF/72283/2006, PTDC/SAL-NEU/104297/2008 y PTDC/SAL-NMC/120144/2010; por la Fundación Calouste Gulbenkian (Fundação Calouste Gulbenkian), a través de una beca de investigación para estudios en el extranjero (Proc. 71949/2005) y la beca para participar en conferencias y / o reuniones científicas internacionales; por la Fundación Luso-Americana (Fundação Luso-Americana - FLAD), a través de una beca para viajes cortos en el extranjero.

ÍNDICE (DE LA TESIS ESCRITA EN INGLÉS)

Preceptos Legales.....	7
Agradecimientos.....	11
Agradecimientos en Inglés.....	12
RESUMEN.....	15
RESUMEN en Inglés	19
ABREVIATURAS.....	23
I INTRODUCCIÓN	26
II Objetivos	95
III. Capítulo 1.....	98
IV. Capítulo 2	100
V. Capítulo 3	102
VI. Conclusiones	104
VII. Perspectivas futuras	106
VIII. Bibliografía	108

RESUMEN

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una proteína de pro-supervivencia con alta expresión en el hipocampo y funciones esenciales en las neuronas durante el desarrollo y en el adulto. El BDNF se une preferentemente a los receptores TrkB, activando las vías de señalización Ras-ERK, PI3K/AKT y PLC γ .

En condiciones fisiológicas, BDNF regula distintos mecanismos implicados en la plasticidad sináptica, mientras que en condiciones patológicas, se ha comprobado que protege de la toxicidad por sobre-excitación del glutamato. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la activación del receptor de BDNF por TrkB con el fin de inducir la protección neuronal no se conocen completamente.

Este estudio buscó abordar estas cuestiones y examinar más a fondo la posible relación entre los mecanismos de neuroprotección y/o la recuperación y los mecanismos de plasticidad sináptica inducidos por BDNF.

En la primera parte del estudio se analizaron las alteraciones moleculares inducidas por excitotoxicidad, centrándose en la reducción de la descarboxilasa del ácido glutámico, que es probable que afecte la transmisión sináptica inhibitoria. En este trabajo demostramos que la estimulación excitotóxica de cultivos neuronales del hipocampo con glutamato causa la escisión N-

terminal de las isoformas de la descarboxilasa de glutamato GAD65 y GAD67, tras la ubiquitinación y degradación de una pareja de unión desconocida por el proteosoma.

Nosotros observamos en cultivos de neuronas una disminución significativa de aposiciones (puncta) GAD 65 sobre los axones de las neuronas de hipocampo, lo que está de acuerdo con el análisis bioquímico realizado en extractos de la corteza cerebral y de cerebelo. La relevancia de estos resultados se basa en la demostración de que esta situación podría afectar a la neurotransmisión GABAérgica y el proteosoma actúa en la disregulación de GADs en condiciones de excitotoxicidad además de otros sistemas proteolíticos anteriormente implicados en la excitotoxicidad inducida por glutamato (Para más detalles ver capítulo 1).

En nuestro análisis de la biología celular del proceso de activación de cascadas excitotóxicas prestamos especial interés a la activación diferencial de los tres principales mecanismos proteolíticos (UPS, calpaínas y caspasas) en diferentes compartimentos de la neurona. Además, aportamos datos para la mejor comprensión de las secuencias temporales del efecto protector inducido por BDNF. Estos resultados mostraron una activación temporal diferente de las proteasas así como la segregación espacial en la neurona de estos mecanismos. De este modo comprobamos que la activación inmediata de calpaína es seguida por una disregulación del proteosoma, en los axones y las dendritas.

El proceso de activación de las caspasas se produce más tarde en el cuerpo de la célula y todos los mecanismos proteolíticos disminuyen significativamente por la pre-incubación con BDNF. Sin embargo, los inhibidores del proteasoma y la calpaína no fueron capaces de imitar el efecto protector de la inhibición de caspasas y BDNF en la prevención de condensación de la cromatina. Por el contrario, la inhibición del proteasoma y la calpaína protegió los marcadores neuronales para dendritas (MAP-2), axones (neurofilamentos H) y los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1 y VGLUT2), mientras que la inhibición de caspasas no reprodujo el efecto protector de BDNF en las neuritas y marcadores sinápticos.

Además, inhibidores de la ruta de PLC γ bloquearon significativamente la acción protectora de BDNF en cultivos neuronales del hipocampo, lo que sugiere un mecanismo neuroprotector dependiente de la actividad sináptica.

En consecuencia, el carácter neuroprotector de BDNF en las sinapsis fue analizado utilizando un nanosensor (FRET glutamato) habiendo comprobado que previene parcialmente la reducción de la actividad sináptica excitatoria, tras medir la liberación de glutamato inducida por KCl.

Por lo tanto, nuestra hipótesis es que que la reparación neuronal después de una agresión neuroquímica podría comenzar en el nivel sináptico y BDNF, muy probablemente induciría la recuperación a través de la reactivación de los mecanismos de

plasticidad sináptica que involucran la síntesis de novo de proteínas (Por favor, consulte el capítulo 2).

La hipótesis anterior fue evaluada estudiando el efecto del BDNF sobre la expresión de los VGLUT como un paradigma experimental. De este modo comprobamos que la aplicación exógena de BDNF en cultivos de neuronas del hipocampo durante 7 días (DIV7) aumentó rápidamente los niveles de tanto de ARNm como de proteína VGLUT2 en una forma dosis-dependiente, mientras que la expresión de VGLUT1 también aumentó, pero sólo de forma transitoria.

Por el contrario a DIV14, la aplicación de BDNF aumentó de manera constante la expresión de VGLUT1, mientras VGLUT2 mantuvo unos niveles bajos de expresión. Por otra parte, experimentos de inhibición de la transcripción y traducción - de VGLUT1 y VGLUT2 - bloquearon completamente el efecto inducido por BDNF en el aumento de la expresión de VGLUTs. Experimentos de microscopía de fluorescencia confocal mostraron un incremento transitorio de tráfico axonal de VGLUT1 y la redistribución de vesículas VGLUT-2-positivas en las neuronas de hipocampo. Estos resultados indican que el BDNF también puede afectar a la distribución subcelular de los VGLUTs durante el desarrollo neuronal.

Además pudimos comprobar que la inhibición de los receptores TrkB y de la señalización vía PLC γ bloquean el efecto inducido por BDNF en el aumento de expresión de VGLUTs, lo que sugiere que este factor y su efecto sobre VGLUT1 podría contribuir a mejorar

la liberación de glutamato en la potenciación a largo plazo o LTP (Por favor, consulte el capítulo 3).

En resumen nuestros resultados indican que la neuroprotección mediada por BDNF no se limita al cuerpo celular y a la atenuación de la activación de caspasas.

BDNF también protege significativamente las neuronas de los daños excitotóxicos inducidos en axones, dendritas y sinapsis, que predominantemente conllevan la activación de la calpaína y el aumento de la ubiquitinación de proteínas. Por otra parte, el BDNF activa mecanismos coincidentes tanto en condiciones fisiológicas durante el desarrollo neuronal y tras lesiones inducidas por glutamato (excitotoxicidad).

BDNF promueve, concomitantemente, la conectividad entre las neuronas y neuroprotección por mecanismos de atenuación de la proteólisis y/o la inducción de la expresión de novo de proteínas neuronales, en particular VGLUT1 y VLGUT2.

Proponemos en este trabajo de tesis doctoral que la reactivación de los mecanismos de plasticidad mediados por BDNF durante el desarrollo neuronal pueden permitir atenuar daños neuronales.

Finalmente, BDNF puede disminuir la activación proteolítica y/o inducir la recuperación de las neuronas del hipocampo en condiciones de neurodegeneración.

I INTRODUCCIÓN

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Barde et al., 1982) es una proteína pro-supervivencia altamente expresada en el hipocampo, la amígdala, la corteza cerebral y el hipotálamo (Kato-Semba et al., 1997; Conner et al., 1997; Ernfors et al., 1990). Este miembro de la familia de las neurotrofinas es codificada por el gen BDNF homónima, con múltiples variantes de la transcripción, la transcripción bidireccional, complejo de corte y empalme y varios promotores funcionales, utilizados específicamente en diferentes tejidos y regiones cerebrales (Pruunsild et al., 2007). BDNF se expresa como una proteína precursora de 32-kDa, proBDNF (Lee et al., 2001), que se procesa mediante mecanismos regulados constitutivos o dependiente de la actividad (Goodman et al., 1996; Farhadi et al., 2000; Lessman y Brigadski, 2009), y a través de numerosas modificaciones post-traduccionales, incluyendo N-glicosilación y la escisión en la proteína madura (Mowla et al., 2001). El no covalentemente estable BDNF homodímero se une a receptores relacionados con la tropomiosina quinasa B (TrkB) activación, en paralelo, la Ras-ERK, PI3K/Akt y PLC γ vías de señalización (Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006).

BDNF tiene funciones críticas en las neuronas en desarrollo y adulto, en condiciones fisiológicas y patológicas, ya sea implicados en enfermedades neurológicas genéticos y multifactorial o contribuir para la neuroprotección contra la excitotoxicidad del glutamato y la isquemia (Bramham y Nessaoudi, 2005; Almeida et al., 2005; Cunha et al., 2010; Murray

y Holmes, 2011; Nagahara y Tuszynski, 2011; Gomes et al, 2012 Hartmann et al., 2012; Park & Poo, 2013).

Durante el desarrollo, el BDNF regula la diferenciación neuronal mediante la estimulación de la formación de las conexiones sinápticas apropiadas, controlar de forma concomitante la dirección y la velocidad de crecimiento de los axones (Wang y Poo, 2005; Li et al., 2005), así como la forma de cenadores y las espinas dendríticas (Ji et al, 2005; An et al, 2008; Kwon et al, 2011), y la promoción de la supervivencia de poblaciones neuronales seleccionadas de las sistemas periférica (Oppenheim et al, 1992; Song et al., 2008) y nervioso central (Lindsay et al, 1985; Phillips et al., 1990; Klöcker et al, 2000; Gupta et al., 2009;. Gomes et al, 2012).

En muchas regiones del SNC del adulto, el BDNF no sólo mejora la transmisión excitatoria (Lohof et al., 1993; Levine et al., 1995; Kang y Schuman, 1995, Tyler y Pozzo-Miller, 2001;. Carvalho et al., 2008) sino que también favorece la actividad sináptica inhibitoria con el fin de controlar negativamente a la escala homeostática de la excitabilidad neuronal intrínseca (Desai et al., 1999; Swanwick et al., 2006; Pozo y Goda, 2010). Además, el BDNF regula varias formas de plasticidad sináptica (Vicario-Abejon et al., 1998; Rutherford et al, 1998; Huang et al., 1999;. Minichiello, 2009). En el hipocampo, esta neurotrofina está implicado en el aprendizaje (Linnarsson et al., 1997; Minichiello et al., 1999; Minichiello, 2009) y la memoria (Liu et al., 2004; Beckinschtein et al., 2008a; Beckinschtein et al., 2008b) formación.

BDNF es también esencial para una variedad de respuestas adaptativas neuronales dependientes de la plasticidad a corto plazo (Cirulli et al., 2004; Ninan et al., 2010), al tiempo que facilita la potenciación a largo plazo (LTP) (Korte et al., 1995.; Figurov et al., 1996; Huber et al., 1998; atenuar la depresión a largo plazo (LTD) (Akaneya et al., 1996 Patterson et al., 1996; Kinoshita et al. 1999), mientras que la pro-BDNF tiene la opuesta efecto, facilitando LTD del hipocampo (Woo et al., 2005).

BDNF también está implicado en las enfermedades neurodegenerativas de comienzo tardío más prevalentes (Connor et al., 1997; Canals et al., 2004; Yanpallewar et al., 2012). Los niveles de BDNF disminuido en el hipocampo de la enfermedad de Alzheimer (AD) pacientes (Connor et al., 1997) y déficits de transporte axonal de vesículas BDNF que contienen en ratones con la presenilina-1 mutaciones y tau hiperfosforilada (Peethumnongsin et al., 2010) indican que modulación de la señalización de neurotrofina es un enfoque terapéutico potencial para esta patología.

El aumento de la expresión de BDNF impide la pérdida neuronal, corrige la disfunción motora y mejora el aprendizaje y la plasticidad sináptica del hipocampo en el ratón transgénico (Arancibia et al., 2008; Blurton-Jones et al., 2009) y los primates no humanos (Nagahara et al., 2009) los modelos de la enfermedad de Alzheimer.

El ejercicio aeróbico, lo que aumenta los niveles de BDNF (Neeper et al., 1995), también evita que la disminución en el aprendizaje

espacial y la memoria mediante la mejora de la LTP del hipocampo en un modelo de ratón AD (Liu et al., 2011). Del mismo modo, la disminución de los niveles de BDNF en el cuerpo estriado de la enfermedad de Huntington (HD) pacientes (Ferrer et al., 2000) que expresan huntingtina mutante, lo que perjudica la expresión génica de BDNF (Zuccato et al., 2001) y el transporte vesicular anterógrado de las fibras aferentes cerebrocorticales (Gauthier et al., 2004), puede ser rescatado por la sobreexpresión de BDNF (Xie et al., 2010; Giralt et al., 2011) y fármacos que aumentan la expresión de BDNF (Rigamonti et al., 2007; Simmons et al., 2009).

BDNF señalización también se correlaciona con la etiología de la enfermedad de Parkinson (Mogi et al, 1999; Parain et al., 1999; Collier et al, 2005), esclerosis múltiple (Stadelmann et al., 2002.) Y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Yanpallewar et al., 2012).

BDNF esta adicionalmente vinculado a la respuesta al estrés (Vollmayr et al., 2001) y la biología de los trastornos del estado de ánimo (Hall et al., 2003), especialmente la ansiedad y la depresión (Eisch et al., 2003; Martinowich et al., 2007), la mediación resistencia al estrés crónico (Taliaz et al., 2011).

Variantes BDNF aumentan la susceptibilidad a numerosos trastornos psiquiátricos, por ejemplo, la esquizofrenia (Krebs et al., 2000) y los comportamientos aberrantes alimenticios, incluyendo anorexia nerviosa de tipo restrictivo (Ribases et al., 2003), la bulimia nerviosa 2 (Ribases et al., 2003) y la obesidad grave (Liao et al., 2012). Ratones deficientes en BDNF muestran agresividad

(Lyons et al., 1999), hiperactividad locomotora (Rios et al., 2001), La hiperfagia (Gray et al., 2006; Unger et al., 2007) y la diabetes de tipo 2 (Sha et al., 2007). Además, el BDNF es un regulador crítico de balance de energía (Xu et al., 2003), dolor (Pezet y McMahon, 2006) y adicción a las drogas, la dependencia de opiáceos y la cocaína en particular (Vargas-Pérez et al., 2009; Mao et al., 2009; Lu et al., 2010).

Por el contrario, la aplicación BDNF exógeno rescata diferentes tejidos neurales de las lesiones isquémicas, excitotoxicidad, traumática y tóxica, in vitro e in vivo, tras el tratamiento neurotrófico aguda o a largo plazo, tanto antes como después de la lesión (Coughlan et al., 2009; Pereira et al., 2009; Murray y Holmes, 2011; Noble et al., 2011). In vitro, el BDNF protege cultivó cortical (Hetman et al., 1999; Sun et al., 2008), gránulo cerebelar (Bazán-Peregrino et al., 2007; Wang et al., 2010). Y del hipocampo (Almeida et al., 2005; Johnson-Farley et al., 2007; Gomes et al., 2012) neuronas de la muerte celular por apoptosis a través de la activación de la ERK y PI3K vías de señalización.

BDNF también rescata las neuronas corticales a partir de la privación de oxígeno-glucosa (Ferez et al., 2012) y evita que el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) inducida por la inactivación de la proteína quinasa C (PKC), igualmente proporcionar la máxima protección de la muerte celular cuando se pre-incubada, bien de forma continua durante 8 horas, o transitoriamente entre 8 y 4 horas, antes de la excitotoxicidad de NMDA (Tremblay et al., 1999).

In vivo, a largo plazo (7 días) de infusión intraventricular BDNF comenzando 24 horas (Schabitz et al., 1997) o inmediatamente antes (Beck et al., 1994) la lesión reduce el tamaño del infarto y protege las neuronas CA1 del hipocampo en un modelo de rata de isquemia transitoria del prosencéfalo, respectivamente.

Infusión (Yamashita et al., 1997; (Wu y Pardridge, 1999; Schabitz et al., 2000) vehículo mediada por la administración intravenosa de BDNF en breve (hasta 30 minutos) después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) producir resultados similares neuroprotectores, imitado incluso con retraso en la aplicación intravenosa (hasta 2 horas) de BDNF conjugado a un fármaco barrera sangre-cerebro sistema de focalización (Zhang y Pardridge, 2001).

BDNF como neuroprotector in vivo se extiende a otros insultos, a saber hipóxico-isquémica (Han y Holtzman, 2000), y la médula espinal traumática (Oppenheim et al, 1992; Ikeda et al., 2002) lesiones, kainato excitotoxicidad (Gratacòset et al., 2001) y la hipoxia neonatal (Galvin y Oorschot, 2003), y incluye las estrategias terapéuticas más recientes, la terapia génica ex vivo (Yasuhara et al., 2006; Shi et al., 2009; Takeshima et al, 2011) y el trasplante de las células que sobreexpresan el BDNF madre neuronales humanos (NSC) injertadas en la región del cerebro que recubre la lesión (Lee et al., 2010).

Como era de esperar, el BDNF es a menudo llamada la "molécula milagrosa" (Monk, 2009) o la "Miracle-Gro para el cerebro" (Ratey, 2008). BDNF juega un abanico de papeles en la función neuronal,

lo que hace que su estudio tan fascinante como compleja, con frecuencia dificulta la distinción entre los diferentes efectos sobre el desarrollo y neuroprotectores provocados por BDNF endógeno y exógeno respectivamente. Por otra parte, el uso de BDNF en aplicaciones clínicas está limitado por farmacocinética desfavorables, específicamente su corta vida media en plasma (menos de 1 minuto en ratas) y la baja tasa de transporte a través de la barrera sangre-cerebro (BBB) (Pardridge et al., 1994; Poduslo y Curran, 1996), escasa penetración intraparenquimatosa (Morse et al., 1993) y los efectos secundarios adversos, principalmente el resultado del BDNF-p75 del receptor de neurotrofina de baja afinidad (p75) interacción, que puede inducir dolor (Zhang et al., 2008), entre otros factores (Kingwell, 2010).

Sin embargo, los recientes avances a través del desarrollo de métodos de entrega alternativos BDNF, por ejemplo, pegilación (Pardridge et al., 1998), Los enfoques de péptidos quiméricos (Wu, 2005 Zhang y Pardridge, 2001) la entrega de genes mediada por (Baumgartner y Shine, 1997; Martin et al., 2003; Kells et al., 2004; Shi et al., 2009), células madre mesenquimales de médula ósea de ingeniería genética (Kurozumi et al., 2004; Sasaki et al., 2009; Harper et al., 2009; Makar et al., 2009; Park et al., 2012) y el uso de poli (acetato de vinilo de etileno) (EVAc) polímeros (Sirianni et al., 2010) como vehículos for long- plazo de la administración in vivo de BDNF, además de parcial (Schmid et al., 2012.) o selectiva (Jang et al., 2010; Bai et al., 2010; Chen et al., 2011) agonistas de TrkB y peptidomiméticos BDNF (O'Leary y Hughes, 2003; Fletcher et al., 2008;.. Massa et al., 2010), han permitido superar tales inconvenientes y promover con éxito las

actividades neurotróficos y neuroprotectores encaminadas a diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

No obstante, en los estudios in vitro utilizando cultivos primarios de neuronas dissociadas permitirá seguir las neuronas individuales y los cambios dinámicos de su morfología con el tiempo, lo que facilita el acceso a la superficie de las células y formación de imágenes de alta resolución, lo que permite un gran número de condiciones experimentales para someter a ensayo simultáneamente, entre varias otras ventajas (Dotti et al, 1988;. Potter y DeMarse, 2001; Kaech y Banker, 2006).

Por otra parte, los cultivos neuronales se reproducen normalmente en aspectos in vivo del desarrollo neuronal y neurodegeneración, a pesar de carecer algunas de las características tridimensionales, y los resultados inicialmente se encuentran en estos preparados se confirmaron por lo general en modelos animales después (Kaech et al., 2012a, b, c).

La excitotoxicidad se ha propuesto recientemente por un número cada vez mayor de investigadores como el mecanismo de convergencia de la neurodegeneración en varias condiciones neuropatológicos (Dong et al, 2009;. Lau y Tymianski, 2010; Ehrnhoefer et al, 2011.). En particular, se ha encontrado la excitotoxicidad inducida por glutamato para activar los eventos críticos en la neurodegeneración de las neuronas del hipocampo in vivo cultivados (Luetjens et al., 2000;. Aarts y Tymianski, 2004; Almeida et al., 2005; Hilton et al., 2006. ; Gomes et al., 2011; Gomes et al., 2012).

Las neuronas del hipocampo son más susceptibles al daño excitotóxico (Hollmann y Heinemann, 1994), ya que carecen de la subunidad p50 del factor nuclear kB (NF-kB) (Yu et al., 1999) y muestran una mayor expresión de los receptores de corticosteroides, la actividad del canal de calcio y la plasticidad sináptica, con la consiguiente vulnerabilidad a la hiperexcitabilidad (revisado en Murray y Holmes, 2011).

En las siguientes secciones, abordaremos el estado-del-arte en el papel de BDNF en los mecanismos de plasticidad sináptica y la neuroprotección, con más detalle, centrándose en los mecanismos de la plasticidad y la neuroprotección contra la excitotoxicidad del glutamato inducido por BDNF en las neuronas del hipocampo en cultivo.

El objetivo es entender mejor el potencial terapéutico de BDNF en el tratamiento de la excitotoxicidad basados en condiciones neurodegenerativas, ya sea a través de la reactivación de la expresión de genes del desarrollo BDNF inducida para activar la recuperación funcional, o la atenuación del daño celular por regulación a la baja de las proteasas y los mecanismos patogénicos desencadenados en la muerte celular programada. Por lo tanto, la identificación de las dianas moleculares clave de señalización fisiológica BDNF es fundamental para el desarrollo de nuevos enfoques para la neuroprotección inducida por el BDNF frente a diferentes condiciones patológicas.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en los apartados anteriores (capítulos 1-3), con respecto a los mecanismos de neuroprotección y plasticidad inducida por el BDNF, en las neuronas del hipocampo en cultivo, conducen a las siguientes conclusiones:

(I) excitotoxicidad del glutamato provoca una activación dependiente del tiempo de los mecanismos proteolíticos segregados espacialmente, lo que probablemente reflejan diferentes vías patogénicas;

(li) El inicio de la neurodegeneración inducida por excitotoxicidad coincide con la activación de la calpaína en los axones y dendritas, gradualmente progresar a la activación de caspasas en el soma celular, con la desregulación del proteasoma significativo en la fase de transición entre la calpaína y la activación de caspasas;

(lii) El SAI regula GAD67 escisión en condiciones de excitotoxicidad, posiblemente a través de la modulación de una pareja de unión GAD desconocido. Escisión GAD tiene consecuencias funcionales importantes a medida que disminuye la actividad enzimática y la distribución puntiforme característico de GAD65 junto neuritas también se ve afectada.

(lv) el BDNF protege las neuritas y cuerpos celulares de las neuronas del hipocampo a través de la activación de diferentes vías de señalización, lo que sugiere, además, que la

excitotoxicidad del glutamato desencadena diferentes mecanismos neurodegenerativas;

(V) la neuroprotección inducida por el BDNF se correlaciona con una atenuación de la activación de la calpaína en una glutamato insulto tóxico;

(Vi) el BDNF protege marcadores clave funcionales de las neuronas glutamatérgicas, incluyendo los transportadores de glutamato vesiculares, y dependiente de la actividad de liberación de neurotransmisor, lo que indica que el BDNF protege los componentes de la maquinaria de exocitosis y / o permite la recuperación funcional de la actividad sináptica en una agresión tóxica;

(Vii) el BDNF regula la expresión de los transportadores vesiculares de glutamato 1 y 2 en las neuronas del hipocampo en desarrollo y maduro, a través de la vía de señalización PLC γ ;

(Viii) La superposición de las vías de señalización (PLC γ) y los marcadores proteicos (VGLUTs y TRPCs) que participan en los mecanismos de BDNF inducida de la plasticidad sináptica y la neuroprotección, y la capacidad del BDNF para atenuar la excitotoxicidad-desencadenó la actividad proteolítica, sugieren que el BDNF puede disminuir simultáneamente el daño causado a las neuronas y permitir la recuperación funcional. Los resultados indican que la hipótesis de ofBDNF que induce la regeneración a través de mecanismos dependientes de la actividad no debe ser excluida;

(Xix) La reactivación de los programas de desarrollo BDNF inducida puede ser utilizado para promover la regeneración de neuronas, sobre la base de mecanismos de síntesis de novo de proteínas, que implican dianas moleculares con un papel clave en la conectividad neuronal y plasticidad;

(Xx) La segregación espacial y temporal de los mecanismos de BDNF inducida de neuroprotección y su capacidad para atenuar el daño y / o promover la recuperación funcional de las neuronas a través de diferentes cascadas de señalización demuestran el uso potencial de los miméticos de BDNF como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas .